

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**



Evaluación del rol de la quinasa GCN2 en la modulación de la autofagia en la corteza motora y el hipotálamo de un modelo murino

Sofía Parham Jadue

Memoria para optar al título profesional de Bioquímico

DIRECTORA

Dra. María Soledad Matus Montero
Investigadora Principal
Laboratorio de Biología de la Neurodegeneración
Fundación Ciencia & Vida

Profesora Asociada
Facultad de Medicina y Ciencia
Universidad San Sebastián

PROFESOR PATROCINANTE

Dr. Alfonso Paredes Vargas
Profesor Asociado
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

Junio 2024

I.- Financiamiento

El trabajo desarrollado en esta Memoria de Título fue financiado con parte de los fondos de los siguientes proyectos:

- Proyecto Fondecyt Regular 1230334, adjudicado por la Dra. Soledad Matus.
- Financiamiento Basal para Centros Científicos y Tecnológicos de Excelencia FB210008, adjudicado por la Fundación Ciencia & Vida.

II.- Agradecimientos y dedicatorias

Quisiera expresar mi profundo agradecimiento a todas aquellas personas que fueron muy importantes en este proceso de término de la carrera y de Memoria de Título.

A la Dra. Soledad Matus, por darme la oportunidad de ser parte de un equipo de trabajo maravilloso y muy enriquecedor, que me ha permitido desarrollar mis capacidades al máximo, crecer como persona y como científica, y donde he disfrutado mucho mi trabajo en el laboratorio en estos más de dos años. También le agradezco por su paciencia, su confianza y la constante disposición y disponibilidad, sin importar las circunstancias, generando que el trabajo en el Laboratorio sea muy ameno. Agradezco a todos mis compañeros en el Laboratorio de Biología de la Neurodegeneración: Cami, Marce, Ariel, Pame, Juanfra y Nico, con quienes es muy grato compartir. En especial agradezco a Marce, quien me enseñó todo lo que he aprendido en el Laboratorio, y de quien sigo aprendiendo, dentro y fuera del Laboratorio. Su acompañamiento en este proceso ha sido muy enriquecedor. También quisiera agradecer a la Fundación Ciencia & Vida y todos sus miembros. Es un lugar muy acogedor, lleno de personas maravillosas.

También agradezco profundamente a mi familia, que es un pilar fundamental en mi vida, y ha sido un componente importante en mi desarrollo como persona y como científica. A mis hermanos: Matías, Nicolás y Leila, que completan mi vida con cada una de sus particularidades. A mis papás, Ricardo y Leila, por su apoyo incondicional, por los valores que me han inculcado y por todo lo que me han entregado. Ellos me han permitido llegar hasta acá y ser la persona que soy. Su eterno acompañamiento y disponibilidad es admirable. Por esto y más, estoy profundamente agradecida de que sean parte de mi vida.

También quisiera agradecer a María José Valenzuela, que ha sido un apoyo fundamental durante este tiempo. Y a Ignacio Vega, por su orientación y su constante disposición para ayudar durante todo el periodo universitario.

Finalmente, quisiera dedicar este trabajo de Título a mis abuelos, Irma y Juan, que de una u otra forma siempre me han acompañado y están presentes en mi vida. Conocerlos fue un verdadero privilegio. Y son una fuente constante de motivación y admiración para mí.

“From the river to the sea, Palestine will be free”

III.- Índice de contenidos

Resumen	IX
Abstract	X
1.- Introducción	- 1 -
2.- Hipótesis.....	- 8 -
3.- Objetivos general y específicos.....	- 8 -
4.- Materiales y métodos	- 9 -
4.1.- Animales	- 9 -
4.2.- Evaluación de la función motora	- 10 -
4.3.- Disección y procesamiento de tejidos	- 10 -
4.4.- PCR cuantitativo.....	- 10 -
4.5.- <i>Western blot</i>	- 11 -
4.6.- Análisis estadísticos	- 11 -
5.- Resultados	- 12 -
5.1.- Caracterización de los efectos de la dieta baja en proteínas en indicadores del metabolismo y la función motora de los animales, y la relevancia de la GCN2 en los efectos observados.....	- 12 -
5.1.1.- Caracterización de los efectos de la dieta baja en proteínas en el peso corporal, la glicemia y la función motora de ratones hembra, y su dependencia de la GCN2.....	- 13 -
5.1.2.- Caracterización de los efectos de la dieta baja en proteínas en el peso corporal, la glicemia y la función motora de ratones macho, y su dependencia de la GCN2.....	- 17 -
5.2.- Evaluación de la contribución de la GCN2 en las consecuencias de la disminución del contenido proteico de la dieta en la activación de la ISR y la autofagia evaluadas en la corteza motora de ratones.....	- 20 -
5.2.1.- Evaluación de la contribución de la GCN2 en las consecuencias de la disminución del contenido proteico de la dieta en la activación de la ISR y la autofagia en la corteza motora de ratones hembra.....	- 21 -

5.2.2.- Evaluación de la contribución de la GCN2 en las consecuencias de la disminución del contenido proteico de la dieta en la activación de la ISR y la autofagia en la corteza motora de ratones macho.	- 27 -
5.3.- Evaluación de la contribución de la GCN2 en las consecuencias de la disminución del contenido proteico de la dieta en la activación de la ISR y la autofagia evaluadas en el hipotálamo de ratones.	- 33 -
5.3.1.- Evaluación de la contribución de la GCN2 en las consecuencias de la disminución del contenido proteico de la dieta en la activación de la ISR y la autofagia en el hipotálamo de ratones hembra.	- 33 -
5.3.2.- Evaluación de la contribución de la GCN2 en las consecuencias de la disminución del contenido proteico de la dieta en la activación de la ISR y la autofagia en el hipotálamo de ratones macho.	- 38 -
6.- Discusión	- 45 -
7.- Conclusiones	- 55 -
8.- Proyecciones	- 56 -
9.- Bibliografía	- 58 -
10.- Anexos	- 61 -

IV.- Índice de figuras y tablas

Figura 1. La respuesta integrada al estrés.....	- 2 -
Figura 2. Esquema general simplificado de la autofagia.....	- 4 -
Figura 3. Evaluación de parámetros metabólicos y función motora de las hembras sometidas a la dieta baja en proteínas.....	- 16 -
Figura 4. Evaluación de parámetros metabólicos y función motora de los machos sometidos a la dieta baja en proteínas.....	- 19 -
Figura 5. Análisis de la activación de la ISR y la autofagia en la corteza motora de hembras WT sometidas a la dieta baja en proteínas.....	- 23 -
Figura 6. Análisis de la activación de la ISR y la autofagia en la corteza motora de hembras GCN2KO sometidas a la dieta baja en proteínas.....	- 26 -
Figura 7. Análisis de la activación de la ISR y la autofagia en la corteza motora de machos WT sometidos a la dieta baja en proteínas.....	- 28 -
Figura 8. Análisis de la activación de la ISR y la autofagia en la corteza motora de machos GCN2KO sometidos a la dieta baja en proteínas.....	- 31 -
Figura 9. Determinación de los niveles de transcritos codificantes para la proteína LC3 en la corteza motora de machos WT y GCN2KO sometidos a la dieta baja en proteínas. -	- 32 -
Figura 10. Análisis de la activación de la ISR y la autofagia en el hipotálamo de hembras WT sometidas a la dieta baja en proteínas.....	- 35 -
Figura 11. Análisis de la activación de la ISR y la autofagia en el hipotálamo de hembras GCN2KO sometidas a la dieta baja en proteínas.....	- 37 -
Figura 12. Análisis de la activación de la ISR y la autofagia en el hipotálamo de machos WT sometidos a la dieta baja en proteínas.....	- 39 -
Figura 13. Análisis de la activación de la ISR y la autofagia en el hipotálamo de machos GCN2KO sometidos a la dieta baja en proteínas.....	- 42 -

Figura 14. Modelo de la regulación ejercida por la quinasa GCN2 en la autofagia en la corteza motora y el hipotálamo.....	- 54 -
Figura S1. Evaluación de la ingesta de alimento de las hembras sometidas a la dieta baja en proteínas.....	- 62 -
Figura S2. Evaluación de la ingesta de alimento de los machos sometidos a la dieta baja en proteínas.....	- 63 -
Figura S3. Evaluación del peso corporal de las hembras sometidas a la dieta baja en proteínas.....	- 64 -
Figura S4. Evaluación del peso corporal de los machos sometidos a la dieta baja en proteínas.....	- 65 -
Figura S5. Evaluación de la glicemia de las hembras sometidas a la dieta baja en proteínas.....	- 66 -
Figura S6. Evaluación de la glicemia de los machos sometidos a la dieta baja en proteínas.....	- 67 -
Figura S7. Análisis de la activación de la autofagia en la corteza motora de machos WT sometidos a la dieta baja en proteínas.....	- 68 -
Tabla 1. Resumen de los cambios a nivel proteico en los indicadores evaluados en cada grupo, en respuesta a la dieta baja en proteínas.....	- 44 -
Tabla 2. Valores del peso corporal promedio y la desviación estándar de hembras....	- 69 -
Tabla 3. Valores del peso corporal promedio y la desviación estándar de machos.....	- 69 -
Tabla 4. Valores de la glicemia promedio y la desviación estándar de las hembras....	- 70 -
Tabla 5. Valores de la glicemia promedio y la desviación estándar de los machos.....	- 70 -
Tabla 6. Partidores utilizados para la amplificación de transcritos mediante qPCR.....	- 71 -

V.- Abreviaturas

ADNc: ADN complementario.

AgRP: péptido relacionado a Agouti.

ARNt: ácido ribonucleico de transferencia.

AT: *Agilent Technologies*.

ATF4: factor activador de la transcripción 4.

Atg7: proteína asociada a la autofagia 7.

CMT: enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.

cols.: colaboradores.

CST: *Cell Signaling Technology, Inc.*[®].

DBP: dieta baja en proteínas.

DC: dieta control.

Desv. std.: desviación estándar.

eIF2: factor de iniciación de la traducción eucarionte 2.

eIF2 α : subunidad α del factor de iniciación de la traducción eucarionte 2.

ELA: esclerosis lateral amiotrófica.

GAPDH: enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.

GCN2: quinasa de control general de aminoácidos no derreprimible 2.

GCN2KO: animal deficiente en el exón codificante para el dominio quinasa de la GCN2.

HRI: quinasa hemo-regulada.

ISR: respuesta integrada al estrés (del inglés, "*integrated stress response*").

LC3: proteína asociada a microtúbulos 1 de cadena liviana 3 β .

N2a: línea celular de neuroblastoma de ratón.

PERK: quinasa del retículo endoplásmico tipo-PKR.

PKR: quinasa dependiente de ARN de doble hebra.

qPCR: ensayo basado en la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo.

RE: retículo endoplásmico.

Sesn2: proteína de respuesta a estrés 2.

SNC: sistema nervioso central.

TFS: *Thermo Fisher Scientific, Inc.*[®].

uORF: marco de lectura abierto río arriba (del inglés, "*upstream open reading frame*").

WT: animal control (del inglés, "*wild-type*").

VI.- Resumen

La respuesta integrada al estrés (ISR, del inglés “*integrated stress response*”) es una vía de señalización que se activa con diversos estímulos, y supervisa las condiciones del ambiente a través de cuatro quinasas que, cuando se activan, fosforilan la subunidad α del factor iniciador de la traducción eucarionte 2 (eIF2 α). La fosforilación de eIF2 α inhibe la síntesis de proteínas e induce la reprogramación de la expresión génica hacia la recuperación de la homeostasis, promoviendo la adaptación. Una de las quinasas de la ISR es la proteína GCN2 (del inglés, “*general control nonderepressible 2*”), que detecta la deficiencia de aminoácidos. La autofagia, que es un proceso de degradación intracelular que permite obtener aminoácidos mediante la degradación de componentes intracelulares, es inducida río abajo de la activación de la GCN2, en ciertos modelos celulares y tejidos. La autofagia es esencial para la mantención de la homeostasis en el sistema nervioso central (SNC), sin embargo, se desconoce si forma parte del mecanismo adaptativo inducido por la GCN2 en condiciones de deficiencia de aminoácidos específicamente en el SNC. En esta Memoria de Título se evaluó la activación de la autofagia, y la contribución de la GCN2 en esta activación, en el SNC de ratones, en respuesta a un estímulo activador de la GCN2: una dieta baja en proteínas (DBP). La DBP se administró por seis semanas, y en este periodo se monitoreó el estado general de los animales. Los resultados mostraron que la GCN2 está involucrada en el control del peso corporal, la glicemia y la función motora, y esta regulación es opuesta en machos y hembras: ante una DBP, en hembras, la GCN2 mantiene en homeostasis los parámetros evaluados, mientras que en machos, la quinasas modifica estos parámetros. Los análisis bioquímicos de la corteza motora y el hipotálamo mostraron que la activación de la ISR mediada por la GCN2 fue tejido-dependiente: en respuesta a la DBP, la ISR se activó en el hipotálamo, pero no en la corteza motora, tanto en machos como en hembras. Por otro lado, la activación de la autofagia en respuesta a la DBP fue sexo-dependiente: se observó la probable activación GCN2-dependiente de la autofagia en la corteza motora y el hipotálamo de los machos, no así en hembras. Un efecto transversal de la DBP observado fue la regulación ejercida por la GCN2 sobre eIF2 α : en todos los grupos se observaron cambios en los niveles de eIF2 α , que fueron genotipo-dependientes. Esto revela la existencia de una forma indirecta de control de la activación de la ISR, mediante la modulación de la abundancia del centro integrador de la vía. En resumen, los resultados sugieren que la activación de la autofagia es parte del mecanismo adaptativo promovido por la GCN2 en el sistema nervioso central ante una disminución de la disponibilidad de aminoácidos en machos, pero no en hembras.

VII.- Abstract

Evaluation of the role of GCN2 kinase in autophagy regulation in the central nervous system of a murine model

The integrated stress response (ISR) is a signaling pathway that can be activated by various stimuli and oversees environmental conditions through four kinases that, when activated, phosphorylate the α subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 α). Phosphorylation of eIF2 α halts protein synthesis and reprograms gene expression towards the recovery of homeostasis, promoting adaptation. One of the ISR kinases is the general control nonderepressible 2 protein (GCN2), which senses amino acid deficiency. Autophagy, an intracellular degradation process that provides amino acids by degrading intracellular components, is induced downstream of GCN2 activation in certain cell models and tissues. Autophagy is essential for the maintenance of homeostasis in the central nervous system (CNS), however, it is unknown whether it is part of the adaptive mechanism induced by GCN2 under amino acid deficiency specifically in the CNS. In this research, we evaluated the activation of autophagy and the contribution of GCN2 in this activation in the CNS of mice in response to a GCN2-activating stimulus: a low protein diet (LPD). The LPD was administered for six weeks, and during this period animals' general condition was monitored. The results showed that GCN2 is involved in the control of body weight, glycemia and motor function, and this regulation is opposite in males and females: in response to a LPD, GCN2 maintains homeostasis in females, while in males, the kinase modifies these parameters. Biochemical analyses of the motor cortex and hypothalamus showed that GCN2-mediated ISR activation was tissue-dependent: in response to the LPD, the ISR was activated in the hypothalamus but not in the motor cortex in both male and female mice. On the other hand, autophagy activation in response to the LPD was sex-dependent: likely GCN2-dependent activation of autophagy was observed in the motor cortex and hypothalamus of males, but not in females. A cross-sectional effect of the LPD was the regulation exerted by GCN2 on eIF2 α : changes in eIF2 α levels, which were genotype-dependent, were observed in all groups. This reveals the existence of an indirect manner of control of ISR activation by modulating the abundance of the integrating center of the pathway. In summary, the results suggest that autophagy activation is part of the adaptive mechanism promoted by GCN2 in the central nervous system upon a decrease in amino acid availability in male, but not in female mice.

1.- Introducción

La respuesta integrada al estrés (ISR, del inglés “*Integrated Stress Response*”) es una vía de señalización que se activa frente a distintas condiciones, tales como estrés oxidativo, alteraciones en la homeostasis proteica, infecciones virales, entre otras¹. La ISR sensa las condiciones del ambiente a través de cuatro proteínas quinasas: la quinasa dependiente de ARN de doble hebra (PKR), la quinasa del retículo endoplásmico tipo-PKR (PERK), la quinasa hemo-regulada (HRI) y la quinasa de control general de aminoácidos no suprimible 2 (GCN2)². Cuando una de estas quinasas se activa, fosforila en un único residuo al elemento integrador de la ISR: el factor de iniciación de la traducción eucariote 2 (eIF2), específicamente en la subunidad α (eIF2 α). eIF2, junto con una molécula de GTP y el ARN de transferencia iniciador cargado con metionina, forman el denominado “complejo ternario”, que es necesario para el inicio de la traducción de ARN mensajeros. El complejo ternario es imprescindible para el inicio de la traducción de transcritos con marcos de lectura abiertos que inician con el codón AUG, es decir, la traducción CAP-dependiente³. Para la formación del complejo ternario, en primer lugar la molécula de GDP unida a eIF2 debe ser intercambiada por GTP, y esta reacción es catalizada por un factor intercambiador de nucleótidos de guanina específico, denominado eIF2B. Cuando eIF2 es fosforilado (en su subunidad α) por alguna de las quinasas de la ISR, se impide estéricamente la actividad catalítica de eIF2B, por consiguiente, no se puede intercambiar la molécula de GDP unida a eIF2 por GTP, impidiendo la formación del complejo ternario¹. De este modo, la fosforilación de eIF2 α genera una disminución de la disponibilidad del complejo ternario y, en consecuencia, inhibe la síntesis proteica general a través de un arresto general de la traducción de ARN mensajeros (Figura 1). Sin embargo, ciertos mensajeros que contienen marcos de lectura abiertos río arriba (uORF, del inglés “*upstream open reading frame*”) escapan de este arresto traduccional, como lo es el transcrito que codifica para el factor activador de la transcripción 4 (ATF4)^{4,5}. Una vez traducido, ATF4 transloca al núcleo e induce la expresión de genes de respuesta a estrés, permitiendo la adaptación a las nuevas condiciones y el eventual restablecimiento de la homeostasis^{1,6}. La ISR participa en diversos procesos, entre los cuales se encuentran la formación de memoria y la plasticidad sináptica⁷ y la respuesta inmune innata¹, entre otros. En particular, en el sistema nervioso central (SNC), la ISR participa tanto en su fisiología como en las patologías que lo afectan¹. Por ejemplo, se ha descrito que la quinasa GCN2 regula la plasticidad sináptica⁸. Por otro lado, se ha descrito en modelos murinos de la enfermedad de Alzheimer que los niveles de

fosforilación de eIF2 α se encuentran aumentados y que la inhibición farmacológica de las consecuencias de la activación de la ISR revierte, en parte, el fenotipo cognitivo del modelo de la enfermedad⁹. Además, se han asociado variantes génicas de algunas quinasas de la ISR a retrasos en el desarrollo neurológico¹⁰, entre otros ejemplos¹¹. Por lo tanto, la ISR es una vía de señalización importante en el SNC.

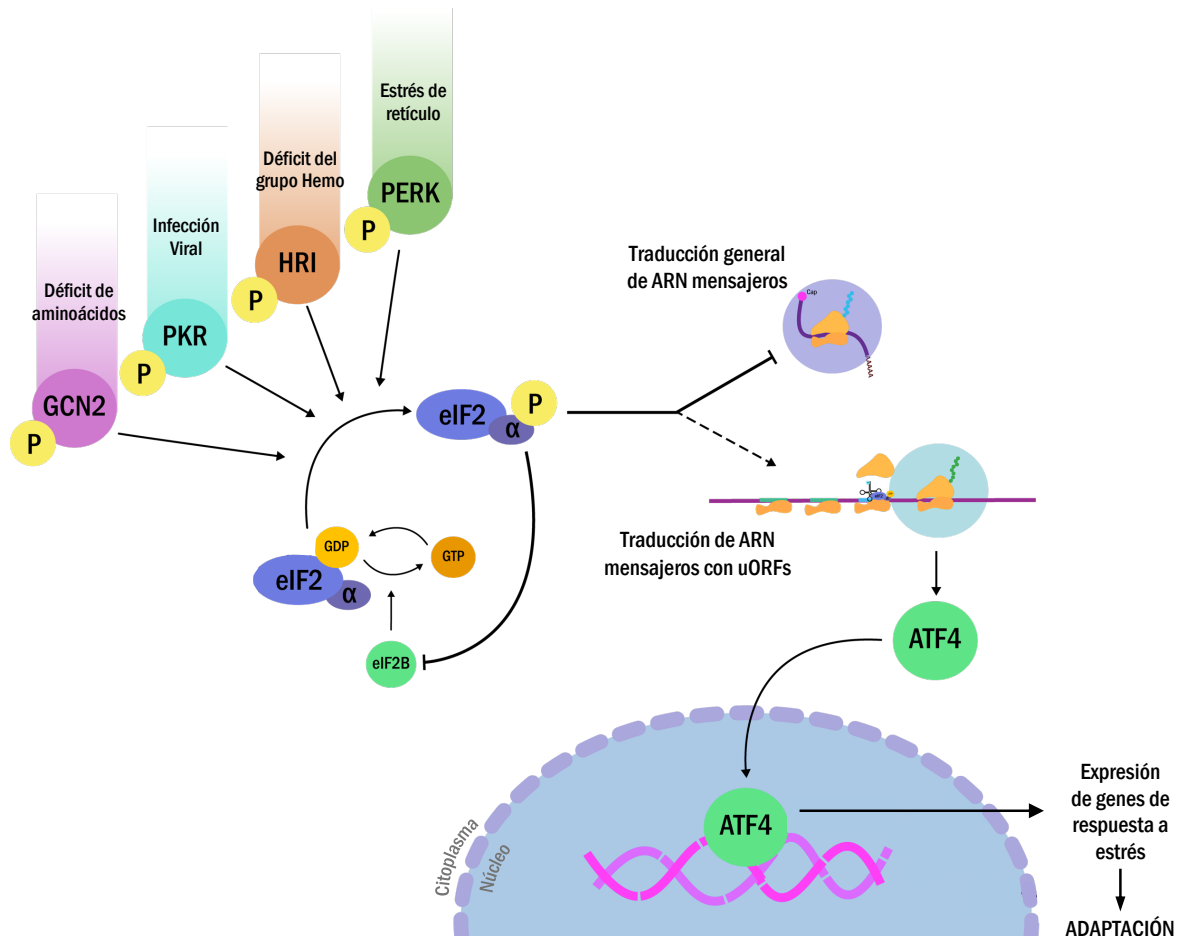


Figura 1. La respuesta integrada al estrés (ISR). Las quinasas de la ISR (GCN2, PKR, HRI y PERK) se activan por distintos estímulos, y fosforilan a la subunidad α del factor de iniciación de la traducción eucariote 2, eIF2 α . La fosforilación de eIF2 α inhibe a eIF2B, que intercambia la molécula de GDP unida a eIF2 α por una molécula de GTP, impidiendo la formación del complejo ternario. En estas condiciones, se inhibe la traducción general de mensajeros, y se traducen transcritos que contienen marcos de lectura alternativos (uORFs, ver texto) y que escapan del arresto traduccional. El mensajero codificante para el factor activador de la transcripción 4 (ATF4) es uno de los mensajeros traducidos en condiciones de la fosforilación de eIF2 α . ATF4 transloca al núcleo y promueve la expresión de genes de respuesta a estrés, generando un nuevo perfil transcripcional orientado a la adaptación. Figura de Ariel Tapia, modificada.

Esta Memoria de Título se centra en la GCN2, que es una quinasa que se activa en condiciones de bajos niveles de aminoácidos^{4,5,12,13}, a través de la detección de la acumulación de ARNs de transferencia (ARNt) no cargados^{5,14}. Más específicamente, los ARNt no cargados (debido a la disminución de la disponibilidad de aminoácidos) se unen al dominio “tipo His-RS” de la GCN2¹⁴, generando un cambio conformacional que permite la activación de la quinasa mediante autofosforilación¹⁵⁻¹⁷. La quinasa GCN2 activada (fosforilada), luego fosforila a eIF2 e induce la secuencia de eventos río abajo (inhibición de la síntesis proteica y reprogramación de la expresión génica), permitiendo la adaptación a la deficiencia de aminoácidos detectada. La adaptación promovida por la GCN2 es efectuada mediante cambios en la expresión génica que permiten recuperar el balance nutricional y la homeostasis^{18,19}. La activación de la GCN2 promueve la expresión de genes asociados al metabolismo aminoacídico, tales como transportadores de aminoácidos, genes de rutas biosintéticas de aminoácidos, entre otros^{6,18-20}. También se promueve la expresión de genes asociados a la resistencia al estrés oxidativo⁶ y a la inducción de la autofagia^{20,21}. Se ha propuesto que la inducción de la autofagia, que es un proceso de degradación y reciclaje de componentes intracelulares²², permite obtener los aminoácidos necesarios para la traducción de los transcritos generados como consecuencia de la activación de la GCN2¹⁹⁻²¹. Además, la recuperación de los niveles de aminoácidos es necesaria no solo para la síntesis proteica, sino también para la producción de ATP mediante el ciclo del ácido cítrico, y para la resistencia al estrés oxidativo, mediante la mantención de los niveles fisiológicos de especies reductoras⁶. Por lo tanto, la activación de la autofagia es un evento fundamental de la activación de la GCN2 en el proceso adaptativo para la mantención del metabolismo aminoacídico y la homeostasis celular²³.

La autofagia es un proceso de degradación intracelular, que se activa en condiciones de deficiencia de nutrientes o ante el agotamiento de energía^{22,24}. Este proceso permite obtener aquellos nutrientes faltantes a partir de la degradación de componentes intracelulares. Por otro lado, mediante la autofagia también es posible eliminar proteínas mal plegadas, organelos dañados o componentes celulares que requieren un recambio²². La Figura 2 muestra el proceso de autofagia esquematizado. La autofagia comienza con la formación de una estructura lineal de doble membrana, denominada fagóforo, que se expande hasta formar una estructura circular cerrada denominada autofagosoma²². Al interior del autofagosoma se encuentra el contenido destinado a la degradación, que puede haber sido movilizado allí mediante la acción de receptores de autofagia, como lo es p62²². En el proceso de elongación del fagóforo intervienen distintas proteínas, entre ellas, la

proteína asociada a la autofagia 7 (Atg7) y la forma activa de la proteína asociada a microtúbulos 1 de cadena liviana 3 β (LC3, que se encuentra en su forma LC3-I en el citoplasma y, al ser procesada a su forma activa LC3-II, se une a la membrana del fagóforo y promueve su expansión)²². Luego, el autofagosoma se fusiona con un lisosoma y se mezcla el contenido de ambas estructuras. La estructura resultante de la fusión se denomina autolisosoma. Tras la fusión, las enzimas provenientes del lisosoma degradan el contenido del autolisosoma, incluyendo la membrana interna derivada del autofagosoma. Posteriormente, las moléculas resultantes son liberadas al citoplasma, para ser recicladas²². De esta manera, a través del suplemento de las moléculas faltantes, la autofagia contribuye a la fina regulación del metabolismo celular y la mantención de la homeostasis.

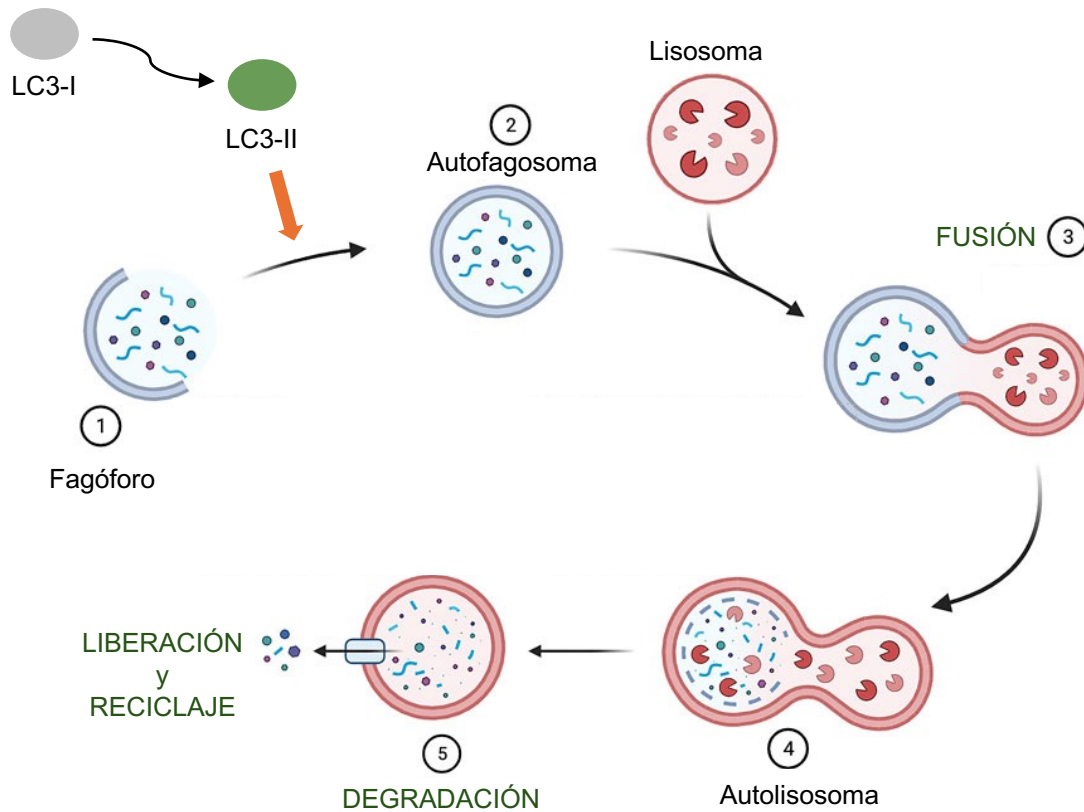


Figura 2. Esquema general simplificado de la autofagia. La autofagia comienza con la formación de una estructura de doble membrana denominada fagóforo (1), que se expande hasta formar una estructura cerrada denominada autofagosoma (2). Al interior del autofagosoma se encuentra el contenido que será degradado. En la elongación del fagóforo interviene, entre otros, la proteína LC3. LC3 habitualmente se encuentra en su forma LC3-I y, tras la activación de la autofagia, es procesada a su forma activa, LC3-II. LC3-II promueve la expansión de la membrana del fagóforo, hasta formar el autofagosoma. El autofagosoma resultante luego se fusiona con un lisosoma (3), formando el autolisosoma (4). Tras la fusión, las enzimas lisosomales degradan el contenido del autolisosoma (5), y las moléculas resultantes son liberadas al citoplasma, para ser recicladas. Adaptado de ²⁵.

Por otro lado, la autofagia, como proceso que permite la adaptación y supervivencia celular, es esencial en el SNC, particularmente en las neuronas. Dada la naturaleza altamente especializada y no proliferativa de las neuronas, resulta fundamental controlar finamente la homeostasis proteica y el estado de los distintos componentes de estas células²⁶. Así, la autofagia permite evitar la acumulación de componentes que requieren ser eliminados de las neuronas, manteniendo la homeostasis; y además permite obtener nutrientes esenciales en caso de escasez, favoreciendo la supervivencia celular, evitando así la irreversible pérdida de neuronas²⁶. La relevancia de la autofagia en neuronas fue demostrada por Komatsu y colaboradores (cols.)²⁷, quienes observaron que animales deficientes en el gen codificante para Atg7, enzima fundamental para la autofagia, desarrollan un fenotipo neurodegenerativo, reflejado en un retardo en el crecimiento, deficiencias motoras, atrofia cortical y una supervivencia no mayor a veintiocho semanas, entre otros. Este resultado evidencia que la autofagia es un proceso fundamental en el SNC.

Se ha descrito que la activación de la GCN2 activa la autofagia en condiciones de deficiencia de aminoácidos, en levaduras²⁸ y en células de mamífero (derivadas de ratón^{20,21,28} y de humano²⁰). En fibroblastos de ratón, B'chir y cols.²¹ describieron que la inducción de la autofagia que ocurre en respuesta a una deficiencia de leucina es mediada por la actividad de la GCN2 y de ATF4, a través de la inducción de la expresión de genes autofágicos, tales como *atg7*, *lc3* y *p62*. Además, en el mismo modelo, Ye y cols.²⁹ describieron que la activación de la GCN2 promueve la expresión de la proteína reguladora de la autofagia Sestrina2 (Sesn2). Sesn2 regula la autofagia mediante la inhibición del complejo mTORC1, el cual inhibe la autofagia ante niveles suficientes de aminoácidos^{29,30}. Por lo tanto, la proteína Sesn2, mediante el bloqueo de este mecanismo inhibitorio de la autofagia, permite la progresión del proceso degradativo. Por otro lado, Maurin y cols.³¹ evaluaron el rol de la GCN2 en la inducción de la autofagia *in vivo*. En este trabajo se mostró que la deficiencia del aminoácido leucina en la dieta por una hora activa la autofagia en el hígado de ratón, y que este efecto es dependiente de la quinasa GCN2. Es decir, la actividad de la GCN2 modula la autofagia ante una deficiencia de aminoácidos. No obstante, a pesar de que se conoce el rol de la GCN2 en la regulación de la autofagia, en modelos *in vitro* y en el hígado, se desconoce si la quinasa GCN2 induce la autofagia específicamente en el SNC. A partir de lo expuesto anteriormente, y considerando el efecto adaptativo que tiene la autofagia en el SNC, entender el mecanismo por el cual se promueve este proceso en el cerebro es de gran relevancia.

En el SNC existen regiones específicas que detectan desbalances de nutrientes, en particular, en los niveles de aminoácidos circulantes, y controlan la ingesta de alimentos en función de estos desequilibrios. Una de las regiones del SNC que es fundamental en la regulación de los niveles de aminoácidos es el hipotálamo³²⁻³⁵. Al detectar una deficiencia de aminoácidos, el hipotálamo responde promoviendo la producción de neuropéptidos que inducen cambios en la ingesta de alimento, con el objetivo de recuperar el balance aminoacídico. Además, a nivel intracelular, se inducen vías de señalización asociadas a condiciones de deficiencia de aminoácidos^{36,37}. Por ejemplo, se ha descrito que en el hipotálamo de ratones sometidos a dietas bajas en proteínas durante doce semanas, se induce la expresión de genes involucrados en la señalización de la ISR¹³. Además, se ha descrito que ante una deficiencia de leucina en la dieta, se activa la GCN2 en el hipotálamo, y esta activación es necesaria para la regulación hipotalámica de la alimentación³³.

Por otro lado, se ha descrito que ante una deficiencia de nutrientes se induce la autofagia en las neuronas que expresan el péptido relacionado a Agouti (AgRP), un tipo de neuronas específico del hipotálamo³². Las moléculas movilizadas, como consecuencia de la autofagia inducida, son las que permiten efectuar el mecanismo regulador de la alimentación³². Por lo tanto, la inducción de la autofagia es fundamental en la respuesta del hipotálamo a la deficiencia nutricional y el restablecimiento del balance de nutrientes, adquiriendo aún más relevancia este proceso degradativo en el SNC y en el hipotálamo en particular.

En resumen, evaluar el rol de la GCN2 en la modulación de la autofagia en el SNC y específicamente en las regiones del SNC involucradas en la regulación de los niveles de aminoácidos, como el hipotálamo, es de gran relevancia.

La mantención de los niveles fisiológicos de aminoácidos es necesaria para la mantención de la homeostasis, especialmente en el SNC^{38,39} y, para esta mantención, el mecanismo adaptativo ejercido por la quinasa GCN2 es fundamental. Por ejemplo, los ratones que portan una mutación que aumenta el catabolismo (degradación) de aminoácidos que son esenciales, tienen niveles disminuidos de estos aminoácidos. En condiciones de ausencia de la GCN2, los animales no responden a esta disminución de aminoácidos esenciales, y esto resulta en la muerte (sobrevida no mayor a quince días)⁴⁰. La quinasa GCN2 es, por lo tanto, esencial para mantener niveles adecuados de aminoácidos, especialmente en el SNC. Dado este rol fundamental que ejerce la GCN2, conocer el mecanismo a través del cual la quinasa GCN2 promueve la adaptación, y la mantención de la homeostasis, es sumamente relevante.

Una estrategia ampliamente utilizada para evaluar la activación de la GCN2 *in vivo* consiste en la administración de dietas bajas en proteínas. El consumo de dietas de composición proteica reducida conlleva una rápida disminución de los niveles plasmáticos de aminoácidos^{31,33,41-43}. La disminución de la concentración de aminoácidos circulantes tiene como consecuencia una disminución en los niveles intracelulares de aminoácidos⁴². Asimismo, al disminuir la concentración de aminoácidos intracelulares, los ARNt no pueden ser cargados con su aminoácido correspondiente, y se produce una acumulación de los ARNt no cargados, lo cual tiene un efecto activador de la GCN2. De este modo, la administración de dietas bajas en proteínas representa un estímulo activador de la GCN2. Se ha descrito la activación de la quinasa GCN2 en ratones alimentados con dietas bajas en proteínas, ya sea deficientes en aminoácidos específicos o con una reducción general de la composición proteica, en hígado^{13,31,41,42}, corteza cerebral⁴¹, hipotálamo^{13,33}, entre otros. Por lo tanto, la administración de dietas bajas en proteínas a ratones es un estímulo válido para activar la quinasa GCN2.

En esta Memoria de Título se estudió si en condiciones de estrés nutricional, como lo es la deficiencia de aminoácidos, la quinasa GCN2 promueve la activación de la autofagia en el sistema nervioso central.

2.- Hipótesis

La activación de la respuesta integrada al estrés mediada por la quinasa GCN2 induce la autofagia en la corteza motora y el hipotálamo.

3.- Objetivos general y específicos

3.1. Objetivo General

Determinar el rol de la quinasa GCN2 en la inducción de la autofagia en la corteza motora y el hipotálamo de un modelo murino.

3.2. Objetivos Específicos (OE)

OE1: Determinar si una dieta reducida en proteínas promueve la autofagia en la corteza motora y el hipotálamo de un modelo murino.

OE2: Evaluar si la inducción de la autofagia en la corteza motora y el hipotálamo de un modelo murino mediante la dieta reducida en proteínas es dependiente de la GCN2.

4.- Materiales y métodos

Para determinar si la activación de la autofagia forma parte del mecanismo adaptativo promovido por la activación de la GCN2, específicamente en el sistema nervioso central de ratones, animales control (WT) y deficientes en el exón que codifica para el dominio quinasa de la GCN2 (GCN2KO) fueron alimentados con una dieta que representa un estímulo activador de la GCN2. Luego se evaluaron marcadores de activación de la ISR y de la autofagia por ensayos bioquímicos en la corteza motora y el hipotálamo de los animales. Se analizó el efecto de la dieta en los distintos grupos experimentales, y posteriormente se determinó la contribución de la quinasa GCN2 en la autofagia mediante la comparación de los efectos de la dieta observados en los grupos WT y GCN2KO.

4.1.- Animales

Ratones macho y hembra, controles (WT, del inglés “*wild-type*”, cepa C57BL/6J, 12 machos y 12 hembras) y deficientes en el exón que codifica para el dominio quinasa de la GCN2 (GCN2KO, *The Jackson Laboratory*® #008240, 13 machos y 14 hembras), fueron mantenidos bajo un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, a una temperatura de 22 ± 2 °C, con agua y comida (*LabDiet*® #5001) *ad libitum*. Cuando los animales cumplieron los tres meses de edad, fueron alimentados por dos semanas con una dieta con un 20 %p/p de proteínas (“dieta control”, DC, *Research Diets, Inc.*® #D11051801). Durante las seis semanas posteriores, la mitad de los animales se mantuvo consumiendo la DC, y la otra mitad fue alimentada con una dieta baja en proteínas (DBP, 5 %p/p de proteínas, *Research Diets, Inc.*® #D11092301). Durante este periodo, se controló el consumo de alimento: semanalmente, se entregó una cantidad exacta de alimento, y a la semana siguiente se pesó el alimento restante. El peso corporal de los animales fue registrado semanalmente, al inicio de cada semana experimental. Los valores promedio del peso corporal de cada grupo están indicados en las Tablas 1 (hembras) y 2 (machos) en el Anexo. Se realizaron mediciones de glicemia cada tres semanas, utilizando tiras reactivas (*Abbott Diabetes Care Ltd.* #71361-81, #99649-80). La glicemia se determinó después de seis horas de ayuno. Los valores obtenidos de glicemia promedio en las distintas mediciones se encuentran en las Tablas 3 (hembras) y 4 (machos) en el Anexo. Durante todo el experimento los animales fueron mantenidos en el Bioterio de la Fundación Ciencia & Vida. Los experimentos fueron autorizados por el Comité de Bioética y Bioseguridad de la Fundación Ciencia & Vida, Certificado de Aprobación Bioética P047/2023.

4.2.- Evaluación de la función motora

Durante la sexta semana de administración de la DC y la DBP se realizó la prueba motora de Rotarod (Panlab® #LE8205). La prueba se aplicó dos veces al día, por cinco días consecutivos. Se utilizó un protocolo con aceleración constante: la velocidad pasaba de 0 a 40 rpm en dos minutos. Por cada animal se realizaron tres mediciones consecutivas, con pausas de un minuto entre mediciones. Primero se evaluaron todos los animales macho, y luego las hembras. El equipo fue debidamente limpiado entre mediciones de animales distintos.

4.3.- Disección y procesamiento de tejidos

Una vez finalizada la administración de dietas, se realizó la eutanasia de los animales (sobredosis de isoflurano y dislocación cervical) y la extracción de la corteza motora y el hipotálamo para su posterior análisis bioquímico. No se consideró el estado estral de los animales para la eutanasia. Los tejidos extraídos se mantuvieron a -80 °C hasta su procesamiento. Los tejidos se homogeneizaron con un homogeneizador BioVortexer (Biospec products® 1083MC) en una solución salina fosfatada con adición de inhibidores de proteasas (fluoruro de fenilmetilsulfonilo 3 mM, leupeptina 0,03 mM, antipaína 0,003 mM y pepstatina 0,003 mM) e inhibidores de fosfatasa (fluoruro de sodio 15 mM, glicerolfosfato 3 mM y ortovanadato de sodio 3 mM). Los homogeneizados se dividieron en dos partes, para extraer proteínas y ARN. Las proteínas se extrajeron con una solución de lisis (Cell Signaling Technology, Inc.® (CST) #9803) con adición de inhibidores de proteasas y fosfatasa, y se midió la concentración de proteínas del extracto (Thermo Fisher Scientific, Inc.® (TFS) #23225). Se extrajo el ARN con el reactivo TRIzol® (TFS #15596018), y se cuantificó su concentración mediante la medición de la absorbancia de los extractos.

4.4.- PCR cuantitativo

A partir del ARN extraído, se sintetizó el ADN complementario (ADNc, TFS #4368813, Bio-Rad Laboratories, Inc.® #1861096) y luego se realizó el ensayo basado en la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo (qPCR). Utilizando partidores específicos (Tabla 5 en el Anexo, Integrated DNA Technologies, Inc.), se evaluaron los niveles de transcritos codificantes para LC3 (gen *map1lc3b*), y como control se analizaron los transcritos codificantes para actina (*actin*). El ensayo de qPCR (AT #410088, #401425, Stratagene®, AT Mx3000P) se realizó midiendo cada muestra por duplicado, utilizando la mezcla Brilliant II SYBR® Green (Agilent Technologies (AT) #600828). Se utilizó la siguiente secuencia de

ciclos: un segmento inicial de un ciclo de 1 segundo a 25 °C, luego un segmento de un ciclo de 10 minutos a 95 °C, luego un tercer segmento de 40 ciclos de tres etapas (30 segundos a 95 °C, luego 40 segundos a 58 °C y después 30 segundos a 72 °C), y un segmento final de un ciclo de tres etapas (1 minuto a 95 °C, 30 segundos a 55 °C y 30 segundos a 95 °C). Los valores obtenidos para los transcritos de interés se normalizaron con respecto a los niveles de transcritos de actina mediante la siguiente fórmula: $2^{(ARNm_{actina} - ARNm_{de\ interés})}$. Los resultados obtenidos se procesaron con el programa GraphPad Prism⁴⁴.

4.5.- Western blot

A partir de las proteínas extraídas desde los tejidos homogeneizados, se realizaron ensayos de *Western blot*. Se evaluaron los niveles proteicos de eIF2 α (forma fosforilada: CST #3597 y niveles totales: CST #2103), GCN2 (forma fosforilada: Abcam plc #ab75836 y niveles totales: CST #3302), LC3 (CST #3868), p62 (CST #5114) y Sesn2 (Abcam plc #ab178518); y como control de carga se utilizaron GAPDH (Proteintech #60004-1-Ig) e Histona H3 (Abcam plc #ab1791). Se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes (SDS-PAGE) y las proteínas separadas fueron transferidas en húmedo hacia una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF). Luego, las membranas se incubaron con las soluciones de bloqueo, luego anticuerpo primario y finalmente anticuerpo secundario (Invitrogen® #31462, #32230), realizando los lavados correspondientes. Posteriormente, las membranas se incubaron con una solución de revelado (TFS #32106, #34075, #34095), y luego se revelaron en un equipo generador de imágenes ChemiDoc (BIO-RAD® ChemiDoc Imaging System with Image Lab Touch Software, medición de quimioluminiscencia). La intensidad de las bandas obtenidas se cuantificó utilizando los programas Fiji⁴⁵ e Image Lab (Image Lab 6.1, © 2020, Bio-Rad Laboratories, Inc.). Los datos generados se procesaron mediante el programa GraphPad Prism⁴⁴.

4.6.- Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism⁴⁴. En todos los grupos de datos se aplicó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Para los conjuntos de datos que presentaron una distribución normal, se aplicó el Test de t de dos colas con la corrección de Welch. Para los conjuntos de datos que no tenían una distribución normal, se aplicó la prueba de Mann-Whitney de dos colas. Todos los análisis se realizaron considerando un intervalo de confianza del 95%.

5.- Resultados

Para el desarrollo de la presente Memoria de Título, y con el objetivo de determinar si la activación de la autofagia forma parte del mecanismo adaptativo promovido por la activación de la GCN2 específicamente en el sistema nervioso central de ratones, se diseñó una estrategia experimental que consistió en promover la activación de la quinasa GCN2 a través de la entrega de una dieta de contenido reducido en proteínas a un grupo de ratones control (WT) y a un grupo de animales que son deficientes en el exón que codifica para el dominio quinasa de la GCN2 (GCN2KO). Específicamente, se utilizó una dieta baja en proteínas (DBP, 5 %p/p proteínas), y como control, se entregó a los animales una dieta que contiene un 20 %p/p de proteínas (dieta control, DC). Inicialmente, todos los animales (ratones adultos macho y hembra) fueron alimentados con la DC durante dos semanas, para habituarlos al nuevo alimento. Luego, los animales fueron sometidos a las dietas experimentales (DC y DBP) durante seis semanas. Posteriormente, se determinó que la corteza motora y el hipotálamo serían los tejidos diana del sistema nervioso central para el análisis de los efectos de la DBP en la autofagia y su dependencia de la GCN2. La selección de la corteza motora se basó en los interesantes resultados obtenidos en la prueba motora en los grupos con DBP, mientras que el hipotálamo se seleccionó debido a su función reguladora de los niveles de aminoácidos y del metabolismo en general^{35,38,46}, por lo que representaba un región relevante a estudiar en respuesta a una estrategia dietaria con niveles reducidos de aminoácidos. Se realizaron análisis bioquímicos de la corteza motora y del hipotálamo de los animales, para evaluar el marcador característico de la activación de la GCN2 y marcadores de autofagia, con el objetivo de determinar la contribución de la quinasa GCN2 en la autofagia mediante la comparación de los resultados de los animales sometidos a la DC y a la DBP, en los grupos WT y GCN2KO.

5.1.- Caracterización de los efectos de la dieta baja en proteínas en indicadores del metabolismo y la función motora de los animales, y la relevancia de la GCN2 en los efectos observados.

Durante el tratamiento dietario, se realizaron mediciones periódicas de glicemia y peso corporal, de modo de monitorear el estado general de los animales. Además, se realizó una prueba motora en la última semana de administración de dietas, como parte de este seguimiento.

5.1.1.- Caracterización de los efectos de la dieta baja en proteínas en el peso corporal, la glicemia y la función motora de ratones hembra, y su dependencia de la GCN2.

Con respecto al peso corporal de las hembras WT, no se observaron diferencias entre los animales alimentados con la DC y la DBP a lo largo del periodo de administración de las dietas (Figura 3A). Cabe mencionar que se encontró una diferencia en el peso corporal entre estos grupos únicamente en la semana en que se inició la administración de las dietas experimentales: las hembras WT que recibirían la DBP tenían mayor peso corporal en comparación con el grupo que recibiría la DC ($21,7 \pm 0,4$ g y $20,7 \pm 0,5$ g, respectivamente). Esta medición del peso corporal se realizó cuando los animales aún no comenzaban a consumir las dietas experimentales (DC y DBP), por lo cual esta diferencia no es atribuible a la composición proteica de las dietas. Interesantemente, las mediciones de la ingesta de alimento durante el tratamiento mostraron que las hembras WT alimentadas con la DBP comían más que las alimentadas con la DC (Figura S1A, Anexo), no obstante, el peso corporal promedio se mantuvo estable durante las seis semanas de dietas experimentales, y en valores similares al peso corporal del grupo alimentado con la DC (Figura 3A). Tras cinco semanas de tratamiento, se observó que las hembras WT alimentadas con la DC aumentaron, de manera leve pero significativa, su peso corporal con respecto a su peso inicial (en la semana cero, Figura S3D), mientras que las hembras WT sometidas a la DBP en la última semana de tratamiento tenían un peso corporal comparable al inicio de las dietas experimentales (Figura S3E).

Por otro lado, respecto a las hembras GCN2KO, se observó que el peso corporal promedio del grupo alimentado con la DC se mantuvo estable durante el tratamiento, mientras que, a partir de la primera semana de dieta, el grupo alimentado con la DBP disminuyó progresivamente su peso corporal (Figuras 3B y S3G). Luego de cinco semanas de dietas experimentales, las hembras GCN2KO alimentadas con la DBP presentaron un peso corporal promedio un 18% menor al del grupo alimentado con la DC (DC $22,4 \pm 0,9$ g, DBP $18,4 \pm 1,3$ g). Cabe mencionar que se hizo el seguimiento de la ingesta de alimento durante el tratamiento, y no se observaron cambios en la ingesta del grupo alimentado con la DBP tal que pudieran explicar esta disminución en el peso corporal (Figura S1B).

Por otra parte, al evaluar el efecto del genotipo en la respuesta a las dietas experimentales, se observó que las hembras GCN2KO alimentadas con la DC tuvieron un peso corporal mayor que las hembras WT alimentadas con la misma dieta, diferencia que se presentó en la mayoría de las mediciones realizadas durante el tratamiento (Figura S3B). En cuanto a los grupos de hembras alimentadas con la DBP, se observó que las hembras

WT y GCN2KO tenían un peso corporal similar antes de comenzar a consumir la DBP. A partir de la semana 1, las hembras GCN2KO alimentadas con la DBP mostraron una reducción sostenida del peso corporal (Figura S3C), mientras que las hembras WT alimentadas con la misma dieta, no mostraron cambios entre el inicio y el término del experimento (Figuras S3C y E), reflejando el efecto diferencial de la DBP en el peso corporal de las hembras WT y GCN2KO (Figura 3C).

Por lo tanto, a partir de los resultados obtenidos para el peso corporal de las hembras WT y GCN2KO, es posible concluir que la quinasa GCN2 ejerce un rol fundamental en la mantención del peso corporal ante una disminución del contenido proteico en la dieta, específicamente en hembras.

Otro parámetro monitoreado como indicador del bienestar de los animales durante el tratamiento dietario fue la glicemia. En cuanto a las hembras WT, se observó que no hubo un efecto de la DBP en la glicemia, dado que los grupos alimentados con DC y con DBP mostraron niveles similares de glicemia a lo largo del tratamiento (Figura 3D). En cambio, en las hembras GCN2KO se observó una disminución transitoria de la glicemia asociada al tratamiento dietario: en la cuarta semana de dietas experimentales, las hembras GCN2KO alimentadas con la DBP presentaron niveles de glicemia disminuidos en un 35% con respecto al grupo control (138 ± 15 mg/dL en promedio, versus una glicemia promedio de 91 ± 9 mg/dL del grupo alimentado con DC). Esta diferencia no se mantuvo en la sexta semana de dietas (Figura 3D). Cabe mencionar que en la medición de glicemia de la cuarta semana de tratamiento con la DC y la DBP, se detectó que, por un lado, la glicemia de las hembras GCN2KO alimentadas con la DC aumentó con respecto a la medición anterior (primera semana de dieta, Figura S5C), y por otro lado, la glicemia de las hembras GCN2KO alimentadas con la DBP disminuyó progresivamente desde la medición en condiciones basales (realizada durante la semana -2, Figura S5D). Estos fenómenos en conjunto resultaron en la diferencia detectada en la glicemia entre los grupos de hembras GCN2KO en la cuarta semana de dieta. Para la sexta semana de tratamiento, se revirtieron estas tendencias: el promedio de la glicemia del grupo alimentado con la DC disminuyó levemente respecto a la medición anterior, mientras que la glicemia del grupo alimentado con la DBP presentó un discreto aumento en el mismo periodo (Figura S5 C y D). De este modo, a pesar de que visualmente se perciben diferencias en el gráfico en la glicemia de los grupos de hembras GCN2KO alimentadas con DC y DBP en la sexta semana de dieta (Figura 3D), no se observaron diferencias en la comparación estadística entre la glicemia promedio de los grupos de hembras GCN2KO en la última semana de dietas experimentales. En

resumen, a partir de los niveles de glicemia observados en las hembras durante el tratamiento es posible concluir que, en términos generales, la DBP no tiene un efecto en la glicemia de las hembras. Además, los resultados indican que la quinasa GCN2 es necesaria para la mantención de la glicemia ante una disminución del contenido proteico en la dieta.

Por otro lado, además de las mediciones periódicas de peso corporal y glicemia como parte del monitoreo de los animales durante el tratamiento, en la sexta y última semana de dietas experimentales se examinó la capacidad motora mediante la prueba de “*Rotarod*”, la cual evalúa la coordinación motora, resistencia y fuerza muscular de los animales^{47,48}. En esta prueba, los animales son desafiados a caminar sobre un cilindro giratorio y se registra el tiempo que tardan en caer del cilindro, denominado “latencia”. La latencia es, por lo tanto, un indicador de la capacidad motora (mayores valores de latencia indican una mejor función motora)⁴⁷. En el contexto de esta Memoria de Título, examinar la función motora de los animales sometidos al tratamiento dietario contribuye a la evaluación del estado general de los animales y a la caracterización de los efectos de las dietas administradas.

A partir de los ensayos motores realizados durante la última semana de administración de dietas, se observó tanto para las hembras WT como para las hembras GCN2KO que no hubo un efecto en el desempeño motor asociado a la dieta consumida (no se encontraron diferencias entre los animales alimentados con la DC y con la DBP, Figura 3E). Sin embargo, se observó que la ausencia de la quinasa GCN2 funcional en hembras conlleva un deterioro del desempeño motor respecto de las hembras que poseen la quinasa funcional (disminución del 13% en la latencia), en condiciones basales, de acuerdo a la comparación de la latencia de las hembras WT alimentadas con la DC y de las hembras GCN2KO sometidas a la misma dieta (WT DC 47 ± 10 s, GCN2KO DC 36 ± 9 s, Figura 3E). Por lo tanto, se concluye que la disminución del contenido proteico de la dieta no tiene consecuencias en el desempeño motor de las hembras, y que la quinasa GCN2 está involucrada en la función motora en condiciones basales.

En conclusión, los resultados indican que en las hembras la quinasa GCN2 es esencial para la mantención del peso corporal y la glicemia en condiciones de una ingesta proteica disminuida durante seis semanas y, además, cumple un papel importante en el control de la función motora basal.

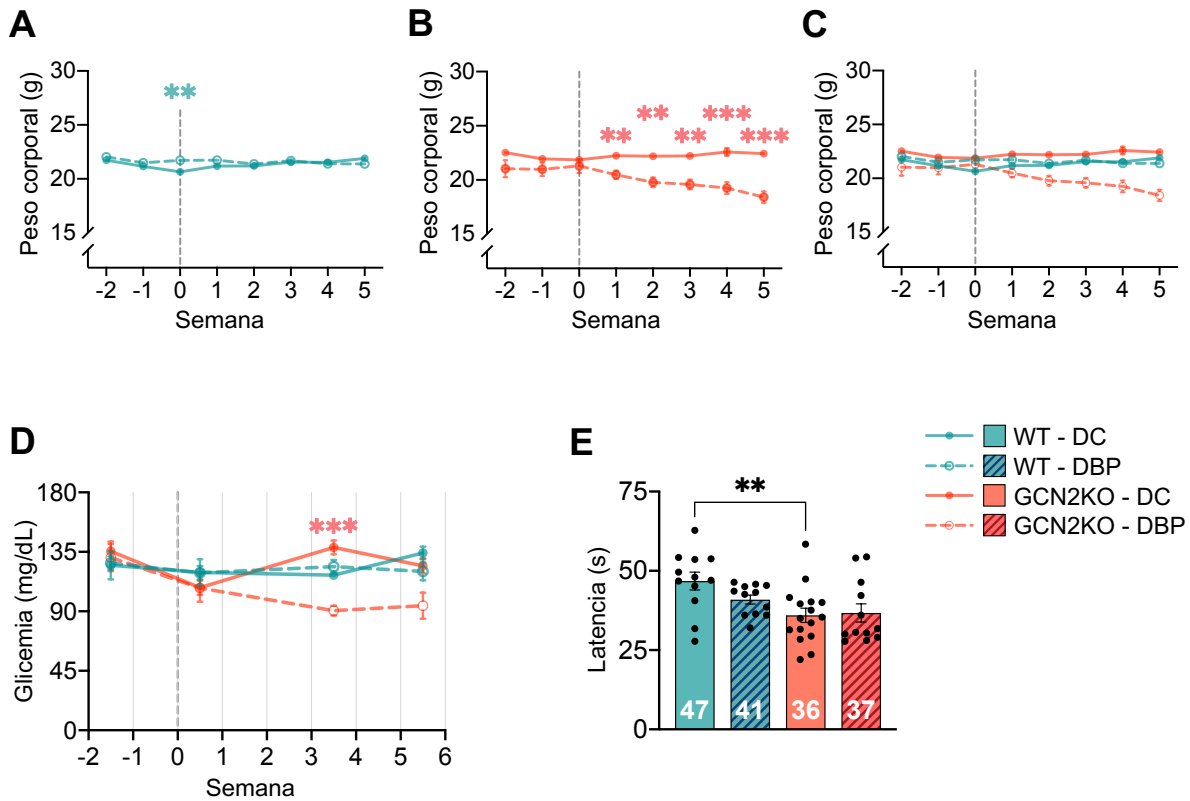


Figura 3. Evaluación de parámetros metabólicos y función motora de las hembras sometidas a la dieta baja en proteínas. Animales silvestres (WT) y deficientes en el gen codificante para la quinasa GCN2 (GCN2KO) fueron alimentados durante seis semanas con una dieta control (DC) y una dieta baja en proteínas (DBP). Durante este periodo se realizaron mediciones periódicas de peso corporal y glicemia en las semanas (S) indicadas. Los animales fueron alimentados con la DC por dos semanas (indicadas como S -2 y -1) para su habituación. La semana cero corresponde al tiempo en que se inició el tratamiento con la DC y la DBP (indicada con una línea gris discontinua). **A**) Peso corporal de las hembras WT sometidas a la DC (n=6) y a la DBP (n=6). **B**) Peso corporal de las hembras GCN2KO sometidas a la DC (n=8) y a la DBP (S -2 n=3, S -1 a S 5 n=6). **C**) Peso corporal de las hembras WT y GCN2KO graficado en conjunto (sin indicar la significancia estadística de las comparaciones por dieta consumida). Las comparaciones del peso inicial (S 0) y final (S 5) para cada grupo se muestran en la Figura S3. **D**) Glicemia de las hembras WT y GCN2KO, medida previo al inicio del tratamiento (S -2) y durante la primera, cuarta y sexta semana. La medición de glicemia en la semana 1 se realizó tras dos días con las dietas. Previo a las mediciones de la glicemia los animales se sometieron a un ayuno de seis horas. WT DC n=5, DBP n=6; GCN2KO DC n=8, DBP n=3 en S -2 y n=6 en el resto de las mediciones. Las comparaciones de la glicemia por genotipo y por semana se muestran en la Figura S5. **E**) La función motora de las hembras WT y GCN2KO fue evaluada dos veces al día por cinco días consecutivos mediante la prueba de *Rotarod*, durante la última semana de administración de las dietas. Se graficó el promedio de la latencia obtenida en los cinco días de prueba para cada animal, separando las dos mediciones diarias. El valor de la media grupal se indica en blanco en la base de cada barra. WT DC n=12, DBP n=12; GCN2KO DC n=16, DBP n=12. Para todos los resultados se graficó la media \pm el error estándar. Se analizó el efecto de la dieta para los grupos WT y GCN2KO, salvo en **E** (se analizó el efecto del genotipo y de la dieta). Se aplicó el Test de t de Welch para todos los análisis, excepto para el peso corporal de las hembras WT en la S 2, peso corporal de las hembras GCN2KO en S 4, glicemia de hembras WT en S 4 y glicemia de hembras GCN2KO en S1, S4 y S6 (prueba de Mann-Whitney). ** p<0,01, *** p<0,001.

5.1.2.- Caracterización de los efectos de la dieta baja en proteínas en el peso corporal, la glicemia y la función motora de ratones macho, y su dependencia de la GCN2.

En el grupo de machos sometidos a las dietas experimentales también se realizaron mediciones de glicemia, peso corporal y función motora con el objetivo de monitorear el estado general de los animales. Los resultados obtenidos a partir de las mediciones de peso corporal realizadas semanalmente en el grupo de los machos mostraron que, en el caso de los machos WT, el peso corporal disminuyó progresivamente a lo largo del tratamiento dietario en el grupo sometido a la DBP en comparación con el peso corporal del grupo de machos WT alimentados con la DC, y esta disminución se observó desde la primera semana (Figura 4A). Tras cinco semanas de dietas experimentales, el peso corporal promedio del grupo de machos WT sometido a la DBP fue un 19% menor que el peso corporal promedio del grupo control. Por otro lado, en el grupo de los machos GCN2KO se observó, al igual que en el grupo de machos WT, una disminución progresiva del peso corporal en los animales sometidos a la DBP en comparación al grupo control: esta diferencia se percibió a partir de la primera semana de tratamiento, y tras cinco semanas completas consumiendo las dietas experimentales el grupo alimentado con la DBP presentó un peso corporal disminuido en un 23% con respecto al grupo alimentado con la DC (Figura 4B). Cabe mencionar que se monitoreó la ingesta de alimento durante el tratamiento dietario tanto para los machos WT como GCN2KO y no se observaron diferencias en la ingesta en ninguno de los grupos de machos alimentados con la DC y la DBP (Figura S2). Estos últimos resultados permiten concluir que la disminución progresiva del peso corporal observada en los machos sometidos a la DBP no es atribuible a un cambio en la cantidad de alimento consumido.

Por otro lado, al evaluar el efecto del genotipo en la respuesta a la dieta consumida, se observó que, inicialmente, los machos GCN2KO tenían un peso corporal menor respecto de los machos WT (Figura S4, B y C). Luego de tres semanas de dieta control (medición en la semana 1), no se observaron diferencias en el peso corporal entre los machos WT y GCN2KO (Figura S4B). Es decir, la diferencia en el peso corporal de los machos WT y GCN2KO que tenían con la dieta que entrega el Bioterio de la Fundación Ciencia & Vida, se suprimió al alimentar a los animales con la DC. Lo mismo ocurrió en los machos alimentados con la DBP: inicialmente, los machos GCN2KO tenían un peso corporal menor que los machos WT (Figura S4C), y esta diferencia se suprimió al alimentar a los animales con la DC por dos semanas. Luego, los machos GCN2KO comenzaron a bajar de peso, como consecuencia del consumo de una menor cantidad de proteínas. Sin embargo, si bien

tanto los machos WT como los GCN2KO bajaron de peso con la DBP, la pérdida de peso corporal producto de la DBP fue más severa en el grupo GCN2KO en comparación con el grupo WT (Figura 4C y S4C). Esto se hace evidente en el hecho que los animales WT y GCN2KO tenían un peso similar cuando empezaron a alimentarse de la DBP y, a partir de la segunda semana de consumo de la DBP, los animales GCN2KO mostraron un peso corporal promedio reducido con respecto a los machos WT sometidos a la misma dieta.

Por lo tanto, en base a todos los resultados del peso corporal estudiado en los machos, se concluye que la disminución del contenido proteico en la dieta genera un cambio metabólico en los machos, que induce una disminución progresiva del peso corporal, a través de un mecanismo independiente de la quinasa GCN2.

Con respecto a los resultados de las mediciones de glicemia realizadas en los machos, estos mostraron que la DBP tuvo un impacto transitorio en la glicemia en el grupo WT. Tras dos días con dietas experimentales, la glicemia promedio del grupo WT alimentado con la DBP fue un 25% menor que el grupo control (109 ± 12 mg/dL y 145 ± 24 mg/dL, respectivamente, Figura 4D). Esta disminución de la glicemia se mantuvo en la primera y cuarta semana de tratamiento, pero en la sexta semana no se observaron diferencias entre los grupos alimentados con la DBP y la dieta control (Figura 4D). En cambio, en los machos GCN2KO no se observaron diferencias en la glicemia en ninguna de las mediciones realizadas durante el tratamiento dietario, independiente de la dieta entregada (Figura 4D y S6). A partir de los resultados, se concluye que en ratones macho la reducción del contenido proteico en la dieta disminuye transitoriamente la glicemia en forma GCN2-dependiente.

Finalmente, en cuanto al desempeño motor de los machos, se observó que en el grupo WT, los animales alimentados con la DBP tuvieron en promedio un mejor desempeño en la prueba de *Rotarod* que el grupo alimentado con la dieta control: la latencia en la prueba del grupo alimentado con la DBP fue un 38% mayor que la del grupo control (35 ± 9 s en el grupo DC y 49 ± 9 s en el grupo DPB; Figura 4E, barras verdes lisa y rayada). En cambio, en el grupo de machos GCN2KO no se observaron diferencias en la latencia (Figura 4E, barras naranjas lisa y rayada). Por lo tanto, la disminución de la composición proteica de la dieta mejora el desempeño motor de los machos a través de un mecanismo mediado por la quinasa GCN2.

En conclusión, en ratones macho, la disminución del contenido proteico en la dieta produce una disminución en el peso corporal que es independiente de la GCN2, y promueve una disminución transitoria en la glicemia y una mejora en la función motora en forma GCN2-dependiente.

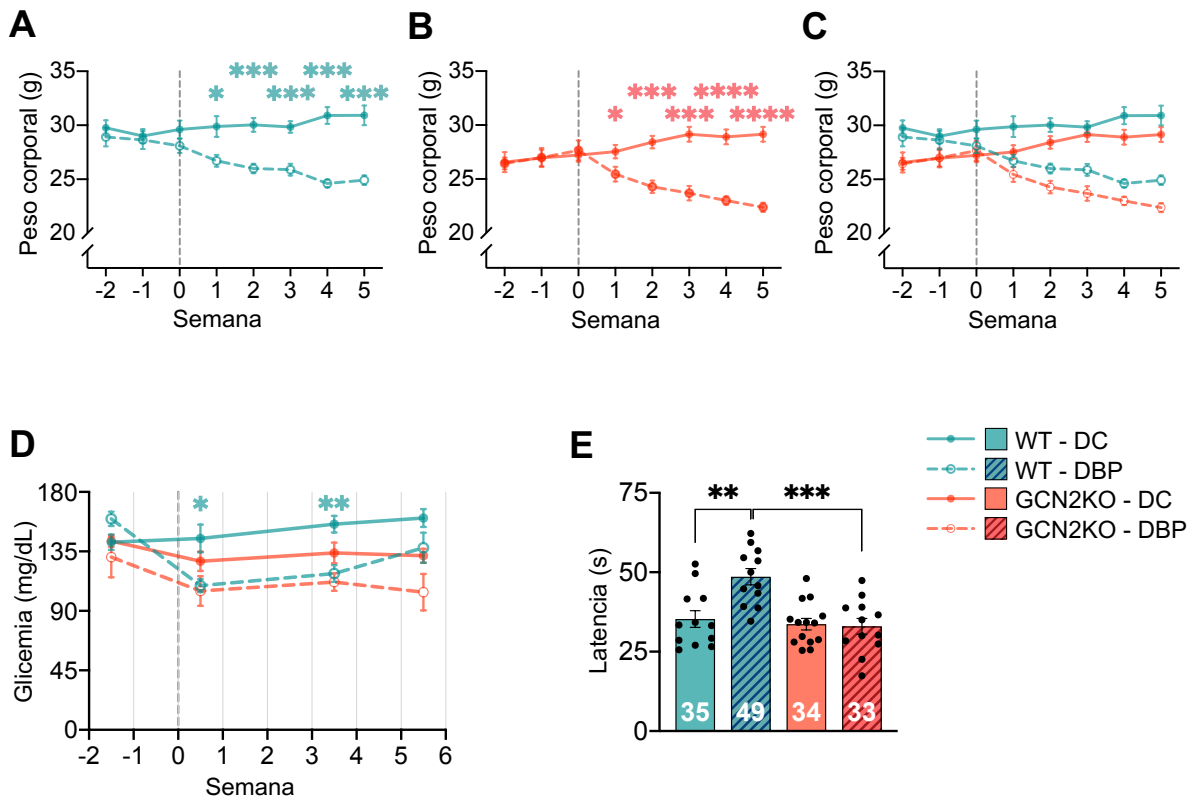


Figura 4. Evaluación de parámetros metabólicos y función motora de los machos sometidos a la dieta baja en proteínas. Animales silvestres (WT) y deficientes en el gen codificante para la quinasa GCN2 (GCN2KO) fueron alimentados durante seis semanas con una dieta control (DC) y una dieta baja en proteínas (DBP). Durante este periodo se realizaron mediciones periódicas de peso corporal y glicemia en las semanas (S) indicadas. Los animales fueron alimentados con la DC por dos semanas (indicadas como S -2 y -1) para su habituación. La semana cero corresponde al tiempo en que se inició el tratamiento con DC y DBP (indicada con una línea gris discontinua). **A**) Peso corporal de los machos WT sometidos a la DC (n=6) y a la DBP (n=6). **B**) Peso corporal de los machos GCN2KO sometidos a la DC (n=7) y a la DBP (S -2 n=4, S -1 a S 5 n=6). **C**) Peso corporal de los machos WT y GCN2KO graficado en conjunto (sin indicar la significancia estadística de las comparaciones por dieta consumida). Las comparaciones del peso corporal inicial (S 0) y final (S 5) para cada grupo se muestran en la Figura S4. **D**) Glicemia de los machos WT y GCN2KO, medida previo al inicio del tratamiento (S -2) y durante la primera, cuarta y sexta semana. La medición de glicemia en la semana 1 se realizó tras dos días con las dietas. Previo a las mediciones de la glicemia los animales se sometieron a un ayuno de seis horas. WT DC n=5, DBP n=6; GCN2KO DC n=7, DBP n=4 en S -2 y n=6 en el resto de las mediciones. Las comparaciones de la glicemia por genotipo y por semana se muestran en Figura S6. **E**) La función motora de los machos WT y GCN2KO fue evaluada dos veces al día por cinco días consecutivos mediante la prueba de *Rotarod*, durante la última semana de administración de las dietas. Se graficó el promedio de la latencia obtenida en los cinco días de prueba para cada animal, separando las dos mediciones diarias. El valor de la media grupal se indica en blanco en la base de cada barra. WT DC n=12, DBP n=12; GCN2KO DC n=14, DBP n=12. Para todos los resultados se graficó la media \pm el error estándar. Se analizó el efecto de la dieta para los grupos WT y GCN2KO, salvo en **E** (se analizó el efecto del genotipo y de la dieta). Se aplicó el Test de t de Welch para todos los análisis, excepto para las comparaciones de la glicemia de los machos WT en la S 4, y la glicemia de los machos GCN2KO en la S -2 y la S 4 (prueba de Mann-Whitney). * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001.

De acuerdo a los resultados obtenidos para los parámetros metabólicos y motor, evaluados ante la administración de la DBP en machos y en hembras, se distingue claramente un efecto diferencial sexo-dependiente. Resulta sumamente interesante que el mismo estímulo, es decir, la disminución del contenido proteico en la dieta, tenga efectos completamente distintos en los parámetros evaluados dependiendo del sexo del animal. Por ejemplo, ante una DBP, las hembras mantienen el peso corporal, y esta estabilidad depende de la GCN2. En contraste, los machos muestran una pérdida sostenida del peso corporal, que no está controlada por la GCN2. Por otra parte, en respuesta a la DBP, los machos muestran una disminución transitoria de la glicemia controlada por la GCN2, mientras que las hembras mantienen la glicemia también regulada por la quinasa GCN2. Otro ejemplo del efecto diferencial de la DBP según el sexo se observa en el desempeño motor: la DBP mejora el desempeño motor en machos, de manera dependiente de la GCN2, mientras que en las hembras, la DBP no afecta la función motora, aunque la GCN2 está involucrada en el control de la función motora basal. Por lo tanto, considerar ambos sexos en el diseño experimental permitió caracterizar con precisión los efectos de la administración de la DBP durante seis semanas y determinar la relevancia de la GCN2 en los efectos observados.

5.2.- Evaluación de la contribución de la GCN2 en las consecuencias de la disminución del contenido proteico de la dieta en la activación de la ISR y la autofagia evaluadas en la corteza motora de ratones.

La corteza motora es la región del cerebro que interviene en el control de los movimientos voluntarios, otorgando precisión a los movimientos⁴⁹. En esta investigación se evaluó la función motora de los grupos de animales sometidos a la DBP durante seis semanas, y se obtuvieron diferencias entre los animales WT y GCN2KO; en machos, en respuesta a la disminución del contenido proteico dietario, y en hembras, en condiciones basales. Estos resultados fueron inesperados, y denotan un interesante rol de la GCN2 en el control de la función motora, con diferencias entre machos y hembras. Por lo tanto, resultó llamativo analizar la corteza motora de los cuatro grupos experimentales, para evaluar la activación de la GCN2 en esta región del cerebro, encargada de refinar los movimientos voluntarios.

Para determinar el estado de activación de la GCN2, se prepararon extractos proteicos de la corteza motora de los animales de los cuatro grupos experimentales, y se evaluaron los niveles de fosforilación de eIF2 α , elemento integrador de la ISR, cuya fosforilación es un evento característico tras la activación de la GCN2. También se evaluaron los niveles de la forma fosforilada y el total de eIF2 α por separado, para complementar los resultados, y así evaluar el efecto general que tiene la DBP sobre el centro integrador de la ISR. No fue posible evaluar los niveles de fosforilación de la GCN2, indicativos de su activación, porque los anticuerpos disponibles funcionan de manera eficiente en la detección de la forma fosforilada de la GCN2 en extractos de cultivos celulares y no así en extractos de tejido. Sin embargo, se evaluaron los niveles de la GCN2 en los grupos alimentados con la DC y la DBP, para conocer el efecto que podría tener la DBP sobre la abundancia de la quinasa. Esta decisión se tomó en base a resultados de experimentos previos obtenidos en el Laboratorio de Biología de la Neurodegeneración, donde se observó que en una línea celular de neuroblastoma de ratón (N2a) tratada con estímulos activadores de la GCN2 (como la deficiencia de leucina, la deficiencia de metionina y cisteína, y la deficiencia total de aminoácidos), no solo se produce la activación de la GCN2 (evaluada a través de los niveles de fosforilación de la quinasa), sino también una disminución en los niveles totales de la proteína GCN2, sugiriendo una posible degradación tras su activación (resultados no publicados). Por otro lado, Wei y cols.⁵⁰ demostraron, en líneas celulares humanas de cáncer de pulmón, que la GCN2 es degradada basalmente mediante el sistema ubiquitina-proteosoma y que, tras la activación de la GCN2, inducida por un estímulo apoptótico, se producía tanto su fosforilación como su degradación. Por lo tanto, una disminución en los niveles totales de GCN2 podría reflejar este mecanismo de degradación de la GCN2 promovido por la activación de la quinasa, tal como se ha observado en líneas celulares.

5.2.1.- Evaluación de la contribución de la GCN2 en las consecuencias de la disminución del contenido proteico de la dieta en la activación de la ISR y la autofagia en la corteza motora de ratones hembra.

Para evaluar la activación de la GCN2 en respuesta a la DBP en el grupo de hembras, en primer lugar se realizaron ensayos de *Western blot* utilizando extractos proteicos de corteza motora de las hembras WT alimentadas con la DC y con la DBP. Se detectó eIF2 α total y fosforilado, y también la GCN2. Los resultados mostraron que no hubo

diferencias en los niveles de fosforilación de eIF2 α en los extractos de los animales alimentados con la DBP, evaluados a través de la proporción de la forma fosforilada (p-eIF2 α) con respecto a los niveles totales de eIF2 α (p-eIF2 α /eIF2 α , Figura 5A). Tampoco se observaron diferencias en los niveles de la forma fosforilada y total de eIF2 α normalizadas cada una respecto al control de carga, en este caso, la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, Figura 5A). Además, en cuanto a los niveles proteicos totales de la GCN2, no se encontraron diferencias entre las muestras de corteza motora de hembras WT alimentadas con la DC y la DBP (Figura 5A). Estos resultados sugieren que, después de seis semanas de administración de la DBP, no hay activación de la ISR ni modulación de los niveles de la GCN2 en la corteza motora de ratones hembra.

Posteriormente, se realizaron ensayos de *Western blot* para evaluar el efecto de la DBP en la autofagia en la corteza motora de las hembras WT. Se detectaron marcadores que dan cuenta del estado de este proceso degradativo. Para esto, se utilizaron tres marcadores de autofagia: LC3, en sus formas LC3-I y LC3-II, el receptor de autofagia p62, y Sestrina 2 (Sesn2). Respecto a LC3, la forma LC3-II corresponde a la forma activa de esta proteína, la cual participa en la elongación de la membrana del fagóforo, y es fundamental para la progresión de la autofagia²². De este modo, los niveles proteicos relativos de LC3-II se utilizan para la evaluación del estado del proceso degradativo^{51,52}. Además, la proporción de LC3-II con respecto al total de LC3 (LC3-II / LC3-I+II) también entrega información del estado de la autofagia y es utilizado como marcador del proceso⁵², dando cuenta de la conversión de LC3-I a LC3-II. Por otro lado, el receptor de autofagia p62, que asiste en la localización de algunos elementos destinados a degradación al interior del autofagosoma, es susceptible de degradación autofágica⁵¹. Por esto, la disminución de los niveles proteicos de p62 es considerada un indicador de los niveles de autofagia. Finalmente, Sesn2 es una proteína que regula la autofagia a través de la inhibición del complejo mTORC1, el cual ejerce un control inhibitorio sobre la autofagia ante niveles suficientes de aminoácidos^{29,30}. Además, se ha descrito que la transcripción del gen codificante para Sesn2 es promovida por la activación de la GCN2, lo que genera un aumento en los niveles proteicos de Sesn2^{29,53}. Así, un aumento en los niveles proteicos de Sesn2 puede interpretarse como una mayor capacidad de inhibición del mecanismo inhibitorio de la autofagia ejercido por mTORC1 y, por consiguiente, mayores niveles de autofagia. De este modo, el uso de estos marcadores en conjunto permite una apreciación integral del estado de la autofagia.

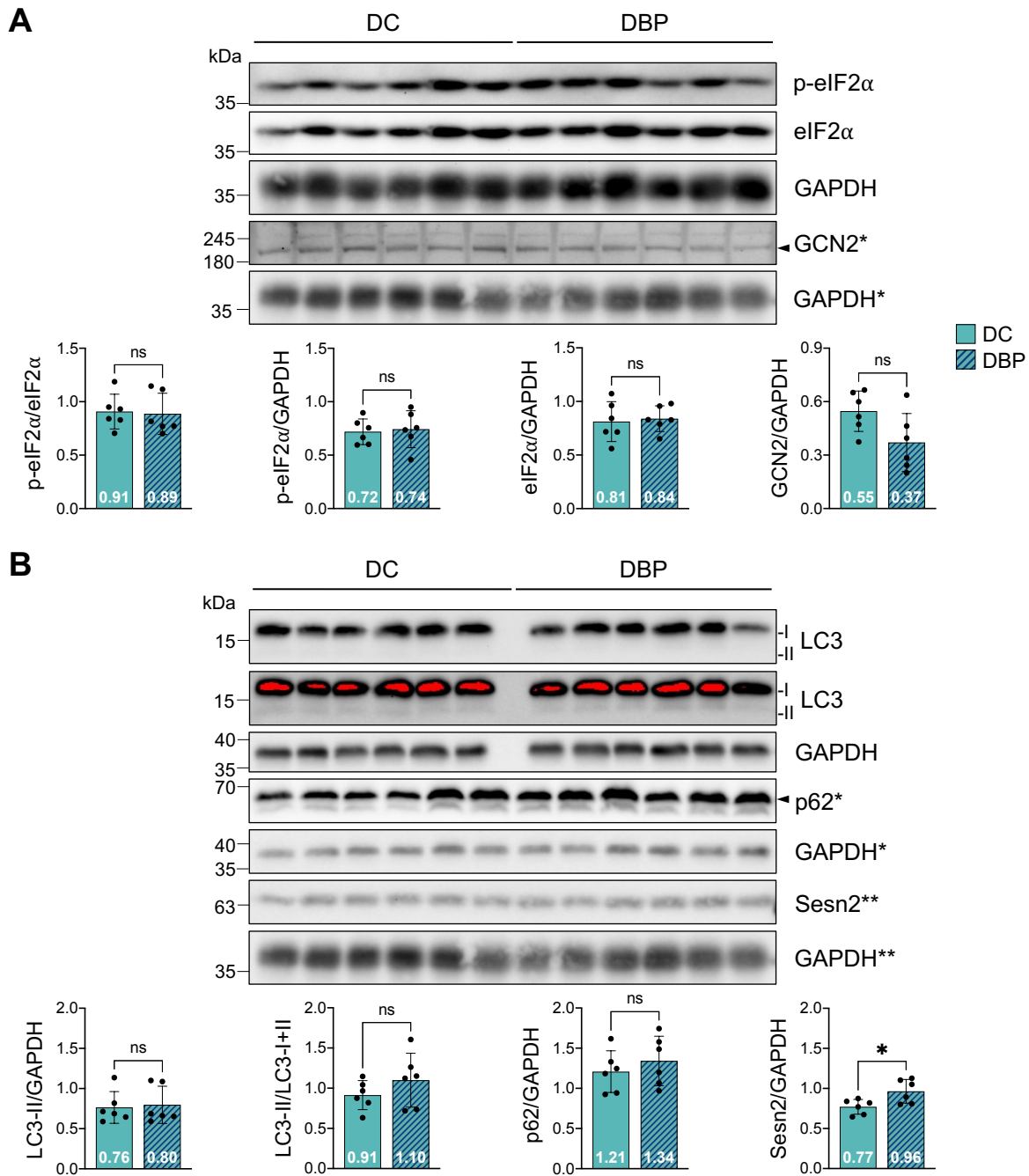


Figura 5. Análisis de la activación de la ISR y la autofagia en la corteza motora de hembras WT sometidas a la dieta baja en proteínas. Hembras WT fueron alimentadas por seis semanas con la dieta control (DC, n=6) y baja en proteínas (DBP, n=6). Se aisló la corteza motora de cada animal y el tejido fue procesado para ensayos de *Western blot*. Se cuantificó la intensidad de pixel de las bandas, y se normalizó con las proteínas indicadas en cada gráfico. **A**) Se evaluó la activación de la ISR mediante la detección de la forma fosforilada de eIF2 α (p-eIF2 α) y de la GCN2 (panel superior), y se determinaron sus niveles relativos (panel inferior). **B**) Se evaluó el estado de la autofagia mediante la detección de LC3 (formas I y II), p62 y Sestrina 2 (Sesn2) (panel superior), y se evaluaron sus niveles (panel inferior). Se muestran imágenes con tiempos de exposición diferentes para la detección de LC3. Asteriscos: indican proteínas detectadas en una misma membrana. Puntas de flecha: indican la señal específica del anticuerpo. En rojo: pixeles con señal saturada. Se muestra la media \pm desv. std. El valor de la media se indica en blanco en cada barra. * $p < 0,05$, ns: no significativo. Test de t de Welch, excepto LC3-II/GAPDH (Mann-Whitney).

En cuanto a los marcadores de autofagia evaluados en extractos proteicos de corteza motora de las hembras WT, no se encontraron diferencias en los niveles proteicos detectados de LC3-II entre los animales alimentados con la DC y la DBP (Figura 5B). Tampoco hubo diferencias en la proporción de LC3-II respecto del total de LC3 (Figura 5B). Cabe mencionar que la banda correspondiente a LC3-II resultó de muy baja intensidad, y se requirió aumentar el tiempo de exposición de la membrana para su visualización. Esta mayor exposición de la membrana generó una imagen saturada de la señal de la forma LC3-I, que es más abundante que LC3-II (Figura 5B). Con esta estrategia, se obtuvo una señal tenue para LC3-II. No obstante, fue posible cuantificar la intensidad de pixel para cada banda de LC3-II y no se encontraron diferencias en los niveles relativos de este marcador clásico de la autofagia entre las muestras provenientes de animales alimentados con la DC y la DBP (Figura 5B). Por otro lado, respecto del receptor de autofagia p62, tampoco se observaron diferencias entre ambos grupos de animales (Figura 5B). Estos resultados sugieren que la dieta baja en proteínas no tiene un impacto en la autofagia en la corteza motora de hembras WT, en las condiciones de este experimento. En cuanto a Sesn2, proteína que interviene en el control de la autofagia, se observó que sus niveles en las muestras provenientes del grupo alimentado con la DBP fueron un 25% mayor en comparación con el grupo alimentado con la DC (Figura 5B). Aunque se ha descrito un aumento de los niveles proteicos de Sesn2 tras la activación de la GCN2, los niveles de fosforilación de eIF2 α indican que la GCN2 no se encuentra activa en este contexto. Además, estos mayores niveles de Sesn2 en la corteza motora de hembras WT sometidas a la DBP no estarían relacionados con cambios en la autofagia, de acuerdo a los resultados obtenidos para LC3 y p62. Por lo tanto, en este caso, Sesn2 no estaría involucrada en el control de la autofagia, y el aumento observado no responde a la activación de la GCN2. En conclusión, los resultados obtenidos sugieren que la dieta baja en proteínas no tiene un efecto sobre la autofagia específicamente en la corteza motora de hembras WT, bajo las condiciones de este tratamiento.

Luego, con el objetivo de conocer la atribución de la quinasa GCN2 sobre los distintos marcadores evaluados en el grupo de hembras WT, se realizaron los mismos análisis por ensayos de *Western blot* con extractos proteicos de corteza motora de hembras GCN2KO alimentadas con la DC y la DBP. Con respecto a la activación de la ISR, no se observaron cambios asociados a la DBP en la fosforilación de eIF2 α (proporción de proteína fosforilada respecto del total) en este grupo, según se muestra en la Figura 6A. Sin

embargo, al analizar la intensidad de pixel obtenida tras la cuantificación de las bandas de la forma fosforilada y el total de eIF2 α , normalizando con el control de carga, se observó un aumento de un 61% en los niveles de p-eIF2 α y del 21% en los niveles de eIF2 α en el grupo de animales alimentados con la DBP, con respecto a los animales alimentados con la DC (Figura 6A). Estos resultados indican que la mayor cantidad de eIF2 α observada en el grupo alimentado con la DBP está fosforilada, manteniéndose la proporción de fosforilación entre los dos grupos. Cabe mencionar que, si bien la activación de la ISR habitualmente se evalúa mediante los niveles de fosforilación de eIF2 α (que consiste en la modificación post traduccional a través de la cual las quinasas de la ISR ejercen su efecto), los cambios en los niveles de eIF2 α también son informativos respecto del potencial de activación de la respuesta integrada al estrés. Esto se explica a partir de que las variaciones en los niveles de eIF2 α , el componente central en la señalización de la ISR, repercuten en la magnitud del efecto de la activación de esta vía de señalización. En resumen, a partir de los análisis realizados, se concluye que la disminución de la composición proteica de la dieta no afecta el estado de activación de la ISR en la corteza motora de hembras GCN2KO, pero tiene un efecto modulador de los niveles totales de eIF2 α , pudiendo repercutir en el potencial de activación de la vía.

Posteriormente, con el objetivo de evaluar la incumbencia de la GCN2 en los niveles proteicos de los marcadores de autofagia evaluados en la corteza motora de las hembras WT, se realizaron ensayos de *Western blot* para detectar los marcadores de autofagia LC3, p62 y Sesn2 utilizando muestras de corteza motora provenientes de las hembras GCN2KO alimentadas con la DC y la DBP. Al igual que para las hembras WT, en la corteza motora de las hembras GCN2KO no se observaron cambios entre los grupos de animales alimentados con la DC y la DBP en LC3, tanto en los niveles totales de LC3-II como en la proporción de LC3-II con respecto a los niveles totales de LC3 (LC3-II / LC3-I+II, Figura 6B). En el caso de p62, tampoco se presentaron diferencias en los niveles relativos de este receptor entre los grupos alimentados con la DC y la DBP (Figura 6B). Estos resultados sugieren que una menor ingesta de proteínas en la dieta no promueve la autofagia en las condiciones estudiadas. Asimismo, los niveles de Sesn2 tampoco mostraron diferencias según la dieta administrada (Figura 6B). A partir de los resultados obtenidos, es posible concluir que seis semanas de dieta baja en proteínas no afectan los niveles proteicos de marcadores de autofagia en la corteza motora de hembras GCN2KO.

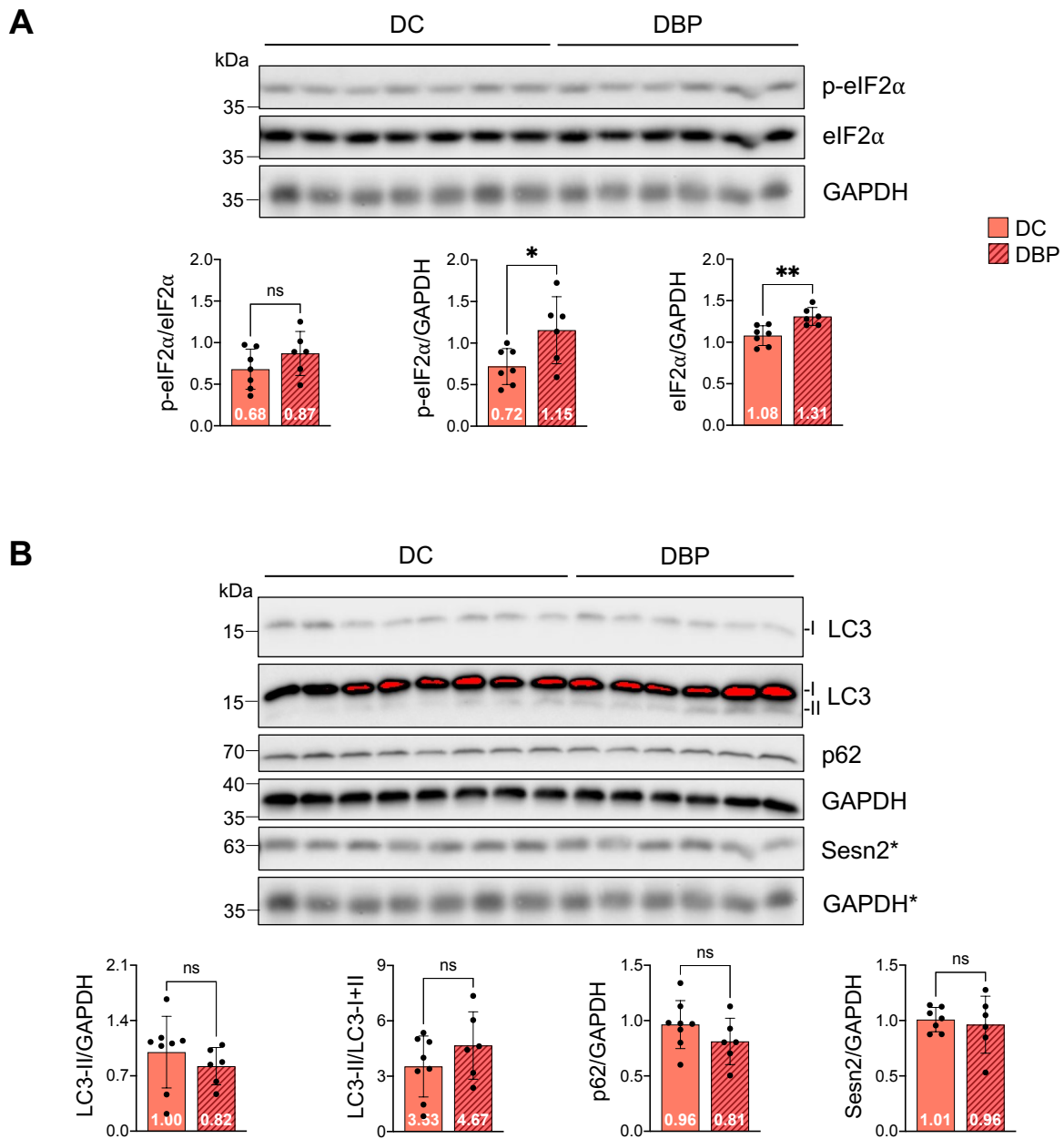


Figura 6. Análisis de la activación de la ISR y la autofagia en la corteza motora de hembras GCN2KO sometidas a la dieta baja en proteínas. Hembras GCN2KO fueron alimentadas por seis semanas con la dieta control (DC, **A** n=7, **B** n=8) y baja en proteínas (DBP, n=6). Para el análisis, se aisló la corteza motora de cada animal y el tejido fue procesado para ensayos de *Western blot*. Se cuantificó la intensidad de pixel de las bandas, y se normalizó con las proteínas indicadas en cada gráfico. **A)** Se evaluó la activación de la ISR a través de la detección de la forma fosforilada de eIF2 α (p-eIF2 α , panel superior), y se determinaron sus niveles relativos (panel inferior). **B)** Se evaluó el estado de la autofagia mediante la detección de LC3 (formas I y II), p62 y Sestrina 2 (Sesn2) (panel superior), y se evaluaron sus niveles relativos (panel inferior). Se muestran imágenes con diferentes tiempos de exposición para la detección de LC3. Los asteriscos indican proteínas detectadas en una misma membrana. En rojo: pixeles con señal saturada. Se muestra la media \pm desv. std. El valor de la media se indica en blanco en cada barra. * p<0,05, ** p<0,01, ns: no significativo. Test de t de Welch.

En resumen, de acuerdo a los análisis de extractos proteicos de animales WT y GCN2KO, se concluye que una menor cantidad de proteínas en la dieta, mantenida durante seis semanas, no impacta el estado de activación de la ISR ni de la autofagia específicamente en la corteza motora de hembras. Además, se infiere que la quinasa GCN2 regula los niveles totales de eIF2 α , manteniéndolos estables en condiciones de ingesta reducida de proteínas.

5.2.2.- Evaluación de la contribución de la GCN2 en las consecuencias de la disminución del contenido proteico de la dieta en la activación de la ISR y la autofagia en la corteza motora de ratones macho.

Con el fin de evaluar el estado de activación de la GCN2 y la autofagia en el grupo de animales macho que fueron sometidos al tratamiento dietario, se realizaron ensayos de *Western blot* para detectar los marcadores de ambos procesos, a partir de extractos proteicos de corteza motora. En los machos WT, se observó que la DBP no generó cambios en los niveles de fosforilación de eIF2 α con respecto a la DC (Figura 7A). Sin embargo, al analizar los niveles de p-eIF2 α y eIF2 α , normalizando por el control de carga, se observó que los niveles totales de eIF2 α en el grupo de machos WT alimentados con la DBP disminuyeron en un 47% en comparación con el grupo control (Figura 7A). En cuanto al nivel total de la forma fosforilada de eIF2 α , no se observaron diferencias entre los grupos experimentales (Figura 7A). Los niveles proteicos de GCN2 tampoco mostraron diferencias entre los animales alimentados con la DC y con la DBP (Figura 7A). Por lo tanto, una disminución del contenido proteico de la dieta no cambia el estado de activación de la ISR en la corteza motora en machos, y tampoco impacta los niveles de la GCN2. Por otra parte, se le puede atribuir a la DBP un efecto modulador del potencial de activación de la ISR, al reducir los niveles del elemento central de la vía y, por consiguiente, del sustrato sobre el cual puede actuar la GCN2 y las quinasas de la ISR en general.

Posteriormente, con el fin de examinar el estado de la autofagia en la corteza motora de este grupo de machos WT, se realizaron ensayos de *Western blot* detectando los mismos marcadores descritos anteriormente: LC3-I y II, p62 y Sesn2. En el caso de LC3-II, marcador característico del proceso de autofagia, se observó una clara diferencia entre los machos alimentados con la DC y la DBP: los niveles de LC3-II fueron un 98% mayor en el grupo alimentado con la DBP respecto del grupo DC, es decir, casi el doble que en el grupo control (Figura 7B). Por otra parte, la proporción de LC3-II respecto al total de LC3 no mostró

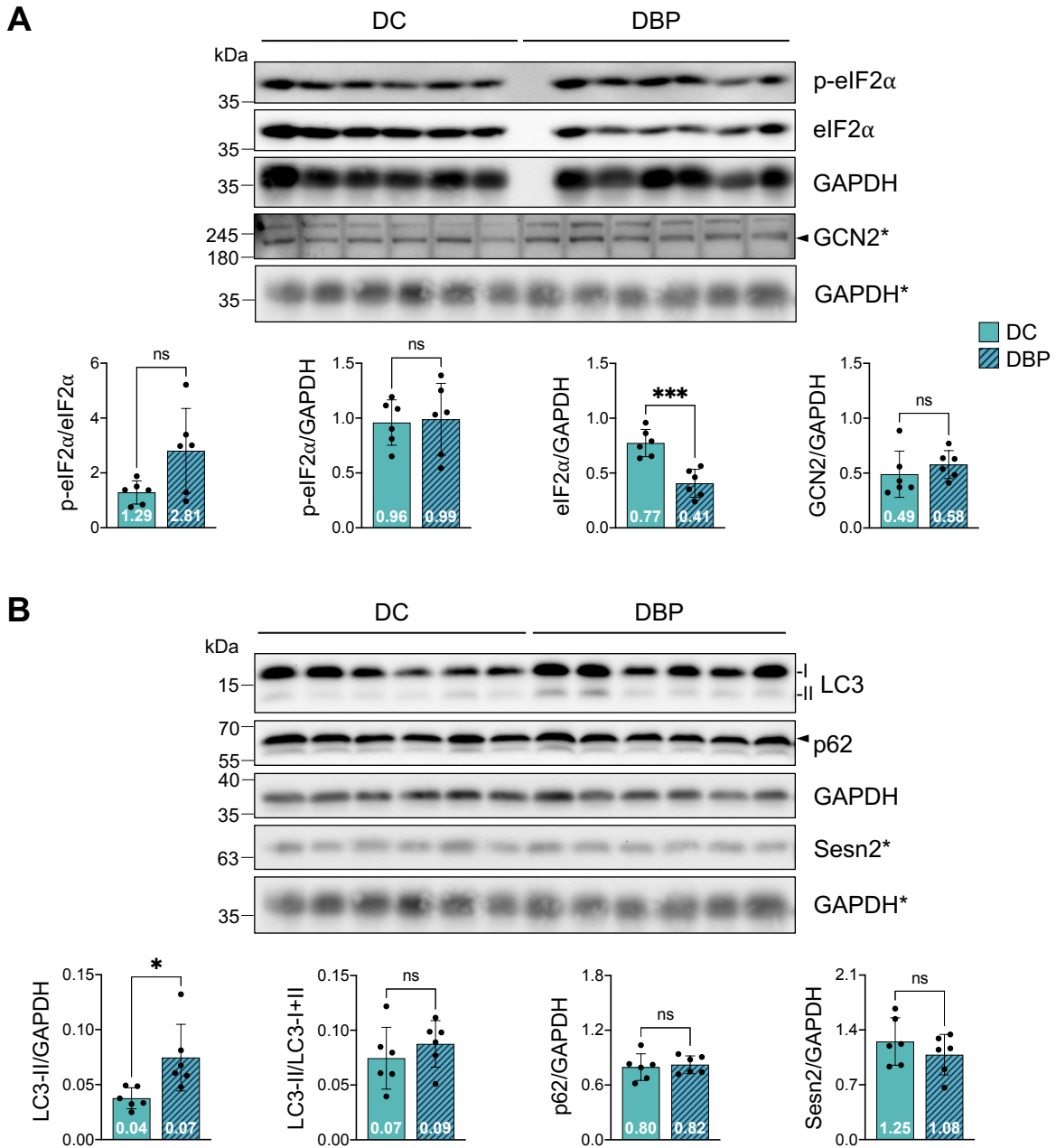


Figura 7. Análisis de la activación de la ISR y la autofagia en la corteza motora de machos WT sometidos a la dieta baja en proteínas. Machos WT fueron alimentados por seis semanas con la dieta control (DC, n=6) y baja en proteínas (DBP, n=6). Para el análisis, se aisló la corteza motora de cada animal y el tejido fue procesado para ensayos de *Western blot*. Se cuantificó la intensidad de pixel de las bandas, y se normalizó con las proteínas indicadas en cada gráfico. **A**) Se evaluó la activación de la ISR mediante la detección de la forma fosforilada de eIF2 α (p-eIF2 α) y de la GCN2 (panel superior), y se determinaron sus niveles relativos (panel inferior). **B**) Se evaluó el estado de la autofagia mediante la detección de LC3 (formas I y II), p62 y Sestrina 2 (Sesn2) (panel superior), y se evaluaron sus niveles relativos (panel inferior). Los asteriscos indican proteínas detectadas en una misma membrana. Puntas de flecha: indican la señal específica del anticuerpo. Se muestra la media \pm desv. std. El valor de la media se indica en blanco en cada barra. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, ns: no significativo. Test de t de Welch.

diferencias entre los animales alimentados con la DC y la DBP (Figura 7B), sugiriendo que el aumento de LC3-II podría estar acompañado de mayores niveles de LC3-I, sin alterar la proporción de LC3-II con respecto al total. En cuanto a los otros marcadores de autofagia evaluados, p62 y Sesn2, no se observaron diferencias en los grupos de animales alimentados con la DBP con respecto a los animales alimentados con la DC (Figura 7B). Entonces, a partir de los análisis de los marcadores de autofagia evaluados, se sugiere que el proceso de autofagia podría estar aumentado en la corteza motora de los machos WT como consecuencia de la administración de la DBP por seis semanas.

Posteriormente, con el objetivo de conocer el posible rol de la GCN2 en los cambios observados a nivel proteico asociados a la DBP en la corteza motora de los machos WT, se realizaron ensayos de *Western blot* para detectar los mismos marcadores, ahora en los machos GCN2KO. En cuanto a la activación de la ISR, evaluada a través de los niveles de fosforilación de eIF2 α , se observa que en las muestras de animales alimentados con la DBP la fosforilación de eIF2 α aumentó un 55% con respecto al grupo alimentado con la DC (Figura 8A). Además, al comparar los niveles de la forma fosforilada de eIF2 α con respecto al control de carga, GAPDH, se detectó una mayor cantidad en los animales alimentados con la DBP (un 50% más que en el grupo control, Figura 8A). En contraste, los niveles totales de eIF2 α obtenidos de los machos alimentados con la DC y la DBP fueron similares para ambos grupos (Figura 8A). Por lo tanto, a partir de los resultados obtenidos, es posible concluir que la dieta baja en proteínas activa la ISR en la corteza motora de machos GCN2KO, en forma independiente de la GCN2. Este resultado sugiere que la disminución del contenido proteico en la dieta promueve un ambiente estresor en condiciones de ausencia de la quinasa GCN2 en la corteza motora de machos, suficiente para activar la respuesta integrada al estrés.

Luego, con el fin de conocer el posible rol de la quinasa GCN2 en la regulación de los niveles proteicos de los marcadores de autofagia ante una disminución en la composición proteica de la dieta, observados en muestras de corteza motora de machos WT, se realizaron ensayos de *Western blot* para detectar los marcadores de autofagia a partir de muestras de corteza motora de machos GCN2KO alimentados con la DC y la DBP. Se evaluaron los niveles proteicos relativos de LC3-I y II, p62 y Sesn2. En relación a LC3, similar a lo observado en las hembras WT (Figura 5B), la intensidad de la señal de LC3-II es baja, y visualmente las bandas correspondientes a esta forma de la proteína fueron casi imperceptibles. No obstante, fue posible cuantificar la intensidad de banda en forma certera,

y de este modo, realizar comparaciones entre la intensidad de pixel de las bandas de LC3-II de los grupos alimentados con la DC y la DBP. No se observaron diferencias entre los dos grupos en los niveles relativos de LC3-II, y tampoco en la proporción de LC3-II con respecto del total de LC3 (Figura 8B). En cuanto al receptor p62, la otra proteína evaluada que es indicadora de la actividad de la autofagia, se detectó una baja de sus niveles en las muestras de los animales sometidos a la DBP en comparación con el grupo control (disminución en un 42%, Figura 8B). Esta disminución puede ser interpretada como un aumento de la degradación autofágica en la corteza motora de estos animales. De todas formas, es importante tener en cuenta que cambios en los niveles de p62 por sí solos no son concluyentes respecto del estado de la autofagia, y deben ser considerados en conjunto con otros marcadores al describir el estado del proceso degradativo⁵¹. El tercer marcador de autofagia evaluado fue Sesn2, para el cual no se observaron diferencias entre las muestras de los animales alimentados con la DC y con la DBP (Figura 8B). Por lo tanto, considerando los efectos de la DBP en los tres marcadores de autofagia evaluados, y que en conjunto no se observaron cambios sugerentes de una activación del proceso degradativo, se concluye que la disminución del contenido proteico dietario por seis semanas no activa la autofagia en la corteza motora de machos GCN2KO.

En conclusión, los resultados obtenidos a partir del análisis de la corteza motora de los machos indican que la disminución del contenido proteico en la dieta no activa la ISR en la corteza motora de ratones macho, pero sí parece promover un aumento en la autofagia en esta región del cerebro, en forma GCN2-dependiente. Además, se sugiere un rol de la GCN2 en la regulación del tono de activación de la ISR ante la disminución del contenido proteico en la dieta durante seis semanas, en que la quinasa estaría moderando la activación de la vía en la corteza motora de ratones macho.

Esta Memoria de Título contemplaba la realización de ensayos de PCR cuantitativo (qPCR) como parte del diseño experimental, con el fin de evaluar el efecto de la DBP sobre los niveles de transcritos de los marcadores de autofagia y la dependencia de la GCN2 en estos efectos. Esta técnica se utilizó no como una primera aproximación para la evaluación de la hipótesis, sino para complementar los resultados obtenidos a través de ensayos de *Western blot*. A partir de los análisis de los extractos proteicos, se encontró que la DBP aumentó los niveles de LC3-II solo en los machos WT, en comparación con el grupo

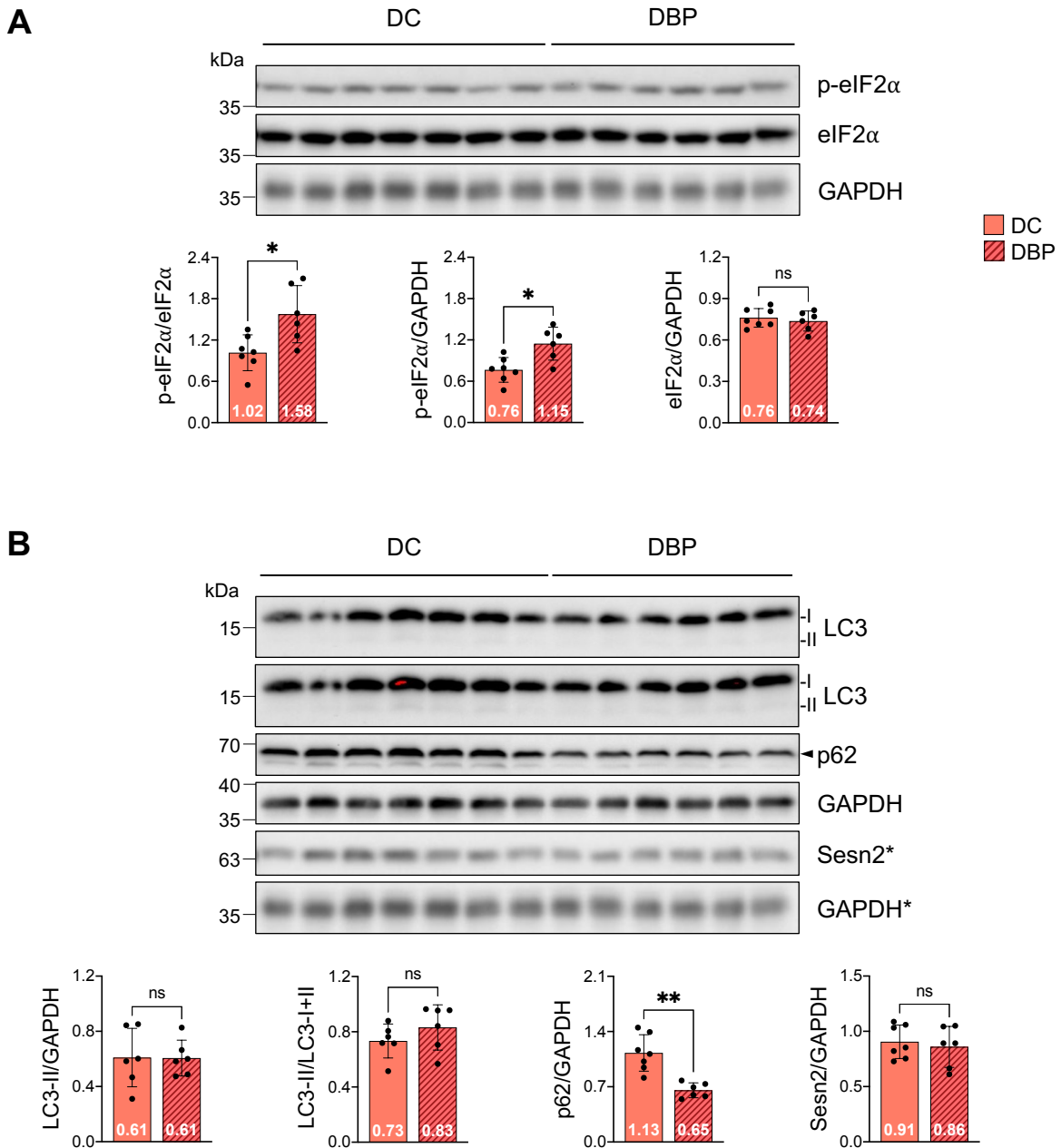


Figura 8. Análisis de la activación de la ISR y la autofagia en la corteza motora de machos GCN2KO sometidos a la dieta baja en proteínas. Machos GCN2KO fueron alimentados por seis semanas con la dieta control (DC, n=7) y baja en proteínas (DBP, n=6). Para el análisis, se aisló la corteza motora de cada animal y el tejido fue procesado para ensayos de *Western blot*. Se cuantificó la intensidad de pixel de las bandas, y se normalizó con las proteínas indicadas en cada gráfico. **A**) Se evaluó la activación de la ISR mediante la detección de la forma fosforilada de eIF2 α (p-eIF2 α , panel superior), y se determinaron sus niveles relativos (panel inferior). **B**) Se evaluó el estado de la autofagia mediante la detección de LC3 (formas I y II), p62 y Sestrina 2 (Sesn2) (panel superior), y se evaluaron sus niveles (panel inferior, DC n=6 para LC3). Se muestran imágenes con tiempos de exposición diferentes para la detección de LC3. Los asteriscos indican proteínas detectadas en una misma membrana. Punta de flecha: indica la señal específica del anticuerpo. En rojo: pixeles con señal saturada. Se muestra la media \pm desv. std. El valor de la media se indica en blanco en cada barra. * p<0,05, ** p<0,01, ns: no significativo. Test de t de Welch.

alimentado con la DC, y no en los grupos de machos deficientes en el gen que codifica para el dominio quinasa de la GCN2. De este modo, se decidió evaluar los niveles de los transcritos de LC3 para los grupos de machos WT y GCN2KO. Para esto, se realizó un ensayo de qPCR amplificando los transcritos codificantes para la proteína LC3. Los niveles de mensajeros de LC3 resultaron similares en los cuatro grupos experimentales (machos WT y machos GCN2KO alimentados con la DC y la DBP, Figura 9). Por lo tanto, la disminución del contenido proteico en la dieta durante seis semanas no se correlaciona con cambios a nivel de los transcritos de LC3 en la corteza motora de machos. Así, el aumento en LC3-II observado en el grupo de machos WT sometido a la DBP probablemente se deba a las modificaciones post traduccionales de LC3-I que dan origen a LC3-II. Cabe mencionar que, de existir un aumento en los transcritos de LC3, se esperaría ver un aumento en los niveles proteicos de LC3-I, lo cual no se observó a partir de los ensayos de *Western blot* realizados con extractos proteicos de corteza motora de machos WT sometidos al tratamiento dietario (Figura S7). En definitiva, la DBP no afecta la expresión de LC3, lo que sugiere que el aumento en los niveles proteicos de LC3-II en la corteza motora de machos WT, y no de machos GCN2KO, no se debe a un aumento de los transcritos que dan origen a la proteína LC3.

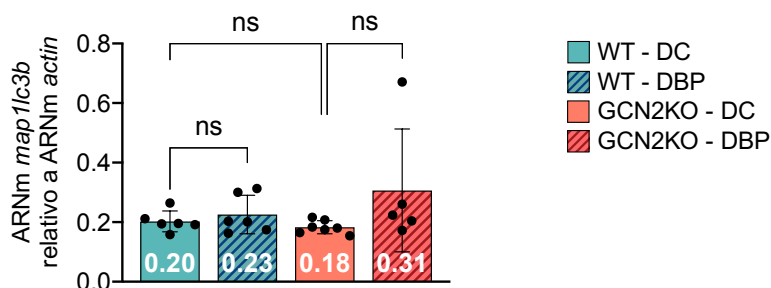


Figura 9. Determinación de los niveles de transcritos codificantes para la proteína LC3 en la corteza motora de los machos WT y GCN2KO sometidos a la dieta baja en proteínas. Machos WT y GCN2KO fueron sometidos a la dieta control (DC, WT n=6, GCN2KO n=7) y a la dieta baja en proteínas (DBP, WT n=6, GCN2KO n=5) por seis semanas. Para el análisis, se aisló la corteza motora de cada animal y el tejido fue procesado para la extracción del ARN total. A partir del ARN obtenido se realizó un ensayo de RT-qPCR utilizando partidores específicos para *map1lc3b*, correspondiente al transcrito codificante para la proteína LC3. Los niveles de transcritos de *map1lc3b* fueron normalizados con los valores obtenidos de la amplificación de los transcritos codificantes para actina (*actin*). Se muestra la media ± desv. std. El valor de la media se indica en blanco en cada barra. ns: no significativo. Test de t de Welch, excepto para comparaciones con el grupo GCN2KO DBP (Mann-Whitney).

En resumen, tomando en cuenta los resultados obtenidos, se concluye que la DBP no tuvo un efecto activador de la GCN2 en la corteza motora de machos y hembras. Respecto a la autofagia, este proceso podría estar aumentado en la corteza motora de machos WT en respuesta a la DBP, y esta activación dependería de la GCN2. Ahora bien, en cuanto a la posible correlación de los resultados motores obtenidos con la activación de la GCN2 en esta región del cerebro, no es posible atribuir el efecto de la DBP en el desempeño motor en machos y hembras a la activación de la quinasa GCN2 en la corteza motora. La regulación que ejerce la GCN2 sobre el desempeño motor ocurriría en otro nivel de control de la función motora, en las condiciones evaluadas en esta Memoria de Título.

5.3.- Evaluación de la contribución de la GCN2 en las consecuencias de la disminución del contenido proteico de la dieta en la activación de la ISR y la autofagia evaluadas en el hipotálamo de ratones.

Para el desarrollo de los objetivos que guían esta Memoria de Título, con el fin de verificar la hipótesis propuesta, se planteó enfocar parte de esta investigación en el hipotálamo, debido a que es una región del cerebro esencial en el control de los niveles de aminoácidos ante una disminución de estos^{33,35}. De este modo, se seleccionó esta estructura como tejido blanco para el estudio de la activación de la GCN2 ante una disminución en el contenido proteico dietario, y la posterior evaluación de la eventual activación de la autofagia en el hipotálamo como parte del mecanismo adaptativo promovido por la GCN2 frente a desbalances en la biodisponibilidad de aminoácidos esenciales.

5.3.1.- Evaluación de la contribución de la GCN2 en las consecuencias de la disminución del contenido proteico de la dieta en la activación de la ISR y la autofagia en el hipotálamo de ratones hembra.

Con el fin de evaluar el estado de activación de la quinasa GCN2 en el hipotálamo del grupo de hembras sometidas al tratamiento dietario, se analizaron los niveles de fosforilación de eIF2 α , centro integrador de la respuesta integrada al estrés, y los niveles totales de GCN2. Para esto, se realizaron ensayos de *Western blot* para detectar las formas fosforilada y total de eIF2 α y de GCN2 a partir de extractos proteicos de hipotálamo. En relación al grupo de las hembras WT, se obtuvo que la fosforilación de eIF2 α fue un 34%

mayor en el hipotálamo del grupo alimentado con la DBP en relación al grupo alimentado con la DC (Figura 10A). Además, al analizar los niveles totales de la forma fosforilada y total de eIF2 α , normalizadas por el control de carga, no se encontraron diferencias en los niveles de la forma fosforilada de eIF2 α entre los grupos (Figura 10A), y hubo una disminución de un 14% en los niveles totales de eIF2 α en el grupo alimentado con DBP (Figura 10A). También se evaluaron los niveles totales de GCN2 en el hipotálamo de las hembras WT. El anticuerpo anti-GCN2 mostró marcas inespecíficas que no permitieron la cuantificación de las bandas (Figura 10A). Sin embargo, es posible observar una evidente disminución en las bandas correspondientes a la GCN2 en el grupo alimentado con la DBP con respecto al control. En conclusión, estos resultados indican que la ISR se encuentra activada en el hipotálamo de hembras alimentadas con la DBP durante seis semanas. Además, la disminución de la proteína eIF2 α asociada a la DBP sugiere que el contenido proteico en la dieta modula el potencial de activación de la vía en el hipotálamo de hembras WT, afectando también los niveles del sensor GCN2.

Posteriormente, para evaluar el efecto de la disminución del contenido proteico dietario sobre el proceso de autofagia en el hipotálamo de las hembras, se realizaron ensayos de *Western blot* contra marcadores de autofagia a partir de extractos proteicos de hipotálamo de hembras WT. En cuanto a los niveles de LC3-II, no se encontraron diferencias en las cantidades relativas de este marcador entre los grupos alimentados con DC y DBP (Figura 10B). En este caso, para el análisis de los niveles de LC3-II se utilizó como control de carga la proteína Histona H3 (y no GAPDH), que es una de las proteínas involucradas en la compactación de la cromatina, cuyos niveles proteicos no se ven afectados según el contenido proteico de la dieta. Se cambió el control de carga porque la proteína GAPDH, que se detectó correctamente con muestras de corteza, no se resolvió de manera adecuada en los geles de poliacrilamida para la detección de la proteína LC3 con muestras de hipotálamo. Ahora bien, la proporción de LC3-II respecto a LC3 total en el hipotálamo de las hembras WT, no mostró diferencias entre los grupos alimentados con la DC y con la DBP (Figura 10B). Por otro lado, tampoco se observaron diferencias en los niveles relativos del receptor de autofagia p62 (Figura 10B) entre los grupos de hembras WT. En cuanto a Sesn2, proteína que ejerce un efecto promotor de la autofagia incidiendo en la regulación de este proceso degradativo, se observó una disminución en un 18% en sus niveles proteicos en las muestras de hipotálamo provenientes de las hembras WT alimentadas con la DBP, relativo a los niveles del grupo alimentado con la DC (Figura 10B). Esta disminución puede indicar una menor capacidad de inducción de la autofagia con respecto al control.

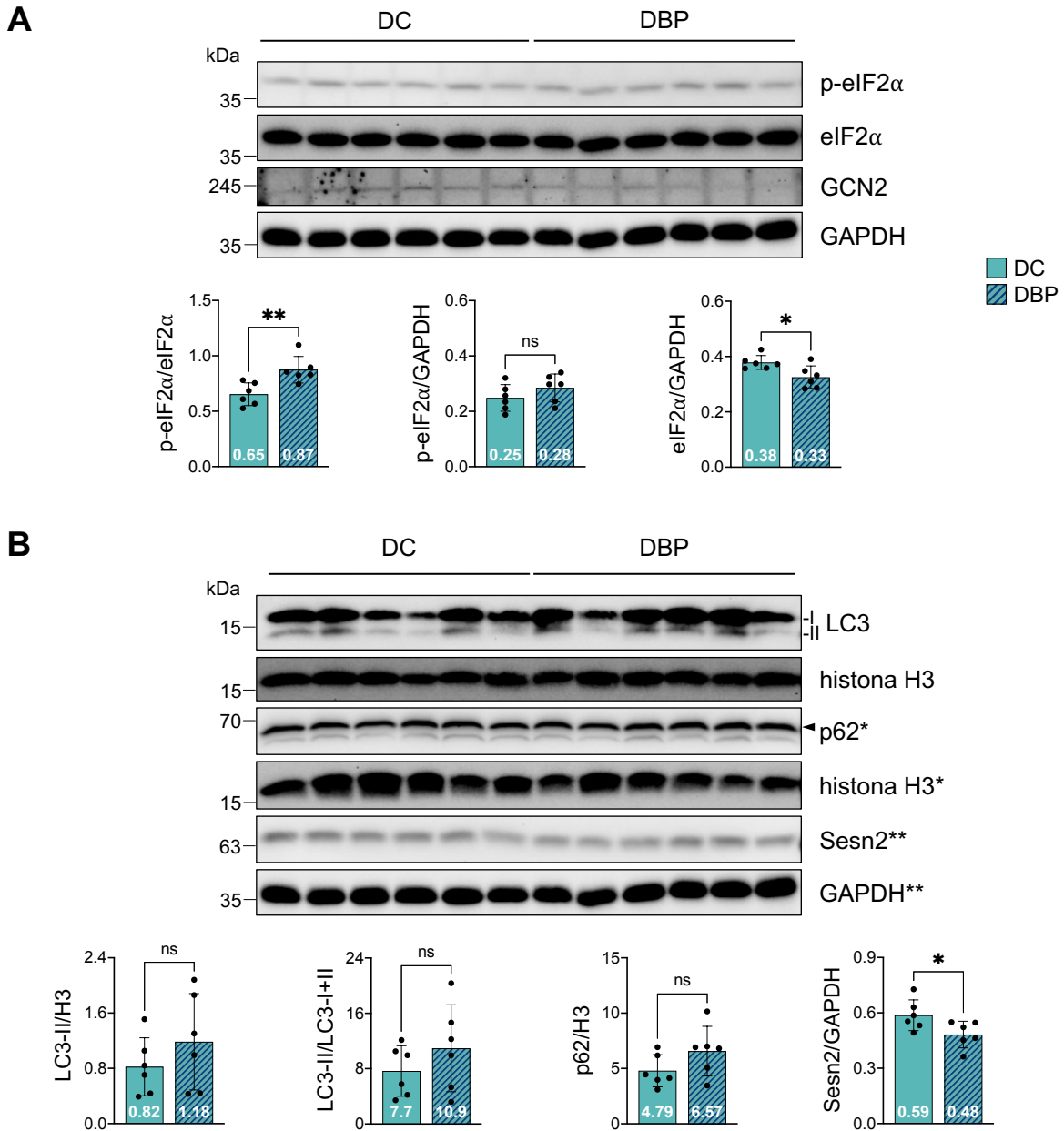


Figura 10. Análisis de la activación de la ISR y la autofagia en el hipotálamo de hembras WT sometidas a la dieta baja en proteínas. Hembras WT fueron alimentadas por seis semanas con la dieta control (DC, n=6) y baja en proteínas (DBP, n=6). Para el análisis, se aisló el hipotálamo de cada animal y el tejido fue procesado para ensayos de *Western blot*. Se cuantificó la intensidad de pixel de las bandas, y se normalizó con las proteínas indicadas en cada gráfico. **A**) Se evaluó la activación de la ISR a través de la detección de la forma fosforilada de eIF2 α (p-eIF2 α) y de la GCN2 (panel superior), y se determinaron sus niveles relativos (panel inferior). **B**) Se evaluó el estado de la autofagia mediante la detección de LC3 (formas I y II), p62 y Sestrina 2 (Sesn2) (panel superior), y se evaluaron sus niveles relativos (panel inferior). Los asteriscos indican proteínas detectadas en una misma membrana. Punta de flecha: indica la señal específica del anticuerpo. Se muestra la media \pm desv. std. El valor de la media se indica en blanco en cada barra. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ns: no significativo. Test de t de Welch.

En conjunto, los resultados obtenidos para los niveles proteicos relativos de los marcadores de autofagia evaluados sugieren que la DBP no afecta la autofagia en el hipotálamo de hembras WT, en las condiciones de este experimento.

Posteriormente, con el objetivo de conocer la dependencia de la GCN2 de los efectos observados a nivel proteico producto de la DBP en muestras de hipotálamo de las hembras WT, se realizaron ensayos de *Western blot* para detectar la forma fosforilada y el total de eIF2 α , a partir de extractos proteicos de hipotálamo provenientes de hembras GCN2KO alimentadas con la DC y con la DBP. Respecto de la fosforilación de eIF2 α , no se observaron diferencias entre los grupos (Figura 11A). Por otro lado, al evaluar los niveles proteicos de p-eIF2 α y eIF2 α normalizando respecto del control de carga, tampoco se observaron diferencias entre los grupos de hembras alimentadas con la DC y la DBP (Figura 11A). Estos resultados indican que la ISR no se encuentra activada en el hipotálamo de las hembras GCN2KO en respuesta a seis semanas de DBP.

Por otra parte, con el fin de determinar la relevancia de la GCN2 en la regulación de los niveles proteicos de los marcadores de autofagia en el hipotálamo, evaluados en las hembras WT en respuesta a la DBP, se realizaron ensayos de *Western blot* para detectar los marcadores de autofagia en muestras de hipotálamo de hembras GCN2KO alimentadas con la DC y la DBP. Se detectaron las proteínas LC3 (en sus formas I y II), p62 y Sesn2. En este caso, no se logró una separación de las proteínas LC3-I y LC3-II en el gel de poliacrilamida y, por esto, no fue posible cuantificar las bandas de LC3-I y LC3-II por separado. En su defecto, se evaluaron posibles cambios en los niveles totales de la proteína LC3 (LC3-I+II), porque, si bien no representa un marcador fidedigno de la autofagia, un aumento de LC3 en conjunto con los otros marcadores podría ser indicativo de una mayor activación de la autofagia. Los niveles de LC3 se normalizaron con histona H3 (LC3-I+II/H3) y no se encontraron diferencias entre las hembras GCN2KO alimentadas con la DC y la DBP (Figura 11B). Por otro lado, en cuanto a los niveles proteicos de p62 y Sesn2, los otros marcadores de autofagia evaluados, tampoco se encontraron diferencias en los niveles de estas proteínas entre las muestras de hipotálamo de hembras GCN2KO alimentadas con la DC y la DBP (Figura 11B). Por lo tanto, los resultados sugieren que la dieta baja en proteínas no promueve la autofagia en el hipotálamo de las hembras GCN2KO, de acuerdo a los marcadores evaluados, aunque se requiere conocer los niveles de LC3-II para determinar el estado de la autofagia en este grupo.

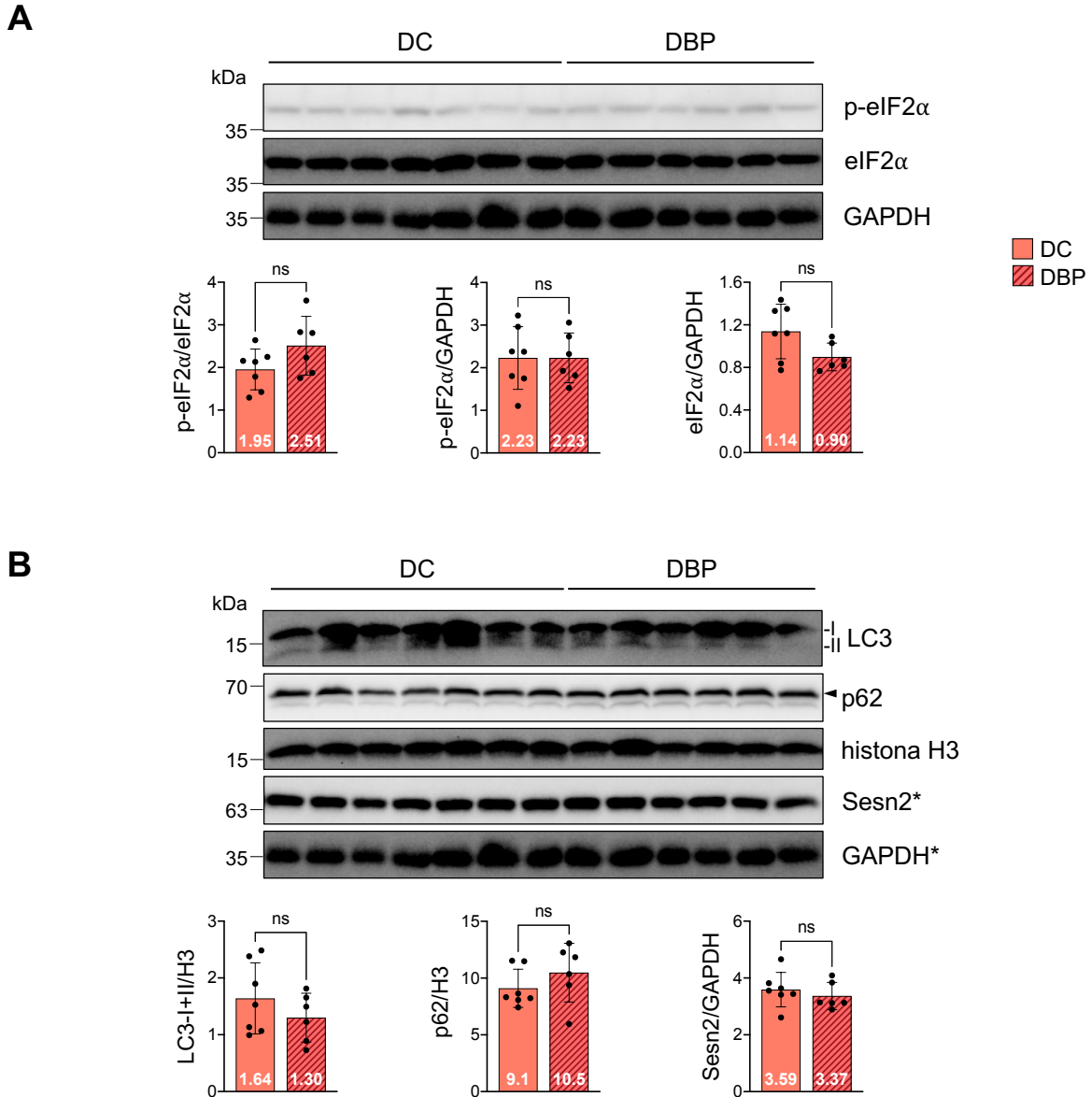


Figura 11. Análisis de la activación de la ISR y la autofagia en el hipotálamo de hembras GCN2KO sometidas a la dieta baja en proteínas. Hembras GCN2KO fueron alimentadas por seis semanas con la dieta control (DC, n=7) y baja en proteínas (DBP, n=6). Para el análisis, se aisló el hipotálamo de cada animal y el tejido fue procesado para ensayos de *Western blot*. Se cuantificó la intensidad de pixel de las bandas, y se normalizó con las proteínas indicadas en cada gráfico. **A)** Se evaluó la activación de la ISR a través de la detección de la forma fosforilada de eIF2 α (p-eIF2 α , panel superior), y se determinaron sus niveles relativos (panel inferior). **B)** Se evaluó el estado de la autofagia mediante la detección de LC3 (formas I y II), p62 y Sestrina 2 (Sesn2) (panel superior), y se evaluaron sus niveles relativos (panel inferior). Los asteriscos indican proteínas detectadas en una misma membrana. Punta de flecha: indica la señal específica del anticuerpo. Se muestra la media \pm desv. std. El valor de la media se indica en blanco en cada barra. ns: no significativo. Test de t de Welch, excepto para p62/H3 (Mann-Whitney).

En resumen, considerando los resultados obtenidos para los grupos de hembras, se concluye que la disminución del contenido proteico en la dieta durante seis semanas activa la respuesta integrada al estrés a través de la GCN2 en el hipotálamo de hembras, pero no activa la autofagia en esta región del cerebro de las hembras. Sin embargo, se requieren más experimentos para determinar la contribución de la GCN2 en el efecto de la DBP en la autofagia en el hipotálamo de hembras.

5.3.2.- Evaluación de la contribución de la GCN2 en las consecuencias de la disminución del contenido proteico de la dieta en la activación de la ISR y la autofagia en el hipotálamo de ratones macho.

El diseño experimental propuesto para dar cumplimiento a los objetivos de esta Memoria de Título contemplaba también la evaluación del impacto de la DBP en la autofagia en el hipotálamo de animales macho, y la dependencia de los efectos observados de la quinasa GCN2. De este modo, se realizaron ensayos de *Western blot* a partir de extractos proteicos de hipotálamo de machos WT alimentados con la DC y la DBP, para detectar la fosforilación de eIF2 α y su nivel total, y la GCN2. A partir de los experimentos realizados, se obtuvo que la fosforilación de eIF2 α fue un 29% mayor en el hipotálamo de los machos WT sometidos a la DBP (Figura 12A). Por otro lado, también se evaluaron los niveles de la forma fosforilada de eIF2 α (p-eIF2 α) y los niveles totales de este factor normalizando con el control de carga, GAPDH, y se obtuvo que los niveles de p-eIF2 α también estaban aumentados (30% mayor en el grupo DBP, Figura 12A), mientras que no se observaron cambios en los niveles totales de eIF2 α entre los grupos (Figura 12A). En cuanto a la quinasa GCN2, si bien mediante *Western blot* en extractos derivados de hipotálamo de las hembras WT fue posible detectar la quinasa (Figura 10A), no se logró detectar a la proteína GCN2 en hipotálamo de machos WT, a pesar de que el ensayo fue realizado en las mismas condiciones. Esta diferencia en la detección de la GCN2 entre machos y hembras podría deberse a una diferencia en los niveles de la quinasa en el hipotálamo, siendo mayores en las hembras WT comparado con los machos. En definitiva, a partir de los niveles de p-eIF2 α observados, se concluye que la disminución del contenido proteico de la dieta durante seis semanas activa la respuesta integrada al estrés en el hipotálamo de machos WT.

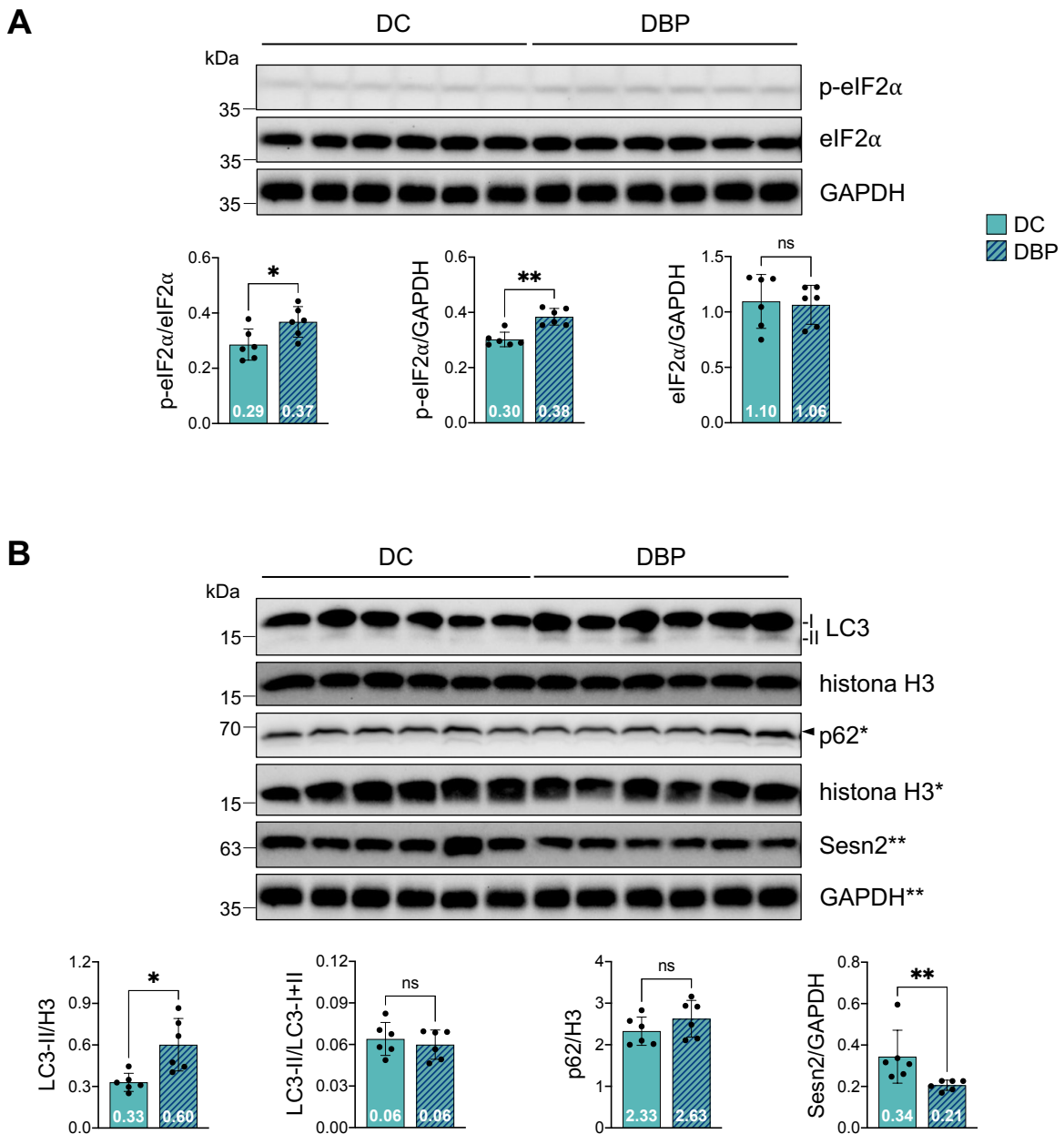


Figura 12. Análisis de la activación de la ISR y la autofagia en el hipotálamo de machos WT sometidos a la dieta baja en proteínas. Machos WT fueron alimentados por seis semanas con la dieta control (DC, n=6) y baja en proteínas (DBP, n=6). Para el análisis, se aisló el hipotálamo de cada animal y el tejido fue procesado para ensayos de *Western blot*. Se cuantificó la intensidad de pixel de las bandas, y se normalizó con las proteínas indicadas en cada gráfico. **A)** Se evaluó la activación de la ISR a través de la detección de la forma fosforilada de eIF2 α (p-eIF2 α , panel superior), y se determinaron sus niveles relativos (panel inferior). **B)** Se evaluó el estado de la autofagia mediante la detección de LC3 (formas I y II), p62 y Sestrina 2 (Sesn2) (panel superior), y se evaluaron sus niveles relativos (panel inferior). Los asteriscos indican proteínas detectadas en una misma membrana. Punta de flecha: indica la señal específica del anticuerpo. Se muestra la media \pm desv. std. El valor de la media se indica en blanco en cada barra. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ns: no significativo. Test de t de Welch, excepto para p-eIF2 α /GAPDH y Sesn2/GAPDH (Mann-Whitney).

Por otro lado, para conocer el impacto de la disminución del contenido proteico dietario en el proceso de autofagia en el hipotálamo de los machos WT, se realizaron ensayos de *Western blot* para detectar marcadores de autofagia. A partir de los experimentos realizados, se obtuvo que los niveles del marcador clásico de autofagia LC3-II se encuentran aumentados en un 82% en el hipotálamo de machos WT alimentados con la DBP en comparación con el grupo control (Figura 12B). Por otro lado, no se observaron diferencias en la proporción de LC3-II con respecto a los niveles totales de LC3 entre los grupos (Figura 12B). En este caso, la intensidad de las bandas correspondientes a LC3-II fue baja, sin embargo, fue posible cuantificar la intensidad de pixel de LC3-II en todos los carriles en forma exitosa. Por otro lado, a partir de los extractos proteicos de hipotálamo de machos WT también se analizaron los niveles relativos del receptor de autofagia p62, y no se observaron diferencias asociadas al tipo de dieta administrada (Figura 12B). Respecto del tercer marcador de autofagia utilizado, Sesn2, se observó que tras la administración de la dieta baja en proteínas hubo una disminución de sus niveles de un 32% en el grupo tratado con DBP, respecto a los niveles observados en el hipotálamo de los animales alimentados con la DC (Figura 12B). Esto coincide con el efecto de la DBP sobre los niveles proteicos de Sesn2 observado en el hipotálamo de las hembras WT sometidas al mismo tratamiento (Figura 10B). Por lo tanto, a partir de los resultados obtenidos, particularmente de los niveles de LC3-II, es posible sugerir que la disminución del contenido proteico en la dieta aumenta la autofagia en el hipotálamo de machos WT. Además, los resultados obtenidos sugieren que el potencial aumento en la autofagia ante la DBP posiblemente sea independiente de la regulación ejercida por Sesn2, debido a que, a pesar de la disminución en los niveles de Sesn2, que podría interpretarse como una menor capacidad de promoción de la autofagia, se observa un aumento en los niveles de LC3-II.

Posteriormente, con el objetivo de conocer la relevancia de la quinasa GCN2 en los efectos asociados a la DBP en el hipotálamo, en particular, en la fosforilación de eIF2 α detectada en los machos WT, se utilizó la misma estrategia (*Western blot*), ahora a partir de extractos proteicos de machos deficientes en el gen codificante para el dominio quinasa de la GCN2 (GCN2KO). En primer lugar, se detectó eIF2 α (la forma fosforilada y el total) y no se observó un efecto atribuible a la dieta administrada en la razón de fosforilación de eIF2 α respecto al total, en el hipotálamo de machos GCN2KO (Figura 13A). Por otro lado, al analizar los niveles de la forma fosforilada y del total de eIF2 α por separado, se obtuvo que la dieta baja en proteínas produjo un aumento tanto en la forma fosforilada (64%

respecto del grupo con DC, Figura 13A) como en el total de eIF2 α (63%, Figura 13A) en el hipotálamo de machos GCN2KO. Estos resultados indican que la cantidad de eIF2 α adicional detectada en el grupo alimentado con la DBP, está fosforilada. Es decir, frente a la disminución del contenido proteico en la dieta, en el hipotálamo de machos GCN2KO, se genera un aumento en la cantidad del sustrato fosforilable por las quinasas de la ISR, que es el centro integrador de la vía, eIF2 α , y este, además, está fosforilado. Esto explica la ausencia de cambios en la razón de fosforilación de eIF2 α entre los grupos alimentados con la DC y la DBP. Los resultados mostraron un aumento del nivel de eIF2 α fosforilado en el hipotálamo de los machos GCN2KO sometidos a la DBP. Sería interesante analizar las consecuencias del cambio en los niveles de eIF2 α en la capacidad adaptativa, ya sea analizando el perfil traduccional y/o transcripcional inducido o en indicadores funcionales.

Por otro lado, para conocer la injerencia de la GCN2 en los efectos observados a nivel de la autofagia en el hipotálamo de machos WT en respuesta al menor contenido proteico ingerido, se evaluaron marcadores de autofagia, mediante *Western blot*, a partir de extractos proteicos de hipotálamo de machos GCN2KO sometidos al tratamiento dietario. Las bandas correspondientes a LC3-I y LC3-II no se resolvieron, tal que pudieran ser cuantificadas por separado. Por esto, no fue posible la cuantificación de LC3-II en las muestras de hipotálamo, ni conocer la proporción de LC3-II con respecto a LC3 total. No obstante, a partir de los resultados obtenidos, se analizaron los niveles totales de LC3, dado que este resultado podría ser informativo de los niveles de activación de la autofagia, al ser evaluado en conjunto con los otros marcadores. No se encontraron diferencias en los niveles de LC3 asociados a la dieta consumida (normalizados respecto al control de carga, Histona H3, Figura 13B). Por otro lado, en cuanto a los niveles de p62, no se observaron diferencias en los niveles de este receptor en el hipotálamo de machos GCN2KO en base a la dieta administrada (Figura 13B). Finalmente, respecto del impacto de la composición proteica de la dieta en los niveles de Sesn2 en el hipotálamo de los machos GCN2KO, se obtuvo que la DBP indujo un aumento de un 45% en los niveles de Sesn2 con respecto al control (Figura 13B). El aumento en los niveles de Sesn2 podría promover un aumento en la autofagia, mediante la represión del mecanismo inhibitorio sobre este proceso ejercido por mTORC1, por lo cual es posible sugerir que la autofagia podría estar aumentada en el hipotálamo de machos GCN2KO sometidos a la DBP. Sin embargo, se requieren más estudios para poder concluir al respecto, puesto que el hecho de que aumenten los niveles de Sesn2 en respuesta a la DBP por sí solo no es resolutorio respecto del estado de la autofagia en el hipotálamo de los machos GCN2KO alimentados con la DBP.

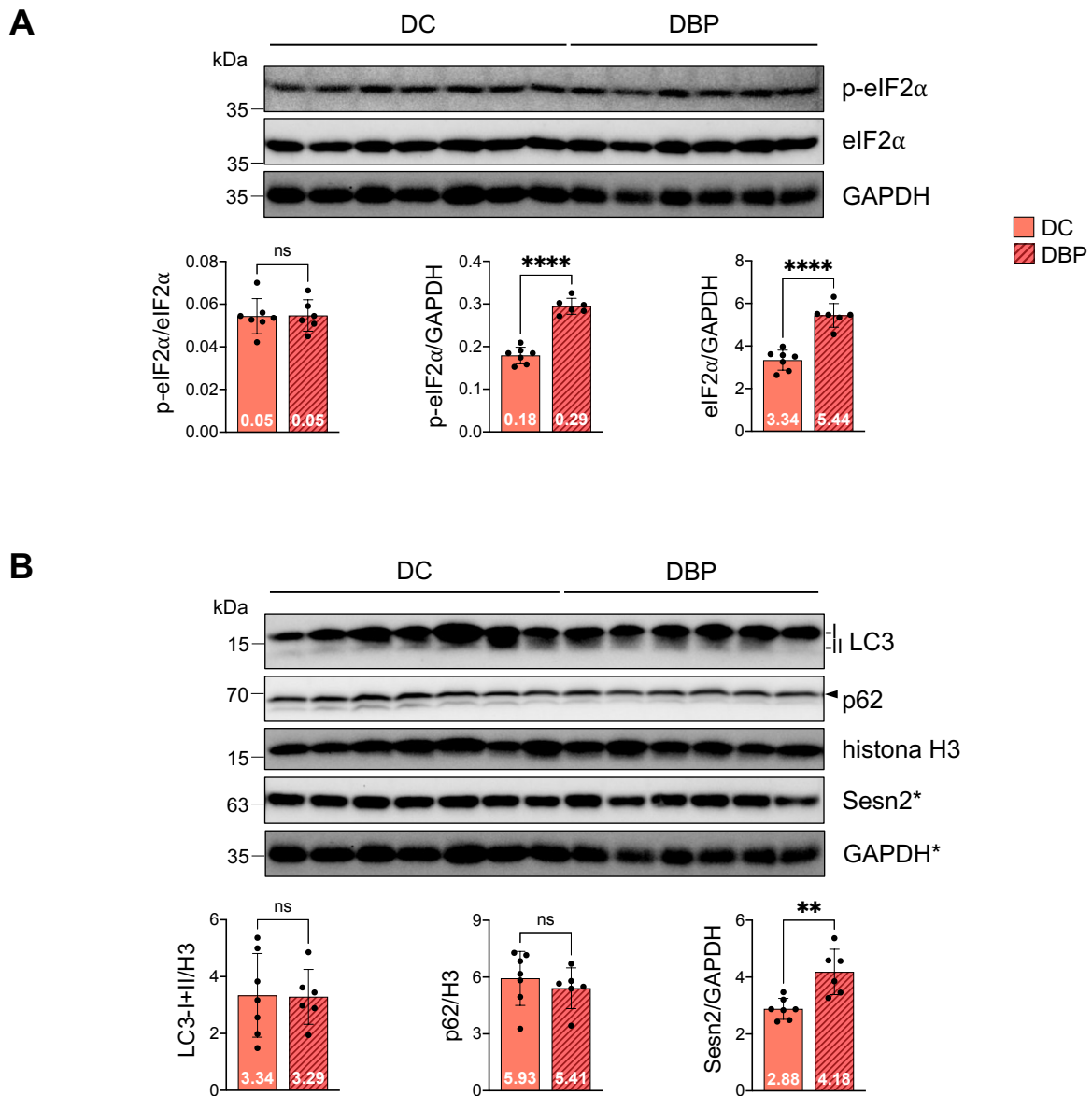


Figura 13. Análisis de la activación de la ISR y la autofagia en el hipotálamo de machos GCN2KO sometidos a la dieta baja en proteínas. Machos GCN2KO fueron alimentados por seis semanas con la dieta control (DC, n=7) y baja en proteínas (DBP, n=6). Para el análisis, se aisló el hipotálamo de cada animal y el tejido fue procesado para ensayos de *Western blot*. Se cuantificó la intensidad de pixel de las bandas, y se normalizó con las proteínas indicadas en cada gráfico. **A**) Se evaluó la activación de la ISR a través de la detección de la forma fosforilada de eIF2α (p-eIF2α, panel superior), y se determinaron sus niveles relativos (panel inferior). **B**) Se evaluó el estado de la autofagia mediante la detección de LC3 (formas I y II), p62 y Sestrina 2 (Sesn2) (panel superior), y se evaluaron sus niveles relativos (panel inferior). Los asteriscos indican proteínas detectadas en una misma membrana. Punta de flecha: indica la señal específica del anticuerpo. Se muestra la media ± desv. std. El valor de la media se indica en blanco en cada barra. ** p<0,01, **** p<0,0001, ns: no significativo. Test de t de Welch.

Por lo tanto, con respecto a los marcadores proteicos evaluados en el hipotálamo de los grupos de machos sometidos a la DBP, es posible concluir que la disminución del contenido proteico de la dieta tiene un efecto activador de la ISR en el hipotálamo, mediado por la GCN2, y probablemente promueve la autofagia en el hipotálamo de machos WT. No obstante, se requieren más estudios para determinar este efecto de la DBP en la autofagia, y su dependencia de la GCN2.

En esta Memoria de Título, se seleccionó el hipotálamo como tejido blanco a analizar debido a su función en la detección y control de los niveles de distintos tipos de nutrientes en el organismo, siendo una estructura central en la regulación metabólica^{35,38,46}. De este modo, una estrategia dietaria basada en la disminución del contenido proteico ingerido, y por consiguiente, de la biodisponibilidad de aminoácidos, debiera tener un efecto a nivel del hipotálamo. Por otro lado, la quinasa GCN2 es un sensor de aminoácidos, que se activa en condiciones de deficiencia de estas biomoléculas. En base a estos antecedentes se propuso que la DBP activaría la GCN2 en el hipotálamo, lo cual concuerda con antecedentes disponibles en la literatura¹³. De este modo, el hipotálamo representaba una estructura idónea como blanco para el estudio de la activación de la GCN2, y en particular, para evaluar si la inducción de la autofagia forma parte del mecanismo adaptativo promovido por la GCN2 en el sistema nervioso central. A partir del tratamiento dietario aplicado, y los análisis realizados a nivel proteico en el hipotálamo de los distintos grupos experimentales, se concluye que la administración de la DBP durante seis semanas activó la GCN2 en el hipotálamo de los animales, tanto en machos como en hembras. Además, en el grupo de machos (y no así en el de hembras) se obtuvieron resultados sugerentes de mayores niveles de autofagia en esta estructura, lo cual insinúa que la autofagia podría ser promovida tras la activación de la GCN2 en el hipotálamo, en machos.

Finalmente, se presenta una tabla donde se resumen los resultados obtenidos. La tabla indica si se detectó un cambio (aumento (verde) o disminución (rojo)) o no (gris) en los niveles de las proteínas evaluadas en la corteza motora y el hipotálamo, mediante ensayos de *Western blot* (Tabla 1), y se presentan los resultados por sexo.

Tabla 1. Resumen de los cambios a nivel proteico en los indicadores evaluados en cada grupo, en respuesta a la dieta baja en proteínas. CM: corteza motora, HT: hipotálamo, ♀: hembras, ♂: machos.

		EFECTO DE LA DIETA BAJA EN PROTEÍNAS							
GENOTIPO		WT				GCN2KO			
REGIÓN		CM		HT		CM		HT	
INDICADOR		♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
fosforilación eIF2 α		■	■	■	■	■	■	■	■
niveles de eIF2 α		■	■	■	■	■	■	■	■
LC3-II		■	■	■	■	■	■	■	■
p62		■	■	■	■	■	■	■	■
Sesn2		■	■	■	■	■	■	■	■

■ Sin diferencias

■ Aumento

■ Disminución

6.- Discusión

Esta Memoria de Título se desarrolló con el objetivo de determinar si la activación de la autofagia forma parte del mecanismo adaptativo promovido por la activación de la GCN2 en el sistema nervioso central de ratones. Para esto, se diseñó una estrategia experimental basada en la administración de una dieta baja en proteínas como estímulo activador de la GCN2. Las dietas bajas en proteínas han sido ampliamente utilizadas en el estudio del metabolismo, con el fin de identificar aproximaciones que permitan modular los procesos metabólicos que se ven desregulados en diversos contextos, tales como el envejecimiento, la diabetes, la obesidad, entre otros^{13,54-58}.

En esta Memoria, a partir del tratamiento realizado, se observó que la administración de la DBP durante seis semanas produjo una disminución progresiva del **peso corporal** de los machos, pero no de las hembras. Se evidenció que la GCN2 tiene un rol crucial en la mantención del peso corporal ante la DBP en las hembras, a diferencia de los machos. La disminución del peso corporal debida a una dieta con bajo contenido proteico ha sido descrita previamente en ratones. Por ejemplo, se observó una disminución del peso corporal en animales sometidos a una dieta con un 5 %p/p de proteínas durante dos semanas^{54,55}, doce semanas¹³ y seis meses⁵⁴. Esta disminución en el peso corporal también se observó en experimentos previos del Laboratorio de Biología de la Neurodegeneración, tanto en ratones adultos sometidos a la DBP durante seis meses, como en ratones envejecidos sometidos a la DBP durante tres meses (resultados no publicados). Por lo tanto, la disminución del peso corporal observada en esta investigación como consecuencia de la DBP era un resultado esperado. No obstante, todos los antecedentes que abordan el efecto de las dietas bajas en proteínas en el peso corporal corresponden a investigaciones realizadas en ratones macho. En la búsqueda bibliográfica realizada para esta Memoria no se encontraron antecedentes donde se estudiaran las consecuencias de la administración de una DBP a ratones hembra, o estudios donde se comparase simultáneamente el efecto en hembras con el efecto en los machos. De este modo, en esta Memoria de Título se presenta el primer antecedente del efecto de la administración de una DBP a ratones hembra. Se encontró que, la ya descrita disminución del peso corporal debida a la baja del contenido proteico dietario en machos, no ocurre en las hembras. Además, se encontró que la quinasa GCN2 es la responsable de esta diferencia, evidenciando su rol fundamental en la mantención del peso corporal de las hembras ante una disminución del contenido proteico en la dieta.

Por otra parte, si bien este trabajo no contemplaba inicialmente analizar la contribución de la GCN2 en los efectos de las dietas bajas en proteínas en la **glicemia**, nos pareció interesante la notable diferencia entre hembras y machos, que no había sido reportada previamente. Los resultados mostraron que la quinasa GCN2 ejerce un rol de manera diferencial: en las hembras, la quinasa mantiene estables los niveles de glicemia ante la DBP, mientras que en los machos la quinasa media la disminución transitoria observada en respuesta a la reducción de la composición proteica de la dieta. La contribución de la ISR en el metabolismo de la glucosa ha sido estudiada, a partir de la generación del ratón homocigoto mutante para el gen codificante para la serina 51 de eIF2 α , que es el blanco de fosforilación de las quinasas de la ISR. Los ratones portadores de estas mutaciones mueren dieciocho horas después de nacer debido a una hipoglicemia y una gluconeogénesis defectuosa⁵⁹. Hay otros antecedentes que involucran a la GCN2 en el control de la glicemia, aunque aún no se conoce con claridad el mecanismo. Se ha mostrado que la GCN2 controla la glicemia a través de la gluconeogénesis. Los animales deficientes genéticos de la GCN2 tienen una alteración en la expresión génica de enzimas clave de la gluconeogénesis y una síntesis de la glucosa disminuida luego de la administración de sustratos gluconeogénicos en condiciones de ayuno⁶⁰. También se ha mostrado que dietas bajas en proteínas, en particular bajas en aminoácidos de cadena ramificada, aumentan la sensibilidad a la insulina hepática y aumentan el gasto energético. Este efecto ha sido atribuido a la acción de la GCN2⁵⁷. Sin embargo, en contextos donde se reduce cierto tipo de aminoácido ramificado, específicamente isoleucina, el efecto metabólico de la dieta es independiente de la GCN2⁶¹. Por otra parte, el control de la glicemia está fuertemente relacionado a los niveles de aminoácidos, dado que estos últimos modulan la proliferación de las células beta pancreáticas⁶², la secreción de insulina⁶³, entre otros⁵⁶. Además, se ha descrito que a través de la modificación de la ingesta proteica es posible regular el metabolismo de la glucosa y el metabolismo energético en general⁵⁶. De este modo, era esperable observar efectos de la administración de la DBP en la glicemia que fueran dependientes de la quinasa GCN2, y queda por establecer cuál es la acción precisa de la quinasa en relación al fenotipo observado en machos y en hembras.

Es importante mencionar que el 15 %p/p de la DBP utilizada, correspondiente al contenido proteico faltante respecto a la DC, fue reemplazado con carbohidratos. Esta mayor cantidad de carbohidratos podría haber influido en la glicemia de los animales que consumieron la DBP. No obstante, a partir de los análisis realizados, no es posible determinar si el efecto de la DBP en la glicemia se debe a esa cantidad adicional de

carbohidratos. Más aun considerando que los resultados mostraron que la administración de la DBP generó una disminución en la glicemia, en vez de un aumento, como podría esperarse ante un mayor consumo de carbohidratos. Por lo tanto, considerando que tanto la cantidad de glúcidos y de aminoácidos en la dieta como la quinasa GCN2 inciden en la glicemia de manera independiente, no es posible proponer un mecanismo específico mediante el cual la DBP influye en la glicemia, ni determinar la contribución exacta de la quinasa en este contexto.

En esta Memoria de Título se examinó la **función motora** de los animales en la última semana de tratamiento dietario. A partir de la prueba motora realizada, se obtuvieron resultados completamente distintos entre hembras y machos: en el caso de las hembras, la DBP no tuvo un impacto en el desempeño motor de los animales, mientras que la ausencia de la actividad quinasa de la GCN2 tuvo como consecuencia un deterioro del desempeño motor en comparación con el grupo WT. En cambio, en el grupo de ratones macho, la DBP tuvo un efecto en el desempeño motor de los animales, mejorándolo, en forma GCN2-dependiente. Sin embargo, la ausencia de la quinasa GCN2 funcional en los animales macho no tuvo un efecto en el desempeño motor. Es decir, en un grupo experimental, la DBP tuvo un efecto GCN2-dependiente, mientras que en el otro grupo experimental, la DBP no tuvo efecto pero sí lo tuvo la ausencia de la quinasa funcional. Estos resultados evidencian un interesante rol de la GCN2 en el control de la función motora, que opera en forma sexo-dependiente, y que no había sido descrito previamente. El papel de la quinasa GCN2 en la función motora no ha sido estudiado directamente y solo existe un artículo que la relaciona⁶⁴. En este artículo⁶⁴ se estudió la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT), que se manifiesta por neuropatías axonales periféricas y problemas motores en los pacientes, y está causada por mutaciones en genes que codifican para las ARNt sintetasas, que son las enzimas que catalizan la esterificación de un aminoácido con su ARN de transferencia. En este artículo se exploró la contribución de la quinasa GCN2 debido a que en un modelo murino de la enfermedad de CMT observaron que la traducción de mensajeros estaba alterada y la ISR activada y, además, existían antecedentes que mostraban una detención de los ribosomas durante la traducción en distintos modelos de la enfermedad, detención que había sido descrita previamente como un estímulo activador de la GCN2 (conocida como "*ribosome stalling*"^{65,66}). La consecuencia de la eliminación genética de la GCN2 fue que mejoró el fenotipo motor de la enfermedad⁶⁴ y en este artículo se hipotetiza que la activación de la GCN2 en contexto patológicos podría generar traducción de mensajeros que afectan la integridad del nervio periférico, contribuyendo al

deterioro motor propio de la enfermedad. Por otro lado, en el Laboratorio de Biología de la Neurodegeneración se ha estudiado el rol de la GCN2 en los oligodendrocitos en otro contexto patológico, en un modelo de esclerosis lateral amiotrófica (ELA), que es una enfermedad neurodegenerativa que conlleva un deterioro en la función motora, mediado por alteraciones en la función de las motoneuronas que controlan los movimientos voluntarios y también de los oligodendrocitos. Se eliminó el gen codificante para el dominio quinasa de la GCN2 específicamente en los oligodendrocitos de un modelo murino de la ELA, y esta modificación genética produjo una progresión acelerada del deterioro motor característico de la enfermedad en hembras, en comparación con el grupo control (modelo murino de la enfermedad con oligodendrocitos que expresan la GCN2). En ese sentido, la ausencia de la GCN2 en los oligodendrocitos resultó perjudicial para el desempeño motor de los animales, en ese contexto patológico (resultados no publicados).

En este trabajo de Título se evaluó el rol de la GCN2 en la función motora en animales que recibieron una dieta de composición proteica reducida durante seis semanas. De acuerdo a la revisión bibliográfica realizada, este es el primer antecedente de la evaluación del rol de la GCN2 en la función motora en un contexto fisiológico. En el caso de las hembras, se obtuvo que la quinasa GCN2 es necesaria para la función motora basal. Por otro lado, en los machos se obtuvo que la quinasa es necesaria para la mejora en el desempeño motor observada como consecuencia de la administración de la DBP, pero la ausencia de la GCN2 *per se* no tuvo consecuencias en el desempeño motor de los animales. Estos resultados, en conjunto, dan cuenta de la relevancia de la quinasa GCN2 en el control de la función motora, con diferencias sorprendentes entre machos y hembras y revelan la necesidad de explorar su contribución con más profundidad en contextos fisiológicos.

Posteriormente, para determinar la veracidad de la hipótesis en la cual se basó esta Memoria de Título, se analizó el hipotálamo a nivel **bioquímico**, con el fin de conocer el estado de activación de la GCN2 y de la autofagia. Además, se analizó la corteza motora de los animales, también evaluando la activación de la GCN2 y de la autofagia, de modo de complementar los resultados motores obtenidos e intentar comprender el mecanismo por el cual la quinasa GCN2 interviene en la función motora.

A partir de los análisis de la corteza motora, no se observó la activación de la ISR, atribuible a la GCN2, como consecuencia de la alimentación con la DBP en los cuatro grupos experimentales. En cambio, en el hipotálamo se observó la activación de la ISR, atribuible a la GCN2, en respuesta a la reducción del contenido proteico en la dieta, en los

machos y en las hembras. Por lo tanto, en las condiciones aquí evaluadas, ante la administración de una DBP el hipotálamo responde y la corteza motora no, teniendo la GCN2 una activación tejido-dependiente frente a su estímulo activador. La activación de la GCN2 observada en el hipotálamo en este trabajo de Título concuerda con lo descrito previamente en ratones macho alimentados por doce semanas con una dieta con un 1 %p/p de proteínas¹³, donde se observó un aumento de la fosforilación de eIF2 α en el hipotálamo en el grupo sometido a la DBP respecto al control, y la fosforilación disminuyó al silenciar la expresión de la GCN2 en el hipotálamo. En esta Memoria de Título se determinó que la activación de la GCN2 en el hipotálamo en respuesta a la DBP también ocurre en hembras.

Por otro lado, en ambos tejidos cerebrales analizados, en machos y en hembras, se observaron efectos de la DBP dependientes de la GCN2 en los niveles totales del componente integrador de la ISR, eIF2 α : en los animales WT, la DBP generó una disminución de los niveles de eIF2 α en la corteza motora de los machos y en el hipotálamo de las hembras, que no se detectó en los mismos tejidos de los animales GCN2KO del mismo sexo. En cambio, en el grupo de animales GCN2KO la DBP produjo un aumento de los niveles de eIF2 α , acompañado de un aumento de la forma fosforilada de este factor, específicamente en la corteza motora de las hembras y en el hipotálamo de los machos, mientras que los niveles de eIF2 α se mantuvieron estables ante la DBP en su contraparte WT. Estos resultados sugieren que la quinasa GCN2 regula los niveles de eIF2 α como parte de su mecanismo adaptativo en respuesta a la disminución del contenido proteico en la dieta.

Los niveles de eIF2 α dan cuenta del potencial de activación de la ISR: distintos niveles de eIF2 α también inciden en la disponibilidad del complejo ternario necesario para el inicio de la traducción, y, dado que el mecanismo de acción de la ISR se sustenta en la regulación de la disponibilidad celular del complejo ternario (a través de la fosforilación de eIF2 α ¹), cambios en los niveles totales de eIF2 α afectarán el potencial de activación de la vía. De este modo, es posible especular sobre la existencia de distintos niveles de control de la síntesis proteica ejercidos por la respuesta integrada al estrés: por un lado, se regula la síntesis proteica a través de la fosforilación de eIF2 α , y por otro, la regulación puede ocurrir a partir de la modulación de los niveles totales de este factor. Estos niveles de control permiten regular finamente la homeostasis proteica en la célula y así mantener la capacidad de adaptación del sistema, de acuerdo al propósito principal de la activación de la ISR: la adaptación al estímulo estresor que gatilló la activación de la vía inicialmente.

Cabe mencionar que en la literatura no es frecuente observar el análisis de los niveles de eIF2 α . En esta Memoria de Título, y en la investigación realizada en el Laboratorio de Biología de la Neurodegeneración en general, se ha incorporado el análisis de los niveles de eIF2 α en los experimentos, debido a que se han observado cambios en los niveles de este factor iniciador de la traducción eucarionte. Por ejemplo, en el Laboratorio se analizaron los niveles proteicos totales de eIF2 α en el hipocampo y la corteza cerebral de un modelo murino deficiente genético de la PKR, otra quinasa de la ISR, y se observaron diferencias en los niveles de eIF2 α con respecto a animales WT, que resultaron ser específicos del tejido analizado y de la edad de los animales (resultados no publicados). Estos resultados, en conjunto con los resultados obtenidos en esta Memoria de Título, demuestran que al menos dos de las quinasas de la ISR intervienen en la regulación de los niveles de la subunidad α del factor 2 de iniciación de la traducción eucarionte en el sistema nervioso central. En cuanto a las diferencias en el efecto de la DBP en los niveles de eIF2 α observados en esta investigación, entre animales WT y GCN2KO, sería interesante analizar los cambios en los niveles de eIF2 α inducidos por la disminución del contenido proteico en la dieta en simultáneo para los grupos de animales WT y GCN2KO. Esto permitiría, por un lado, conocer si existen diferencias basales en los niveles del centro integrador de la ISR dependientes del genotipo de los animales y, por otro lado, analizar el efecto de la DBP en los niveles de eIF2 α en los grupos WT y GCN2KO. Este análisis permitiría enmarcar los resultados de los animales de ambos genotipos en una misma escala, y así poder incorporar el contexto, asociado al genotipo, en que se observan los cambios en el centro integrador de la ISR en respuesta a la DBP. Este tipo de análisis sería particularmente interesante para los casos en que no se observaron diferencias en la razón de fosforilación de eIF2 α , pero hubo un aumento tanto de la forma fosforilada como del total de eIF2 α , en respuesta a la DBP, lo cual se observó en la corteza motora de las hembras GCN2KO y en el hipotálamo de los machos del mismo genotipo. De acuerdo a la aproximación habitual en el campo para la evaluación de la activación de la ISR, esto es, el análisis de la razón de fosforilación de eIF2 α , en estos casos se deduce que no hay una activación de la vía. Sin embargo, con los resultados obtenidos no se puede concluir en forma absoluta. En ambos grupos de animales, se observó un marcado aumento en los niveles de la forma fosforilada y del total de eIF2 α , lo cual sugiere que se promueve la activación de la vía. En el grupo sometido a la DBP, se observó una mayor cantidad de la forma fosforilada de eIF2 α , en un contexto en que además están aumentados los niveles de eIF2 α . Al analizar únicamente la proporción de fosforilación de eIF2 α , no se visibiliza este otro nivel de control de la vía, ejercido a través

de la regulación de los niveles totales de eIF2 α , generando conclusiones a partir de resultados que podrían estar incompletos. Estos resultados revelan la necesidad de examinar los mecanismos que regulan los niveles totales de eIF2 α , para lograr una comprensión integral de la respuesta integrada al estrés.

En conclusión, los resultados obtenidos en torno a la fosforilación y los niveles totales de eIF2 α dan cuenta de la heterogeneidad en la función y regulación que ejerce la ISR en distintas regiones del cerebro. Esto evidencia la importancia de abordar el contexto en el cual se estudia la activación de la vía, y no solo estudiar un fenómeno en torno al estímulo utilizado. Es necesario considerar tanto las condiciones estudiadas como las circunstancias en que se aplican para el análisis de un fenómeno como la adaptación del sistema nervioso central a la disminución del contenido proteico en la dieta.

Por otro lado, con respecto a la autofagia en los tejidos cerebrales analizados, y su dependencia de la GCN2, se concluye que la disminución del contenido proteico en la dieta no tuvo un efecto generalizado promotor de la autofagia, como un mecanismo para resolver la menor disponibilidad de aminoácidos. Se obtuvieron resultados sugerentes de un efecto activador de la autofagia de la DBP en los grupos de machos WT, tanto para la corteza motora como para el hipotálamo, y este aumento en la autofagia no se detectó en los mismos tejidos de los machos GCN2KO, mostrando la dependencia de estos efectos de la presencia de la GCN2. Además, en el hipotálamo de los machos WT existe una correlación entre la activación de la ISR y de la autofagia, evaluados a partir de la fosforilación de eIF2 α y de los niveles de LC3-II, respectivamente, mientras que no se presentaron diferencias en los marcadores evaluados en el grupo de machos GCN2KO. **De este modo, de acuerdo a las condiciones evaluadas, la activación de la autofagia podría ser parte del mecanismo adaptativo promovido por la activación de la GCN2 en el hipotálamo en condiciones de una ingesta proteica disminuida durante seis semanas en ratones macho. En estas condiciones, también se estaría promoviendo la autofagia en la corteza motora de los machos, a través de un mecanismo aparentemente independiente de la fosforilación de eIF2 α , pero dependiente de la presencia de la quinasa GCN2, que podría estar mediado por la fosforilación de otros blancos de la GCN2. Por otro lado, los resultados obtenidos a partir de los grupos de hembras sugieren que la autofagia no es parte del mecanismo adaptativo promovido por la GCN2 ante la DBP, en las condiciones aquí evaluadas (Figura 14).** A partir de los resultados obtenidos destaca el hecho de que, frente a un mismo estímulo, en este caso,

la disminución de la composición proteica de la dieta, la respuesta a nivel del hipotálamo y la corteza motora es diferente entre machos y hembras.

Es importante considerar que en esta Memoria de Título se evaluó la activación de la ISR y de la autofagia únicamente al término de las seis semanas de administración de las dietas experimentales (DC y DBP). No se puede descartar un efecto de la DBP previo a la temporalidad específica aquí evaluada. De este modo, existe la posibilidad de que la DBP tenga un efecto activador de la autofagia en el sistema nervioso central, mediado por la GCN2, y que no haya sido detectado en este trabajo debido a que en el periodo evaluado no se presentó ese efecto. Por ejemplo, podría existir un efecto agudo de la GCN2 en la promoción de la autofagia en respuesta a la DBP, y que tras el prolongado tiempo de tratamiento con la DBP se hayan estabilizado estos procesos y se hayan recuperado los niveles de autofagia basales. En ese sentido, evaluar temporalidades distintas de tratamiento con la DBP permitiría caracterizar de mejor manera la activación de la autofagia mediada por la GCN2 en el SNC en respuesta a una disminución del contenido proteico en la dieta. Por otro lado, se analizaron homogeneizados de hipotálamo y corteza cerebral, los cuales representan la composición de distintos tipos celulares, tales como neuronas, glías, células que infiltraron desde el torrente sanguíneo, entre otros. De este modo, existe la posibilidad que los distintos tipos celulares respondan a la disminución de la ingesta proteica en forma diferencial, pudiendo haber una activación de la GCN2 y/o de la autofagia tipo celular-dependiente. En este sentido, la aplicación de otras técnicas, por ejemplo, microscopía electrónica, inmunofluorescencia, o bien, intervenir algún proceso intermedio río abajo de la activación de la GCN2, o incluso el proceso de autofagia directamente, sería conveniente para examinar el rol de la GCN2 en la activación de la autofagia ante la administración de la DBP en forma específica para las neuronas u otro tipo celular de interés. No obstante, a pesar de las limitaciones expuestas sobre las técnicas empleadas, cabe destacar que aun tratándose de una mezcla de tipos celulares, en que los cambios sutiles no pueden ser percibidos, se lograron detectar cambios en los marcadores de la activación de la ISR y de la autofagia en los tejidos evaluados, indicativos de su activación en respuesta a la DBP. Por lo tanto, los resultados obtenidos a partir de los marcadores evaluados representan evidencia contundente respecto de la activación de la ISR y de la autofagia en respuesta a la disminución del contenido proteico en la dieta, permitiendo formular conclusiones robustas.

Finalmente, es relevante mencionar que la mantención de la homeostasis proteica es fundamental en las neuronas, dada su condición no proliferativa y, por lo mismo, las neuronas poseen mecanismos alternativos que permiten su adaptación a condiciones adversas. Estos mecanismos se han estudiado en otra quinasa de la ISR, la quinasa PERK, la cual se activa en condiciones de estrés del retículo endoplásmico (RE, ante la presencia de proteínas mal o desplegadas)¹. Wolzak y cols.⁶⁷ evaluaron la respuesta de astrocitos y neuronas genéticamente deficientes de PERK frente a un mismo estímulo inductor de estrés del RE. Los autores observaron que en los astrocitos deficientes genéticos de PERK, el inductor de estrés del RE, tal como se esperaba, no indujo una activación de la ISR, evaluado a través de los niveles de fosforilación de eIF2 α y de la síntesis proteica. En cambio, en las neuronas deficientes de PERK, el mismo inductor de estrés del RE indujo la fosforilación de eIF2 α y la inhibición de la síntesis proteica dependiente de la ISR. La activación de los mecanismos adaptativos de la ISR observada en ausencia de la quinasa PERK resultó ser mediada por otra quinasa de la ISR, la quinasa HRI. Este sistema de compensación detectado en este estudio, que en este contexto está mediado por la HRI, refleja la existencia de un sistema de “respaldo”, específico en las neuronas, para gatillar los necesarios mecanismos adaptativos ante situaciones de pérdida de homeostasis. Esto amplía la perspectiva en el estudio de la ISR, y aplica también en los resultados obtenidos en esta Memoria de Título, porque da cuenta de que en las neuronas existen niveles de control adicionales de la ISR y condiciones particulares que no se dan en otros tipos celulares. Así, para la interpretación de resultados negativos que no concuerdan con lo esperado, según la información disponible en la literatura para la misma vía de señalización, es importante considerar estos efectos compensatorios, que son considerados mecanismos de resiliencia celular. Sin ir más lejos, se podría especular sobre la existencia de un mecanismo de compensación específicamente en la corteza motora de los machos GCN2KO: la fosforilación de eIF2 α en los animales sometidos a la DBP estaba aumentada respecto al grupo control. Es decir, en ausencia de la quinasa GCN2 se observó la activación de la ISR en respuesta al estímulo activador de la GCN2, la DBP. En resumen, en base al antecedente expuesto sobre la existencia de un mecanismo compensatorio específico de las neuronas⁶⁷, es posible concluir que, por un lado, la actividad de la ISR, es decir, su capacidad de controlar la síntesis proteica en condiciones de estrés, es fundamental para la adaptación de las neuronas, al menos en condiciones de estrés del RE. Por otro lado, este antecedente evidencia la complejidad de las neuronas y da cuenta de la necesidad de considerar esta complejidad al momento de estudiar este tipo celular y

el sistema nervioso central en general, recalcando la importancia del contexto en el cual se estudian los procesos biológicos. Asimismo, esta noción, en conjunto con los resultados obtenidos en esta Memoria de Título, enfatizan la relevancia de considerar el contexto en el cual se estudia la activación de la respuesta integrada al estrés.

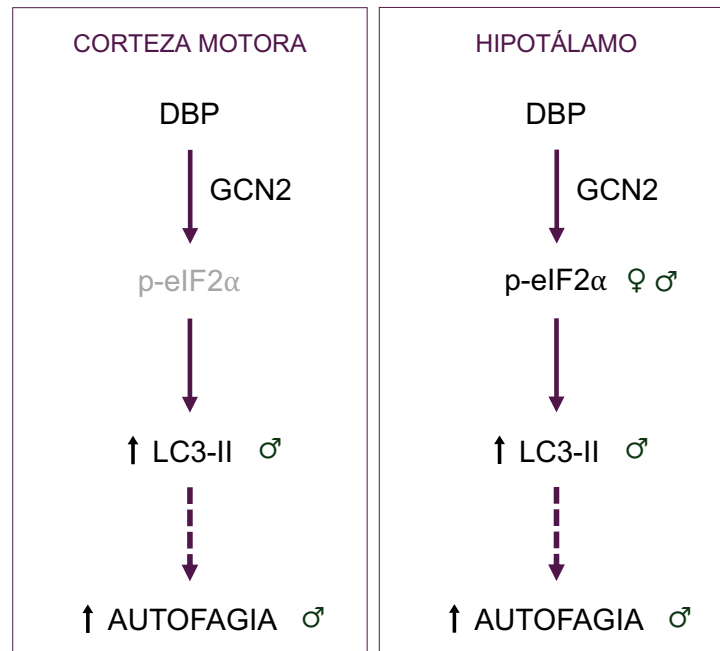


Figura 14. Modelo de la regulación ejercida por la quinasa GCN2 en la autofagia en la corteza motora y el hipotálamo de ratón. En la corteza motora, la dieta baja en proteínas (DBP) no tiene efectos en la fosforilación de eIF2α (p-eIF2α), pero sí produce un aumento de LC3-II en los machos (♂), en forma GCN2-dependiente. El aumento en los niveles de LC3-II sugiere (flecha discontinua) un aumento en la autofagia en la corteza motora. En cambio, en el hipotálamo, la DBP produce un aumento en la fosforilación de eIF2 en forma GCN2-dependiente, en machos y en hembras (♀), y a la vez produce un aumento en los niveles de LC3-II en machos, también dependiente de la quinasa GCN2, sugiriendo un aumento en la autofagia en el hipotálamo de los machos en respuesta a la DBP.

7.- Conclusiones

A partir del trabajo realizado en esta Memoria de Título, es posible concluir que:

1.- En ratones hembra, la quinasa GCN2 es esencial para la mantención del peso corporal y la glicemia en condiciones de una ingesta proteica reducida durante seis semanas y, además, cumple un rol en el control de la función motora en condiciones basales.

2.- En ratones macho, la disminución del contenido proteico en la dieta genera una disminución independiente de la GCN2 en el peso corporal, y promueve una disminución transitoria en la glicemia y una mejora en la función motora en forma GCN2-dependiente.

3.- La dieta baja en proteínas, en las condiciones evaluadas, activa la ISR mediante la GCN2 en el SNC en forma tejido-dependiente: la ISR se activó en el hipotálamo, pero no en la corteza motora, tanto en machos como en hembras.

4.- La dieta baja en proteínas, en las condiciones de esta investigación, parece promover un aumento en la autofagia en el SNC en forma sexo-dependiente: se observó la probable activación GCN2-dependiente de la autofagia en la corteza motora y el hipotálamo de los machos, no así en hembras.

5.- La quinasa GCN2 regula los niveles de eIF2 α en respuesta a una dieta baja en proteínas, en la corteza motora y el hipotálamo de ratones hembra y macho, sugiriendo la existencia de un control adicional en la activación de la respuesta integrada al estrés, mediante la modulación de los niveles del centro integrador de la vía, eIF2 α .

Finalmente, con respecto a la hipótesis propuesta en esta Memoria de Título, se concluye que la activación de la autofagia podría ser parte del mecanismo adaptativo de la GCN2, en respuesta a una disminución en el contenido proteico en la dieta, en el sistema nervioso central de ratones macho, no así en hembras.

8.- Proyecciones

Los resultados obtenidos a partir del trabajo realizado en esta Memoria de Título mostraron, por una parte, la complejidad de la respuesta del SNC ante una dieta con baja composición proteica y, por otra, mostraron un papel inesperado de la quinasa GCN2 en la regulación de los parámetros evaluados. Además, los cambios observados en los niveles de eIF2 α sugieren una regulación adicional de la ISR. Con estos resultados es posible proponer proyecciones de este trabajo, siendo algunos ejemplos las siguientes:

Se observó que, en respuesta a la disminución del contenido proteico en la dieta, los niveles de eIF2 α presentaron variaciones en forma GCN2-dependiente. Este resultado sugiere que existe un nivel de control adicional de la ISR, que impacta directamente en el potencial de activación de la vía. Este nivel de regulación podría sumarse a los ya descritos, como lo son la desfosforilación de eIF2 α , la degradación de los sensores luego de su activación o la localización de los componentes de la ISR en dominios particulares de la célula. Esta nueva regulación podría ocurrir a nivel transcripcional, traduccional, o degradativo. También resultaría interesante explorar si la regulación de la respuesta de la ISR mediante el control de los niveles de eIF2 α es ejercida únicamente por la quinasa GCN2 o es un mecanismo común de las quinasas de eIF2 α .

Nuestros resultados mostraron que la GCN2 ante una DBP regula, independientemente de la fosforilación de eIF2 α , los niveles de otras proteínas. Es relevante conocer a través de qué mecanismo ocurre esta regulación. Se ha descrito que PERK, otra quinasa de eIF2 α , puede ejercer su efecto a través de la fosforilación de otros blancos⁶⁸. Sería interesante examinar si el rol adaptativo de la GCN2 lo ejerce a través de la fosforilación de otros blancos, y conocer la identidad de estos.

Un aspecto interesante de los resultados obtenidos fueron las numerosas diferencias observadas en la respuesta a la DBP de machos y hembras. En algunos casos, se observó una respuesta completamente opuesta entre ambos sexos, a partir de lo cual surgen diversas interrogantes. Sería interesante conocer qué elemento propio de cada sexo es el que marca la diferencia en la respuesta a la disminución del contenido proteico en la dieta, ya sea a nivel hormonal, metabólico, etc. Por ejemplo, los resultados indicaron que la autofagia podría aumentar en el cerebro en respuesta a la DBP en machos, pero no en hembras, sugiriendo diferencias importantes en el mecanismo adaptativo a la escasez de aminoácidos entre ambos sexos. En este contexto, algunos aspectos esenciales de la ISR que podrían ayudar a explicar los resultados obtenidos aún no se han descrito: ¿cuál es el

patrón de expresión de las quinasas y de eIF2 en machos y hembras en el sistema nervioso?; ante un mismo estímulo ¿son distintos los umbrales de activación de la ISR en machos y hembras? Explorar estas preguntas representa una proyección interesante de este estudio.

Las funciones en las que se ha involucrado a la ISR abarcan la inmunidad, el metabolismo, las funciones del sistema nervioso central, entre otras¹. Además, dado que la vía participa en patologías como el cáncer, la diabetes y la neurodegeneración¹, ha sido explorada como un blanco terapéutico para diversas enfermedades^{2,69,70,71}. Por lo tanto, las proyecciones que aquí se plantean no solo permitirían entender el mecanismo adaptativo ejercido por la GCN2, sino además extender este conocimiento a, eventualmente, otras quinasas y a condiciones patológicas. También, los resultados obtenidos en esta Memoria de Título resaltan la necesidad de considerar ambos sexos en la investigación científica, tanto para la ISR como para otras vías de señalización, ya sea en el estudio de los procesos y fenómenos biológicos o en la aplicación de los resultados obtenidos en otros contextos, por ejemplo, el clínico.

9.- Bibliografía

1. Costa-Mattioli, M., Walter, P. The integrated stress response: From mechanism to disease. *Science*. 2020; 368(6489). eaat5314.
2. Falcón, P., *et al.* Nutrient sensing and redox balance: GCN2 as a new integrator in aging. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019: 5730532.
3. Pakos-Zebrucka, K. *et al.* The integrated stress response. *EMBO Rep*. 2016; 17(10): 1374-95.
4. Wek, R.C., Jackson, B.M., Hinnebusch, A.G. Juxtaposition of Domains Homologous to Protein Kinases and Histidyl-TRNA Synthetases in GCN2 Protein Suggests a Mechanism for Coupling GCN4 Expression to Amino Acid Availability. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86(12): 4579-83.
5. Dever, T.E., *et al.* Phosphorylation of Initiation Factor 2 α by Protein Kinase GCN2 Mediates Gene-Specific Translational Control of GCN4 in Yeast. *Cell*. 1992;68(3): 585-96.
6. Harding, H.P., *et al.* An Integrated Stress Response Regulates Amino Acid Metabolism and Resistance to Oxidative Stress. *Mol Cell*. 2003; 11: 619-33.
7. Costa-Mattioli, M., *et al.* eIF2 α Phosphorylation Bidirectionally Regulates the Switch from Short- to Long-Term Synaptic Plasticity and Memory. *Cell*. 2007;129(1):195-206.
8. Costa-Mattioli, M., *et al.* Translational control of hippocampal synaptic plasticity and memory by the eIF2 α kinase GCN2. *Nature*. 2005; 436(7054):1166-70.
9. Oliveira, M.M., *et al.* Correction of eIF2-dependent defects in brain protein synthesis, synaptic plasticity, and memory in mouse models of Alzheimer's disease. *Sci Signal*. 2021;14(668).
10. Mao, D., *et al.* De novo EIF2AK1 and EIF2AK2 Variants Are Associated with Developmental Delay, Leukoencephalopathy, and Neurologic Decompensation. *Am J Hum Genet*. 2020; 106(4):570-83.
11. Bond, S., *et al.* The integrated stress response and phosphorylated eukaryotic initiation factor 2 α in neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2020; 79(2):123-43.
12. Roussou, I., Thireos, G., Hauge, B.M. Transcriptional-Translational Regulatory Circuit in *Saccharomyces Cerevisiae* Which Involves the GCN4 Transcriptional Activator and the GCN2 Protein Kinase. *Mol Cell Biol*. 1988;8(5): 2132-9.
13. Wu, Y., *et al.* Very-low-protein diets lead to reduced food intake and weight loss, linked to inhibition of hypothalamic mTOR signaling, in mice. *Cell Metab*. 2021;33(5):888-904.
14. Wek, S.A., Zhu, S., Wek, R.C. The Histidyl-tRNA Synthetase-Related Sequence in the eIF-2 Protein Kinase GCN2 Interacts with tRNA and Is Required for Activation in Response to Starvation for Different Amino Acids. *Mol Cell Biol*. 1995;15(8):4497-4506.
15. Romano, P.R., *et al.* Autophosphorylation in the Activation Loop Is Required for Full Kinase Activity In Vivo of Human and Yeast Eukaryotic Initiation Factor 2 Kinases PKR and GCN2. Vol 18.; 1998.

16. Masson, G.R. Towards a model of GCN2 activation. *Biochem Soc Trans.* 2019;47(5):1481-8.
17. Castilho, B.A., *et al.* Keeping the eIF2 alpha kinase Gcn2 in check. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2014;1843(9):1948-68.
18. Hinnebusch, A.G. Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu Rev Microbiol.* 2005; 59:407-50.
19. Kilberg, M.S., *et al.* Nutritional control of gene expression: how mammalian cells respond to amino acid limitation. *Annu Rev Nutr.* 2005;25:59-85.
20. Ye, J., *et al.* The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation. *EMBO J.* 2010; 29(12):2082-96.
21. B'Chir, W., *et al.* The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41(16):7683-99.
22. Parzych, K.R., Klionsky, D.J. An overview of autophagy: Morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal.* 2014; 20(3):460-73.
23. Carroll, B., Korolchuk, V.I., Sarkar, S. Amino acids and autophagy: cross-talk and co-operation to control cellular homeostasis. *Amino Acids.* 2015;47(10):2065-88.
24. Takeshige, K., *et al.* Autophagy in Yeast Demonstrated with Proteinase-deficient Mutants and Conditions for its Induction. *J Cell Biol.* 1992; 119(2):301-11.
25. Dai, R., *et al.* Autophagy in renal fibrosis: Protection or promotion? *Front Pharmacol.* 2022;13.
26. Gerónimo-Olvera, C., Massieu, L. Autophagy as a Homeostatic Mechanism in Response to Stress Conditions in the Central Nervous System. *Mol Neurobiol.* 2019; 56(9):6594-608.
27. Komatsu, M., *et al.* Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature.* 2006; 441(7095):880-4.
28. Tallóczy, Z., *et al.* Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2 α kinase signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2002; 99(1):190-5.
29. Ye, J., *et al.* GCN2 sustains mTORC1 suppression upon amino acid deprivation by inducing Sestrin2. *Genes Dev.* 2015; 29(22):2331-6.
30. Kim, J.S., *et al.* Sestrin2 inhibits mTORC1 through modulation of GATOR complexes. *Sci Rep.* 2015;5.
31. Maurin, A.C., *et al.* GCN2 upregulates autophagy in response to short-term deprivation of a single essential amino acid. *Autophagy Reports.* 2022; 1(1):119-42.
32. Kaushik, S., *et al.* Autophagy in hypothalamic AgRP neurons regulates food intake and energy balance. *Cell Metab.* 2011; 14(2):173-83.
33. Maurin, A.C., *et al.* Hypothalamic eIF2 α signaling regulates food intake. *Cell Rep.* 2014; 6(3):438-44.
34. Blouet, C., *et al.* Mediobasal hypothalamic leucine sensing regulates food intake through activation of a hypothalamus-brainstem circuit. *Journal of Neuroscience.* 2009; 29(26):8302-11.
35. Elizondo-Vega, R.J., Recabal, A., Oyarce, K. Nutrient Sensing by Hypothalamic Tanycytes. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019 Apr 16; 10:244.

36. Hu, X., Guo, F. Amino Acid Sensing in Metabolic Homeostasis and Health. *Endocr Rev.* 2021; 42(1):56-76.
37. Blouet, C., Schwartz, G.J. Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis. *Behavioural Brain Research.* 2010; 209(1):1-12.
38. Heeley, N., Blouet, C. Central Amino Acid Sensing in the Control of Feeding Behavior. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2016 Nov 23; 7:148.
39. Bröer, S., Gauthier-Coles, G. Amino Acid Homeostasis in Mammalian Cells with a Focus on Amino Acid Transport. *Journal of Nutrition.* 2022; 152(1):16-28.
40. She, P., *et al.* General control nonderepressible 2 (GCN2) kinase protects oligodendrocytes and white matter during branched-chain amino acid deficiency in mice. *Journal of Biological Chemistry.* 2013; 288(43):31250-60.
41. Maurin, A.C., *et al.* The GCN2 kinase biases feeding behavior to maintain amino acid homeostasis in omnivores. *Cell Metab.* 2005; 1(4):273-7.
42. Jonsson, W.O., *et al.* Activation and execution of the hepatic integrated stress response by dietary essential amino acid deprivation is amino acid specific. *FASEB Journal.* 2022; 36(7).
43. Leib, D.E., Knight, Z.A. Re-examination of Dietary Amino Acid Sensing Reveals a GCN2-Independent Mechanism. *Cell Rep.* 2015; 13(6):1081-9.
44. GraphPad Prism version 9.0.1 (128) for macOS. January 21, 2021. GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com.
45. Schindelin, J., *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012; 9(7):676-82.
46. Morton, G.J., *et al.* Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature.* 2006; 443(7109):289-95.
47. Osmon, K.J.L., *et al.* Battery of behavioral tests assessing general locomotion, muscular strength, and coordination in mice. *Journal of Visualized Experiments.* 2018;2018(131).
48. Brooks, S.P., Dunnett, S.B. Tests to assess motor phenotype in mice: A user's guide. *Nat Rev Neurosci.* 2009; 10(7):519-29.
49. Grillner, S., El Manira, A. Current principles of motor control, with special reference to vertebrate locomotion. *Physiol Rev.* 2020; 100(1):271-320.
50. Chen, W., *et al.* Involvement of general control nonderepressible kinase 2 in cancer cell apoptosis by posttranslational mechanisms. *Mol Biol Cell.* 2015; 26(6):1044-57.
51. Klionsky, D.J., *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition) *Autophagy.* 2021; 17(1):1-382.
52. Mizushima, N., Yoshimori, T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy.* 2007; 3(6):542-5.
53. Jin, H.R., *et al.* Ginseng metabolite Protopanaxadiol induces Sestrin2 expression and AMPK activation through GCN2 and PERK. *Cell Death Dis.* 2019; 10(4).
54. Laeger, T., *et al.* Metabolic Responses to Dietary Protein Restriction Require an Increase in FGF21 that Is Delayed by the Absence of GCN2. *Cell Rep.* 2016; 16(3):707-16.
55. Laeger, T., *et al.* FGF21 is an endocrine signal of protein restriction. *Journal of Clinical Investigation.* 2014; 124(9):3913-22.

56. Bröer, S. Amino acid transporters as modulators of glucose homeostasis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2022; 33(2):120-35.
57. Xiao, F., *et al.* Effects of individual branched-chain amino acids deprivation on insulin sensitivity and glucose metabolism in mice. *Metabolism*. 2014; 63(6):841-50.
58. Guo, F., Cavener, D.R. The GCN2 eIF2 α Kinase Regulates Fatty-Acid Homeostasis in the Liver during Deprivation of an Essential Amino Acid. *Cell Metab*. 2007; 5(2):103-14.
59. Scheuner, D., *et al.* Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell*. 2001 Jun; 7(6):1165-76.
60. Xu, X., *et al.* GCN2 regulates the CCAAT enhancer binding protein beta and hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013; 305:1007-17.
61. Yu, D., *et al.* The adverse metabolic effects of branched-chain amino acids are mediated by isoleucine and valine. *Cell Metab*. 2021; 33(5):905-22.e6.
62. Blandino-Rosano, M., *et al.* mTORC1 signaling and regulation of pancreatic β -cell mass. *Cell Cycle*. 2012; 11(10):1892-902.
63. Newsholme, P., *et al.* Amino acid metabolism, insulin secretion and diabetes. *Biochem Soc Trans*. 2007 Nov; 35(Pt 5):1180-6.
64. Spaulding, E.L., *et al.* The integrated stress response contributes to tRNA synthetase-associated peripheral neuropathy. *Science*. 2021 Sep 3; 373(6559):1156-61.
65. Ishimura, R., *et al.* Activation of GCN2 kinase by ribosome stalling links translation elongation with translation initiation. *Elife*. 2016 Apr 16;5: e14295.
66. Inglis, A.J., *et al.* Activation of GCN2 by the ribosomal P-stalk. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Mar 12; 116(11):4946-54.
67. Wolzak, K., *et al.* Neuron-specific translational control shift ensures proteostatic resilience during ER stress. *EMBO J*. 2022; 41(16).
68. Cullinan, S.B., *et al.* Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol Cell Biol*. 2003 Oct; 23(20):7198-209.
69. Tian, X., *et al.* Targeting the Integrated Stress Response in Cancer Therapy. *Front Pharmacol*. 2021 Sep 24; 12:747837.
70. Martínez, N.W., Gómez, F.E., Matus, S. The Potential Role of Protein Kinase R as a Regulator of Age-Related Neurodegeneration. *Front Aging Neurosci*. 2021 Apr 28; 13:638208.
71. Yuan, J., *et al.* Genetic and Pharmacological Inhibition of GCN2 Ameliorates Hyperglycemia and Insulin Resistance in Type 2 Diabetic Mice. *Antioxidants (Basel)*. 2022 Aug 16; 11(8):1584.

10.- Anexos

En esta sección se incluyen las Figuras suplementarias y las Tablas asociadas a esta Memoria de Título.

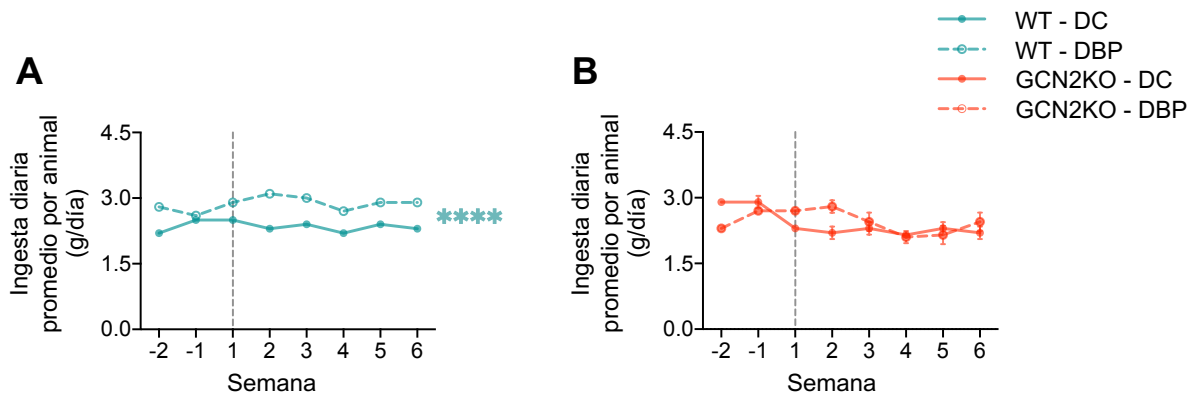


Figura S1. Evaluación de la ingesta de alimento de las hembras sometidas a la dieta baja en proteínas. Animales silvestres (WT) y deficientes en el gen codificante para la quinasa GCN2 (GCN2KO) fueron alimentados durante seis semanas con una dieta control (DC) y una dieta baja en proteínas (DBP). Los animales fueron alimentados con la DC por dos semanas (indicadas como semanas -2 y -1) para su habituación. La semana 1 corresponde a la primera semana de tratamiento con la DC y la DBP (indicada con una línea gris discontinua). Cada semana se entregó una cantidad exacta de alimento a cada jaula, y a la semana siguiente se pesó el alimento restante. La diferencia entre ambas cantidades se consideró como la cantidad de alimento consumido. Esta cantidad se dividió por el número de animales en cada jaula, y por los días transcurridos entre una medición y otra, para obtener valores de ingesta diaria promedio por cada animal en gramos por cada día. **A)** Ingesta diaria promedio de las hembras WT alimentadas con la DC (n=1 jaula con seis animales) y la DBP (n=1 jaula con seis animales). **B)** Consumo de alimento diario promedio de las hembras GCN2KO alimentadas con la DC (n=2 jaulas, con cinco y tres animales) y la DBP (semanas -2 y -1 n=1 jaula con tres animales, semanas 1 a 6 n=2 jaulas con tres animales cada una). Se graficó la media \pm la desviación estándar. Se evaluó el efecto de la dieta en los grupos WT y GCN2KO considerando los valores de ingesta diaria promedio por animal de las semanas 1 a la 6 como un conjunto. Se aplicó el Test de t de Welch para todos los análisis. **** $p < 0,0001$.

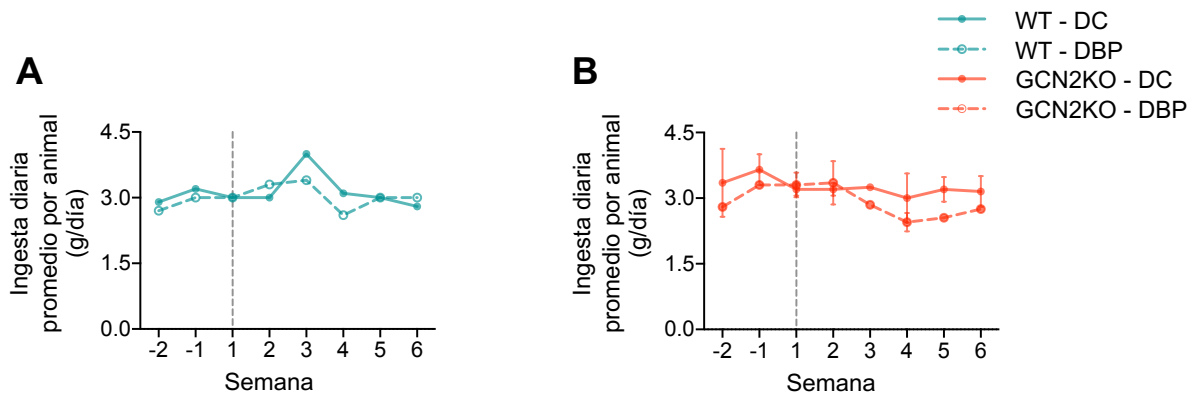


Figura S2. Evaluación de la ingesta de alimento de los machos sometidos a la dieta baja en proteínas. Animales silvestres (WT) y deficientes en el gen codificante para la quinasa GCN2 (GCN2KO) fueron alimentados durante seis semanas con una dieta control (DC) y una dieta baja en proteínas (DBP). Los animales fueron alimentados con la DC por dos semanas (indicadas como semanas -2 y -1) para su habituación. La semana uno corresponde a la primera semana de tratamiento con la DC y la DBP (indicada con una línea gris discontinua). Cada semana se entregó una cantidad exacta de alimento a cada jaula, y a la semana siguiente se pesó el alimento restante en las jaulas. La diferencia entre ambas cantidades se consideró como la cantidad de alimento consumido. Esta cantidad se dividió por el número de animales en cada jaula, y por los días transcurridos entre una medición y otra, para obtener valores de ingesta diaria promedio por cada animal en gramos por cada día. **A)** Ingesta diaria promedio de los machos WT alimentados con la DC (n=1 jaula con seis animales) y la DBP (n=1 jaula con seis animales). **B)** Ingesta diaria promedio de los machos GCN2KO sometidos a la DC (n=2 jaulas, con cinco y dos animales) y a la DBP (semanas -2 y -1 n=1 jaula con cuatro animales, semanas 1 a 6 n=2 jaulas, con cuatro y dos animales). Se graficó la media \pm la desviación estándar. Se evaluó el efecto de la dieta en los grupos WT y GCN2KO considerando los valores de ingesta diaria promedio por animal de las semanas 1 a la 6 como un conjunto. Se aplicó el Test de t de Welch para el análisis de la ingesta de los machos WT, y la prueba de Mann-Whitney para los animales GCN2KO.

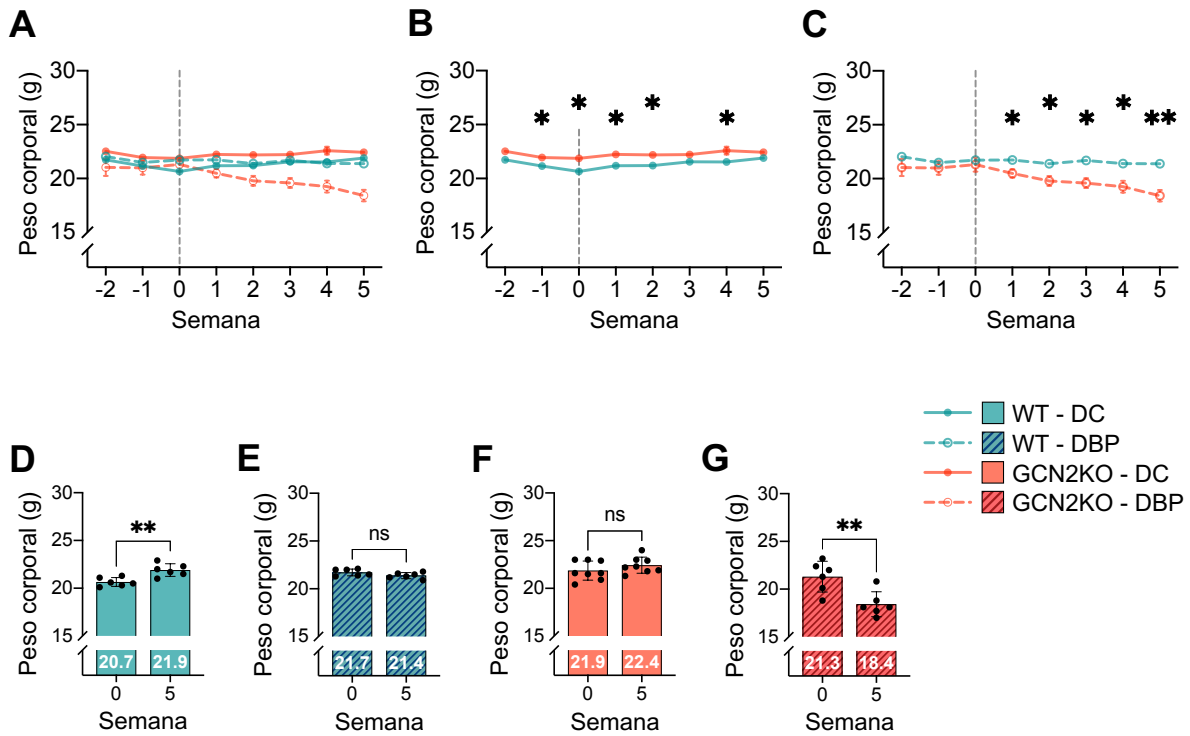


Figura S3. Evaluación del peso corporal de las hembras sometidas a la dieta baja en proteínas. Animales silvestres (WT) y deficientes en el gen codificante para la quinasa GCN2 (GCN2KO) fueron alimentados durante seis semanas con una dieta control (DC) y una dieta baja en proteínas (DBP). Durante este periodo se realizaron mediciones semanales de peso corporal. Los animales fueron alimentados con la DC por dos semanas (indicadas como S -2 y -1) para su habituación. La semana (S) cero corresponde al tiempo en que se inició el tratamiento con la DC y la DBP (indicada con una línea gris discontinua). **A)** Peso corporal de las hembras WT y GCN2KO graficado en conjunto (sin indicar la significancia estadística de las comparaciones por dieta consumida). **B)** Peso corporal de las hembras WT (n=6) y GCN2KO (n=8) sometidas a la DC. **C)** Peso corporal de las hembras WT (n=6) y GCN2KO (S -2 n=3, S -1 a S 5 n=6) sometidas a la DBP. **D) - G)** Se analizó el cambio en el peso corporal entre la primera (S 0) y la última (S 5) semana de administración de las dietas, para las hembras WT alimentadas con la DC (**D**) y la DBP (**E**), y las hembras GCN2KO sometidas a las mismas dietas (DC (**F**) y DBP (**G**)). El valor de la media se indica en blanco en la base de cada barra. Se graficó la media \pm el error estándar (**A - C**) o la media \pm la desviación estándar (**D - G**). Se aplicó el Test de t de Welch para todos los análisis, excepto en **C** para las semanas 2 y 4 (prueba de Mann-Whitney). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

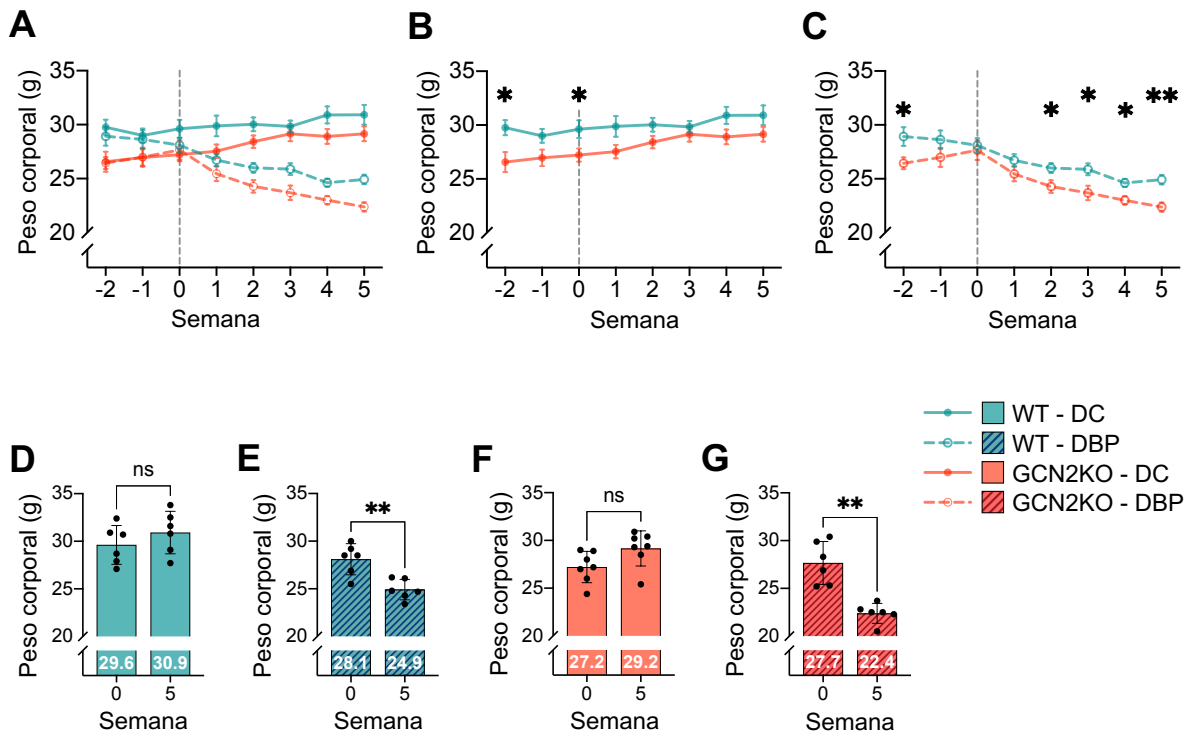


Figura S4. Evaluación del peso corporal de los machos sometidos a la dieta baja en proteínas. Animales silvestres (WT) y deficientes en el gen codificante para la quinasa GCN2 (GCN2KO) fueron alimentados durante seis semanas con una dieta control (DC) y una dieta baja en proteínas (DBP). Durante este periodo se realizaron mediciones semanales de peso corporal. Los animales fueron alimentados con la DC por dos semanas (indicadas como S -2 y -1) para su habituación. La semana (S) cero corresponde al tiempo en que se inició el tratamiento con la DC y la DBP (indicada con una línea gris discontinua). **A)** Peso corporal de los machos WT y GCN2KO graficado en conjunto (sin indicar la significancia estadística de las comparaciones por dieta consumida). **B)** Peso corporal de los machos WT (n=6) y GCN2KO (n=7) sometidos a la DC. **C)** Peso corporal de los machos WT (n=6) y GCN2KO (S -2 n=4, S -1 a S 5 n=6) sometidos a la DBP. **D) - G)** Se analizó el cambio en el peso corporal entre la primera (S 0) y la última (S 5) semana de administración de las dietas, para los machos WT alimentados con la DC (**D)** y la DBP (**E)**, y los machos GCN2KO sometidos a las mismas dietas (DC (**F)** y DBP (**G**)). El valor de la media se indica en blanco en la base de cada barra. Se graficó la media \pm el error estándar (**A - C**) o la media \pm la desviación estándar (**D - G**). Se aplicó el Test de t de Welch para todos los análisis. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

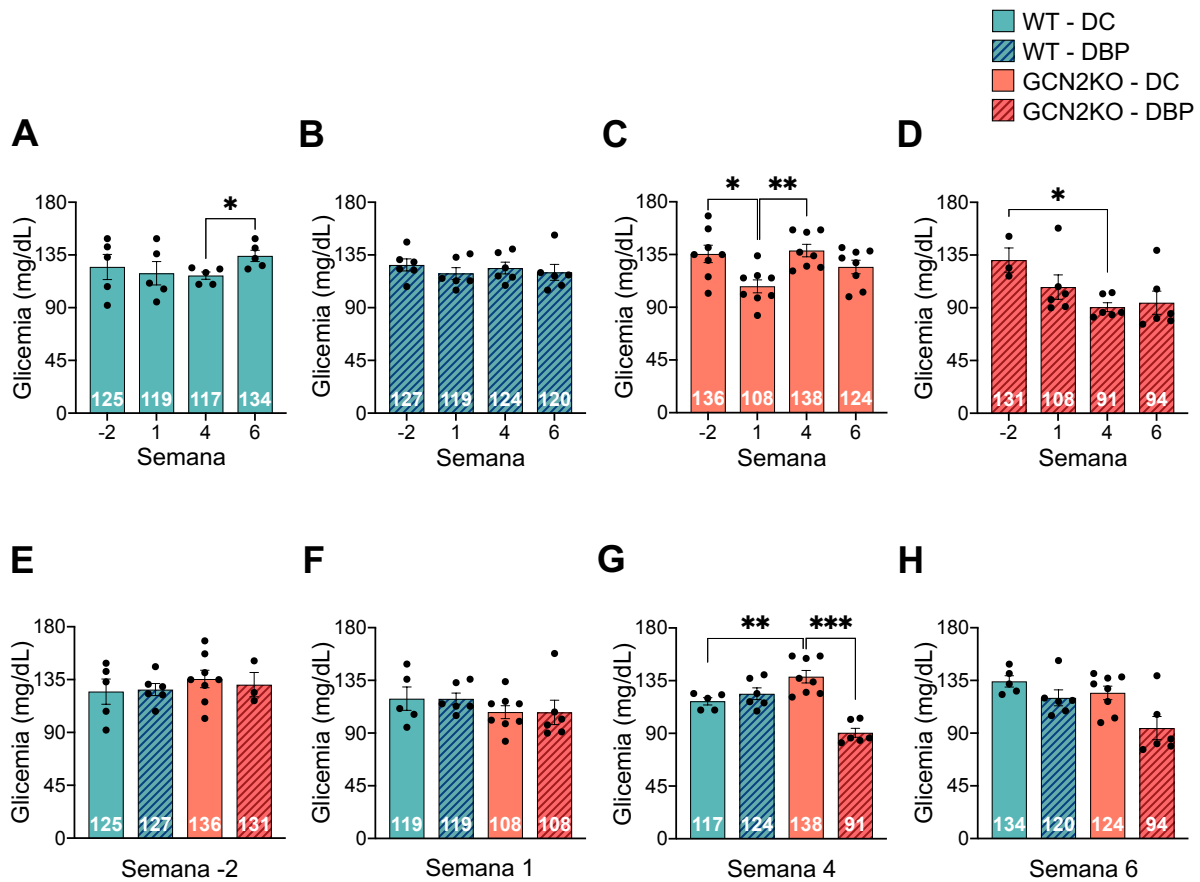


Figura S5. Evaluación de la glicemia de las hembras sometidas a la dieta baja en proteínas. Animales silvestres (WT) y deficientes en el gen codificante para la quinasa GCN2 (GCN2KO) fueron alimentados durante seis semanas con una dieta control (DC) y una dieta baja en proteínas (DBP). Los animales fueron alimentados previamente con la DC por dos semanas (S) para su habituación. Se realizaron mediciones de la glicemia previo al inicio del tratamiento (S -2) y durante la primera, cuarta y sexta semana. La medición de glicemia correspondiente a la semana 1 se realizó tras dos días con las dietas. Previo a las mediciones de la glicemia los animales se sometieron a un ayuno de seis horas. **A) – D)** Se analizó el efecto de la dieta administrada en el tiempo para las hembras WT alimentadas con la DC (**A**) y la DBP (**B**), y para las hembras GCN2KO sometidas a las mismas dietas (DC (**C**) y DBP (**D**)), evaluando todos los intervalos de tiempo. **E) – H)** Se analizó el efecto de la dieta y del genotipo en la glicemia de las hembras para las mediciones realizadas en la S -2 (**E**), S 1 (**F**), S 4 (**G**) y S 6 (**H**). Para todos los resultados se graficó la media \pm el error estándar. El valor de la media se indica en blanco en la base de cada barra. WT DC n=5, DBP n=6; GCN2KO DC n=8, DBP n=3 en S -2 y n=6 en el resto de las mediciones. Se aplicó el Test de t de Welch para todos los análisis, excepto para las comparaciones con el grupo WT DC en la S 4 y con el grupo GCN2KO DBP en las semanas 1, 4 y 6 (prueba de Mann-Whitney). * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

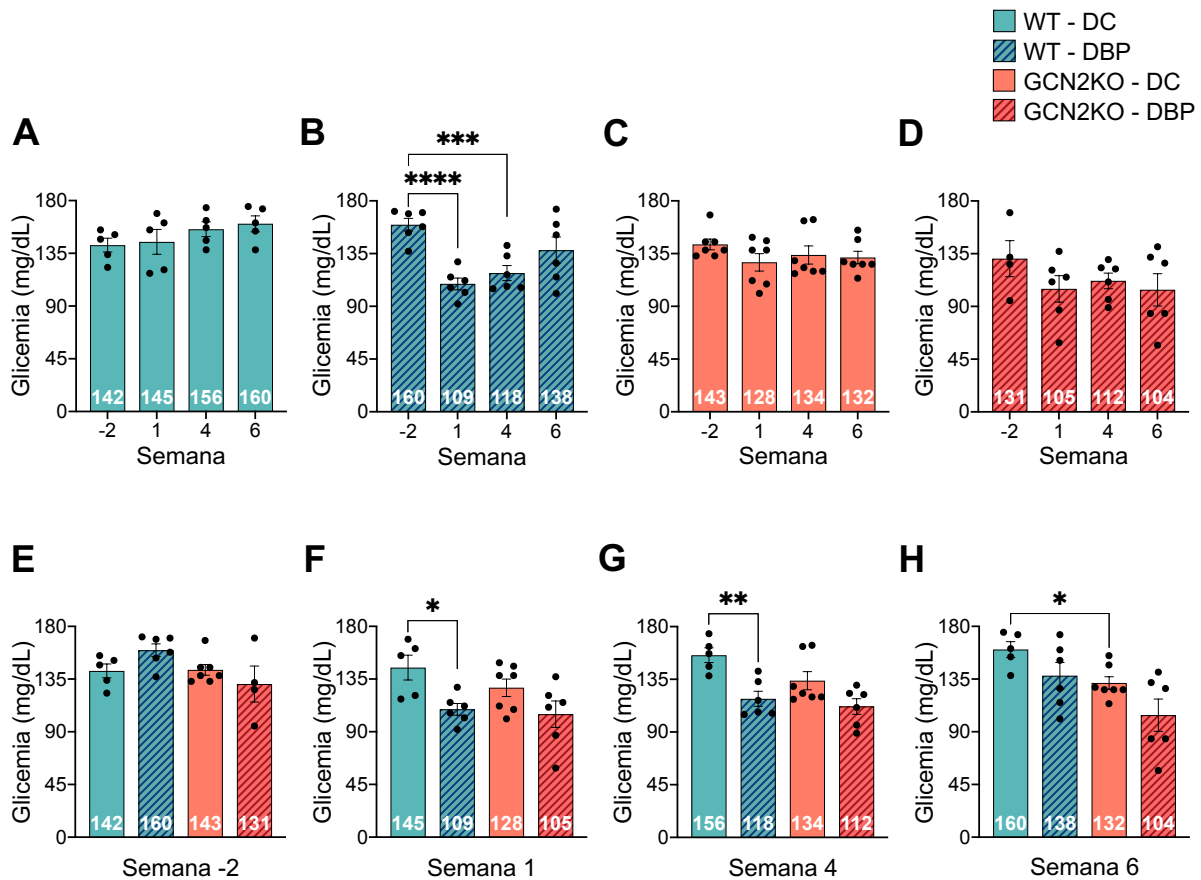


Figura S6. Evaluación de la glicemia de los machos sometidos a la dieta baja en proteínas. Animales silvestres (WT) y deficientes en el gen codificante para la quinasa GCN2 (GCN2KO) fueron alimentados durante seis semanas con una dieta control (DC) y una dieta baja en proteínas (DBP). Los animales fueron alimentados previamente con la DC por dos semanas (S) para su habituación. Se realizaron mediciones de la glicemia previo al inicio del tratamiento (S -2) y durante la primera, cuarta y sexta semana. La medición de glicemia correspondiente a la semana 1 se realizó tras dos días con las dietas. Previo a las mediciones de la glicemia los animales se sometieron a un ayuno de seis horas. **A) – D)** Se analizó el efecto de la dieta administrada en el tiempo para los machos WT alimentados con la DC (**A**) y la DBP (**B**), y para los machos GCN2KO sometidos a las mismas dietas (DC (**C**) y DBP (**D**)), evaluando todos los intervalos de tiempo. **E) – H)** Se analizó el efecto de la dieta y del genotipo en la glicemia de los machos para las mediciones realizadas en la S -2 (**E**), S 1 (**F**), S 4 (**G**) y S 6 (**H**). Para todos los resultados se graficó la media \pm el error estándar. El valor de la media se indica en blanco en la base de cada barra. WT DC n=5, DBP n=6; GCN2KO DC n=7, DBP n=4 en S -2 y n=6 en el resto de las mediciones. Se aplicó el Test de t de Welch para todos los análisis, excepto para las comparaciones con el grupo WT DC en la S 4 y con el grupo GCN2KO DC en las semanas -2 y 4 (prueba de Mann-Whitney). * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001.

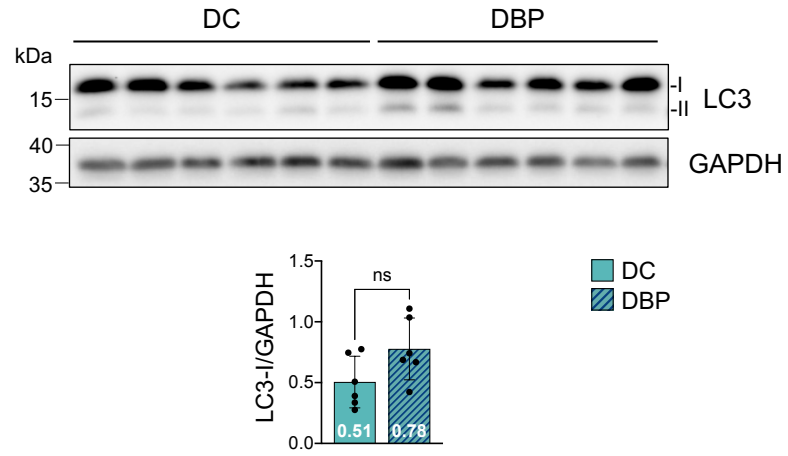


Figura S7. Análisis de la activación de la autofagia en la corteza motora de machos WT sometidos a la dieta baja en proteínas. La corteza motora de los machos WT, alimentados por seis semanas con la dieta control (DC, n=6) y la dieta baja en proteínas (DBP, n=6), se aisló y se extrajeron las proteínas del tejido para análisis por ensayos de *Western blot*. Se cuantificó la intensidad de pixel de las bandas, y se normalizó con la proteína GAPDH. Se evaluó el estado de la autofagia mediante la detección de LC3 (formas I y II, panel superior), y se evaluaron los niveles relativos de LC3-I (panel inferior). Se muestra la media \pm desv. std. El valor de la media se indica en blanco en cada barra. ns: no significativo. Test de t de Welch.

Tabla 2: Valores del peso corporal promedio (PROM) y la desviación estándar (D.E.) de los grupos de hembras.

SEMANA	PESO CORPORAL (g) DE LAS HEMBRAS							
	WT DC		WT DBP		GCN2KO DC		GCN2KO DBP	
	PROM	D.E.	PROM	D.E.	PROM	D.E.	PROM	D.E.
-2	21,7	0,6	22,0	0,3	22,5	0,9	21,0	1,4
-1	21,2	0,6	21,5	0,4	22,0	0,6	21,0	1,5
0	20,7	0,5	21,7	0,4	21,9	1,0	21,3	1,6
1	21,2	0,5	21,7	0,3	22,2	0,9	20,5	1,0
2	21,2	0,4	21,4	0,6	22,2	1,0	19,8	1,1
3	21,6	0,4	21,7	0,1	22,2	0,9	19,6	1,1
4	21,5	0,5	21,4	0,4	22,6	1,1	19,3	1,4
5	21,9	0,7	21,4	0,3	22,4	0,8	18,4	1,3

Tabla 3: Valores del peso corporal promedio (PROM) y la desviación estándar (D.E.) de los grupos de machos.

SEMANA	PESO CORPORAL (g) DE LOS MACHOS							
	WT DC		WT DBP		GCN2KO DC		GCN2KO DBP	
	PROM	D.E.	PROM	D.E.	PROM	D.E.	PROM	D.E.
-2	29,8	1,7	28,9	2,1	26,6	2,5	26,5	1,1
-1	29,0	1,6	28,6	2,1	27,0	2,0	27,0	2,2
0	29,6	2,0	28,1	1,6	27,2	1,6	27,7	2,2
1	29,9	2,4	26,7	1,4	27,5	1,7	25,5	1,7
2	30,0	1,6	26,0	1,1	28,4	1,5	24,3	1,4
3	29,8	1,3	25,9	1,4	29,2	1,8	23,7	1,7
4	30,9	1,9	24,6	0,9	28,9	1,8	23,0	1,0
5	30,9	2,2	24,9	1,1	29,2	1,8	22,4	1,0

Tabla 4: Valores de la glicemia promedio (PROM) y la desviación estándar (D.E.) de los grupos de hembras.

SEMANA	GLICEMIA (mg/dL) DE LAS HEMBRAS							
	WT DC		WT DBP		GCN2KO DC		GCN2KO DBP	
	PROM	D.E.	PROM	D.E.	PROM	D.E.	PROM	D.E.
-2	125	24	127	13	136	21	131	18
1	119	22	119	12	108	16	108	26
4	117	7	124	12	138	15	91	9
6	134	11	120	17	124	16	94	24

Tabla 5: Valores de la glicemia promedio (PROM) y la desviación estándar (D.E.) de los grupos de machos.

SEMANA	GLICEMIA (mg/dL) DE LOS MACHOS							
	WT DC		WT DBP		GCN2KO DC		GCN2KO DBP	
	PROM	D.E.	PROM	D.E.	PROM	D.E.	PROM	D.E.
-2	142	13	160	13	143	12	131	31
1	145	24	109	12	128	20	105	28
4	156	14	118	16	134	21	112	16
6	160	15	138	28	132	14	104	34

Tabla 6: Partidores utilizados para la amplificación de transcritos mediante qPCR.

Transcrito	Tipo de partidor	Secuencia
<i>map1lc3b</i>	Sentido	5' – GCGGGTGATTATAGAGCGATAC – 3'
	Antisentido	5' – CAAGCGCCGTCTGATTATCT – 3'
<i>actin</i>	Sentido	5' – TACCACCATGTACCCAGGCA – 3'
	Antisentido	5' – CTCAGGAGGAGCAATGATCTTGAT – 3'