



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.**

Instituto de Neurobiología.

**“ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN ZONAL DE LA PROTEÍNA RELOJ  
PER1 HEPÁTICA DURANTE LA EXPRESIÓN DEL OSCILADOR  
SINCRONIZADO POR ALIMENTO”**

Tesis que para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias (Neurobiología)  
presenta:

la Q.F.B. Dalia Luz De Ita Pérez.

Director de Tesis.  
Dr. Mauricio Díaz Muñoz.

Campus Juriquilla, Querétaro. Octubre 2010.

Universidad Nacional Autónoma de México.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Instituto de Neurobiología.

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: Dalia Luz De Ita Pérez, cuyo título es: “Estudio de la distribución zonal de la proteína reloj PER1 hepática durante la expresión del Oscilador Sincronizado por el Alimento” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma.

Presidente.

Dra. María Luisa Fanjul Peña Moles.

\_\_\_\_\_

Secretario (tutor).

Dr. Mauricio Díaz Muñoz.

\_\_\_\_\_

Vocal.

Dr. Rolando Hernández Muñoz.

\_\_\_\_\_

Suplente.

Dra. María Teresa Morales Guzmán.

\_\_\_\_\_

Suplente.

Dr. Efraín Santiago Rodríguez.

\_\_\_\_\_

Aprobado por el Comité Académico.

\_\_\_\_\_  
Coordinador del Programa.

## RESUMEN.

Los relojes biológicos proveen una ventaja adaptativa asegurando que en los organismos los procesos fisiológicos y bioquímicos, aunados al comportamiento estén de manera óptima al ambiente local. En los mamíferos, el reloj biológico principal se encuentra ubicado en el núcleo supraquiasmático (NSQ) hipotalámico y es sincronizado por la alternancia día-noche. El NSQ controla la actividad circadiana, manteniendo un orden temporal a través del acoplamiento con osciladores periféricos. Sin embargo, cuando a los animales experimentales se les somete a horarios restringidos de alimentación (2-3 h por día) un reloj emergente conocido como Oscilador Sincronizado por el Alimento (OSA) toma el comando de la actividad circadiana. Las oscilaciones de ambos sistemas son controladas por “genes reloj”, entre los cuales se encuentra el gen *per*. Recientemente, se ha hecho evidente la íntima relación entre el mecanismo molecular circadiano y los procesos metabólicos en puntos clave como: la carga energética, el estado redox, la dinámica de calcio y los receptores nucleares, entre otros.

Un órgano central en el suministro de energía al organismo, es el hígado. Este órgano presenta un fenómeno conocido como “zonación metabólica” cuya función es la especialización de las diversas funciones metabólicas acorde a la disposición y características anatómicas de las poblaciones celulares (hepatocitos periportales y pericentrales) del acino hepático. En este trabajo, mediante técnicas de inmunohistoquímica y microscopía de fluorescencia se dilucidó la distribución zonal de la proteína reloj PER1 hepática al establecerse el OSA. Nuestros resultados mostraron que la distribución de PER1 en los hepatocitos periportales y pericentrales varía de acuerdo al estado metabólico y alimenticio del organismo.

## **ABSTRACT.**

Biological clocks provide an adaptive advantage by ensuring that internal processes of the organism, both physiological and biochemical, coupled with the behavior are optimally adapted to the local environment. In mammals, the main biological clock is located in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus (SCN) and is synchronized by day-night alternation. The SCN controls the circadian activity, maintaining a time order across the interface with peripheral oscillators. However, when experimental animals are subjected to restricted feeding schedules (2-3 h per day) an emergent clock known as the Feeding Entrainable Oscillator (FEO) takes command of the circadian activity. The oscillations of both systems are controlled by "clock genes", among which is the gene *per*. Recently, it has become clear the intimate relationship between the circadian molecular mechanism and metabolic processes at key points such as energy charge, redox state, the calcium dynamics and nuclear receptors, among other.

A central organ in the supply of energy to the body is the liver. Whose function is the specialization of the many metabolic functions according to the arrangement and anatomical characteristics of the cell populations (periportal and pericentral hepatocytes) of the liver acinus. In this work we elucidated the zonal distribution of the liver protein PER1 by letting the FEO to set. This was done by immunohistochemistry and fluorescence microscopy.

The study showed that the distribution of PER1 in the periportal and pericentral hepatocytes varies according to metabolic and nutritional status of the organism.

## **AGRADECIMIENTOS.**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Becario número: 23842.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM. Número de cuenta: 509003209.

Al personal de la Biblioteca del campus UNAM Juriquilla que es encabezado por el Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela como coordinador.

A la unidad de Videoconferencia dirigida por la Psic. Ma. de Lourdes Lara Ayala.

Al personal de la Unidad de Enseñanza, especialmente a la M.C. Leonor Casanova Rico, Jefa de la Unidad de Enseñanza.

Al Dr. Mauricio Díaz, a la Dra. Olivia Vásquez y a todos mis compañeros del laboratorio por su ayuda y amistad.

# ÍNDICE.

	Páginas.
RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
Agradecimientos.....	iii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Sistema Circadiano.....	3
1.2 Oscilador Sincronizado por el Alimento (OSA) .....	4
1.3 Genes Reloj.....	5
2. ANTECEDENTES.....	8
2.1 Proteína Reloj PER1.....	8
2.2 Zonación hepática.....	11
3. JUSTIFICACIÓN.....	17
4. HIPÓTESIS.....	18
5. OBJETIVOS.....	18
6. MÉTODOS.....	19
6.1 Animales y condiciones experimentales.....	19
6.2 Inmunohistoquímica.....	19
6.3 Cuantificación de la fluorescencia.....	20
6.3.1 Fluorescencia total.....	20
6.3.2 Expresión zonal de PER1.....	21
6.4 Western Blot.....	21
7. RESULTADOS.....	22
7.1 Expresión total de PER1 en los grupos experimentales <i>Ad Libitum</i> y HRA.....	22
7.2 Expresión zonal de PER1 en los grupos experimentales <i>Ad Libitum</i> y HRA.....	26
7.3 Expresión total de PER1 en los controles de condición alimenticia.....	28
7.4 Expresión zonal de PER1 en los controles de condición alimenticia.....	29
8. DISCUSIÓN.....	31
9. CONCLUSIONES.....	34
10. PERSPECTIVAS.....	35
11. REFERENCIAS.....	36
12. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....	39

## INTRODUCCIÓN.

Como consecuencia de la rotación de la Tierra sobre su propio eje aproximadamente cada 24 h, la mayoría de los organismos en el planeta estamos sujetos a las fluctuaciones predecibles de luz (fotoperíodo) y a los cambios de las estaciones. Debido a que estas fluctuaciones son un reto para la supervivencia, un gran rango de especies desde cianobacterias a humanos han evolucionado creando relojes biológicos endógenos. Los que permiten estimar el paso del tiempo para anticiparse a estas variaciones diarias. De esta forma, nuestra fisiología interna y funciones están fundamentalmente entrelazadas con los ciclos geofísicos. Esto permite mostrar niveles máximos de una variable fisiológica cuando las condiciones en el medio ambiente requieren una respuesta aumentada. El resultado es que al monitorear con regularidad un proceso fisiológico o conductual se observan fluctuaciones que se conocen como ritmos biológicos. Estos ritmos se han clasificado en 3 grupos de acuerdo a su frecuencia de oscilación: Ritmos ultradianos, que son de alta frecuencia y se presentan más de una vez al día; los ritmos circadianos con una frecuencia cercana a las 24 h (en general, aquellos con períodos de 20-28 h), cuyo nombre proviene del latín *circa*, cercano y *diem*, día, es decir, cercano al día. y los ritmos infradianos, que son de baja frecuencia, presentándose menos de una vez en 24 h. Otros ritmos endógenos que corresponden a ciclos medio ambientales son los circatidales, circalunares, y circanuales, regulados por el ciclo de las mareas, el mes lunar y el año sideral, respectivamente. Algunos ejemplos se observan en la Tabla 1.

Actualmente se sabe que los ritmos son una propiedad conservada en todos los niveles de organización de la vida, desde organismos unicelulares procariontes hasta mamíferos y plantas superiores, tanto a nivel celular hasta el organismo como un todo. La expresión de los ritmos biológicos es una capacidad intrínseca de los seres vivos, ya que bajo condiciones de aislamiento, es decir, en ausencia de información periódica de su medio, se siguen expresando independientemente de los ciclos ambientales y mantienen un período similar al que mostraban antes asociados a los ciclos geofísicos. A este fenómeno se le conoce como “oscilación espontánea o curso libre”. Es decir, la existencia de ritmos biológicos en las manifestaciones vitales es una característica fundamental de todo ser vivo y debido a su función adaptativa, los relojes internos se ajustan a señales externas de tiempo, como son: el ciclo luz-oscuridad, el alimento, el ruido, los fármacos, las interacciones sociales, entre otros. Los cuales ejercen el papel de sincronizadores. Un sincronizador o zeitgeber le impone a un marcapasos endógeno su período y los tiempos para iniciar y terminar un ciclo.

<i>Tipo de ritmo</i>	<i>Período</i>	<i>Ejemplo</i>
<b>Ultradiano</b>	0.1 s	Ritmo alfa del EEG.
	1 s	Ritmo cardíaco.
	6 s	Ritmo respiratorio.
	60 min	Secreciones hormonales.
	90 min	Alternancia de estados de sueño.
<b>Circadiano</b>	24 h	Sueño-vigilia. Actividad-reposo. Temperatura corporal. Procesos metabólicos.
<b>Infradiano</b>	28 días	Ciclo menstrual.
	365 días	Hibernación. Apareamiento. Desarrollo gonadal. Migración.

**Tabla 1. Período de los ritmos biológicos clasificados de acuerdo a su frecuencia.**

En los mamíferos, incluyendo al hombre, se han identificado estructuras en el sistema nervioso central (SNC), así como en órganos periféricos que tienen la capacidad de oscilar. Estos osciladores presentan una organización jerárquica, en donde un reloj central, el núcleo supraquiasmático (NSQ) hipotalámico, cuya señal sincronizadora que es la alternancia del día y la noche (Klein, 1991), mantiene el control de todos los demás osciladores circadianos. Lo que confiere un control rítmico de todas las funciones del organismo (Reppert y Weaver, 2002). Ello supone que la temporalidad de cualquier organismo se conforma por un sistema molecular, bioquímico, funcional e incluso morfológico distinto según el momento del día en el que se estudie.

En esta tesis, revisamos información en torno a aspectos que relacionan los ritmos biológicos y el metabolismo. El trabajo experimental investiga como es la relación entre el mecanismo molecular del reloj biológico, cuando se modifican las condiciones alimenticias. Con dicho propósito, se determinó la expresión y distribución de una proteína marcadora del reloj molecular (PER1) a lo largo de la unidad microanatómica del hígado en animales bajo

un protocolo de alimentación restringida y se comparó con la distribución de dicha proteína en animales con alimentación *Ad Libitum*.

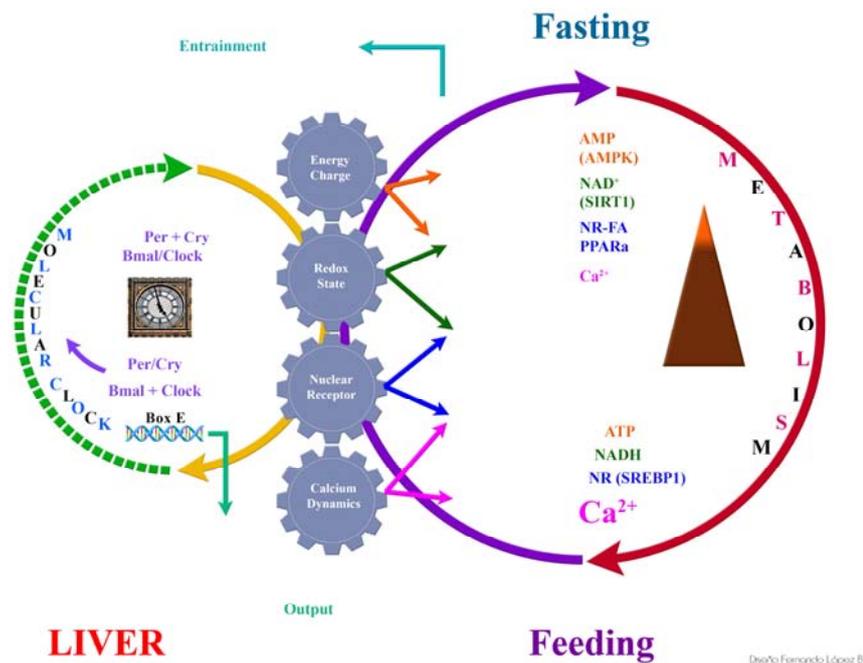
### **1.1 Sistema Circadiano.**

El *sistema circadiano* basado en el NSQ, está compuesto por un sistema fotorreceptor, que es la vía aferente que lleva información del *zeitgeber* exógeno, el reloj, que elabora un código neuroendócrino de dicha información, y las vías eferentes que conducen esta información para el control temporal de los sistemas efectores e interactúan para generar los ritmos manifiestos en los organismos. El sistema circadiano del NSQ es multioscilar y su función es proveer una estructura temporal fiable acorde al fotoperíodo a pesar de un ambiente luminoso que puede cambiar día a día o incluso en el mismo día.

En su forma más básica, los relojes circadianos están compuestos de un conjunto de genes y proteínas que generan un asa de retroalimentación transcripción-traducción autosostenida con un período de 24 h. Varios de los componentes del reloj son sensibles a la luz de manera aguda, resultando en un oscilador que puede sincronizarse al tiempo local.

Desde hace mucho tiempo se conoce que los ritmos circadianos más evidentes en los animales son los conductuales. Entre éstos, los ciclos de actividad-reposo, el comportamiento alimenticio y la ingesta de agua. La conducta alimenticia ocurre de forma periódica y en la mayoría de las especies es claramente circadiana. Ratas adultas, mantenidas en un ciclo 12:12 (12 h luz y 12 h oscuridad) ingieren entre el 80-90% de su alimento por la noche. Estos ritmos de ingesta de alimento persisten bajo gran cantidad de condiciones. Continúan durante la privación de agua, aunque con una ingesta total reducida. La capacidad de mostrar anticipación al momento en el que el alimento estará disponible es una de las características de los ritmos circadianos de ingesta. En la naturaleza esta anticipación es importante, pues a menudo el animal debe emprender un viaje desde el lugar donde duerme hasta el lugar donde obtendrá el alimento. Recientemente se ha demostrado que la capacidad de anticipación a la disponibilidad de alimento está controlada por un marcapasos diferente al NSQ. Es decir, el NSQ mantiene su propia oscilación y presenta sólo un control parcial de los ritmos circadianos en el organismo. El sistema circadiano permite una sincronización óptima de los eventos celulares para proporcionar energía, apoyando el metabolismo y haciendo posible la coordinación de los procesos bioquímicos, endocrinos y conductuales durante un ciclo de 24 h (Aguilar-Roblero y Díaz-Muñoz, 2009). Es decir, el sistema circadiano presenta una relación recíproca entre los componentes moleculares (reloj molecular) y las vías de señalización que

controlan las rutas metabólicas, lo cual implica como la energía celular es obtenida, almacenada y utilizada (Figura 1).



**Figura 1.** Representación de algunos puntos de interacción entre el reloj molecular circadiano y el metabolismo energético. Donde los metabolitos correspondientes a *la carga energética del organismo*: Adenosín monofosfato (AMP), la cinasa activada por adenosín monofosfato (AMPK), adenosín trifosfato (ATP), en color anaranjado; *al estado redox*: Dinucleótido de nicotinamida adenina oxidado ( $\text{NAD}^+$ ), sirtuina 1 (SIRT1), dinucleótido de nicotinamida adenina reducido (NADH), color verde; *los receptores nucleares*: Receptores nucleares a ácidos grasos (NR-FA), receptor activado por el proliferador de peroxisomas alfa (PPAR $\alpha$ ), elemento regulador de esterol unido a la proteína 1 (SREBP1), en azul y *la dinámica de Calcio* ( $\text{Ca}^{2+}$ ) tienen una relación recíproca con los elementos del reloj molecular. Como los genes Per, Cry, CLOCK y BMAL. Tomado de (Aguilar-Roblero y Díaz-Muñoz, 2009).

## 1.2 Oscilador Sincronizado por el Alimento (OSA).

Es particularmente importante la influencia que los ciclos de comida-ayuno tienen sobre el sistema circadiano animal. Cuando la calidad del alimento es la adecuada, el reloj central en el SNC es el regulador más importante de la ritmicidad del organismo, y los osciladores periféricos actúan como relojes biológicos subordinados.

La evidencia sólida de la existencia de otro oscilador circadiano se ha obtenido de experimentos en los que se restringe el acceso al alimento por unas cuantas horas al día. Ya que, la alimentación periódica es una señal robusta para sincronizar a los ritmos circadianos, así que, durante una restricción alimenticia de un par de horas al día, un patrón alternativo de

ritmicidad emerge (respecto a la alimentación *Ad Libitum*) el cual refleja una nueva configuración del sistema circadiano (Aguilar-Roblero y Díaz-Muñoz, 2009). Bajo estas condiciones el alimento adquiere relevancia como principal sincronizador de los ritmos biológicos, independiente del ciclo luz-oscuridad (Escobar et al., 2001), por lo que los ritmos circadianos conductuales y fisiológicos modifican sus oscilaciones recorriendo sus acrofases alrededor de las horas de alimentación. De tal forma, durante la restricción del alimento, el oscilador sincronizado por la luz ya no es el marcapasos original y un nuevo oscilador circadiano fuera del NSQ, conocido como el Oscilador Sincronizado por el Alimento (OSA) (Mendoza, 2006) toma el comando de la actividad circadiana (Panda et al, 2002).

Un comportamiento de tipo circadiano que se presenta durante la restricción diaria del alimento es la Actividad Anticipatoria al Alimento (AA) (Mistlberger, 1994), en la cual se presenta un incremento en la locomoción, temperatura corporal y niveles de corticoesterona en suero, 2-4 h antes de la presentación del alimento. La AA fue observada y descrita por primera vez en los mamíferos por Curt Richter en 1922. Y más tarde fue propuesta como una de las salidas del reloj circadiano (Bolles y Stokes, 1965). Donde, el NSQ fue considerado como candidato del sustrato neural del OSA. Sin embargo, esta hipótesis fue refutada al llevarse a cabo los primeros estudios encaminados a observar los efectos de la actividad locomotora en ratas con restricción de alimento a las que se les había lesionado el NSQ (Phillips y Mikulka, 1979). Tales experimentos fueron contundentes, respecto a que el NSQ es una estructura no necesaria para la sincronización de todos los ritmos.

Actualmente, aún no se ha identificado el sustrato anatómico del OSA, pero se ha sugerido que puede estar conformado por la interacción entre áreas cerebrales y órganos periféricos relacionados con la alimentación y el metabolismo energético, posiblemente estructurados como un sistema distribuido conformado por asas de retroalimentación (Escobar et al, 1998).

### **1.3 Genes Reloj.**

Los mecanismos intrínsecos de la regulación rítmica de cada célula del cuerpo hasta un organismo completo están grabados en un mecanismo genético (Badiu, 2003). El cual está regulado a un nivel celular y molecular. El funcionamiento de los relojes biológicos ocurre debido a la actividad de un pequeño grupo de genes que, en conjunto se denominan “genes reloj” y que se encuentran prácticamente en todas las células de los organismos.

Al menos para las plantas y los animales, un indicador para el mecanismo del fotoperíodo es la expresión de genes reloj cerca del amanecer y el anochecer, independientemente de la duración del día. La inducción de especies de ARN al amanecer podría ser causada por una simple inducción luminosa, pero la expresión génica para anticipar el anochecer en diferentes fotoperíodos demanda un sofisticado mecanismo de tiempo.

Los genes reloj se descubrieron en las moscas de la fruta cuando se indujeron en ellas mutaciones de manera experimental (Konopka y Benzer, 1971). Estudios posteriores en *Drosophila* y mamíferos dejaron en claro que los genes que rigen la actividad del reloj circadiano se han conservado durante la evolución. Además de encontrarse a lo largo de toda la escala evolutiva, presentando un mecanismo molecular de acción muy semejante.

Recientemente, el mecanismo molecular del reloj biológico ha sido mayormente estudiado en *Neurospora* y *Drosophila*. La expresión de los genes reloj Per y Tim en *Drosophila* es rítmica y su transcripción es regulada por un mecanismo de retroalimentación negativa (Dunlap, 1996; Sehgal et al., 1996).

Los ciclos circadianos se establecen por el cambio rítmico en la expresión de los genes reloj. La expresión de estos genes se regula a través de la transcripción, de manera que no todos los genes reloj se expresan al mismo tiempo. Existen señales ambientales, hormonales y metabólicas que determinan que genes se deben expresar y cuando. De esta manera, algunos genes reloj tienen su nivel más alto de expresión durante el día y el más bajo durante la noche, mientras que otros genes reloj presentan el proceso inverso. El resultado final es el ritmo circadiano en diferentes niveles como: ritmos de hormonas (testosterona y cortisol), ritmos de neurotransmisores, ciclo sueño-vigilia y ritmos de enzimas hepáticas, entre otros.

En los mamíferos, estos genes reloj fueron encontrados primeramente en el NSQ y se encontraron de manera posterior en varios tejidos periféricos (Panda et al, 2002), por lo que han sido referidos como osciladores periféricos (Yamazaki et al, 2000). Los cuales, funcionan de manera dependiente al reloj central hipotalámico. Sin embargo, en condiciones especiales como alimentación restringida, estos genes se pueden desconectar de su influencia central y llegar a ser autónomos, al menos por un limitado período de tiempo (Balsalobre et al, 1998).

El reloj molecular principal, consiste de distintos genes reloj que imponen un ritmo a través de un complejo de factores de transcripción, los cuales permiten mantener el tiempo biológico regulado de manera precisa (lo cual se explicará más adelante).

Las funciones y efectos de algunos genes involucrados en el reloj molecular de mamíferos, como en el de la mosca de la fruta, se muestran a continuación (Tabla 2).

<b>Gen</b>	<b>Fenotipo circadiano.</b>	<b>Expresión circadiana.</b>	<b>Respuesta aguda a la luz.</b>
<b>Mamíferos</b>			
<i>Clock</i>	Período de 28 h, arritmicidad.	no	n.d
<i>Per1</i>	n.d	si	↑ ARNm
<i>Per2</i>	n.d	si	↑ ARNm
<i>Per3</i>	n.d	si	No
<i>Bmal1</i>	n.d	no	n.d
<b><i>Drosophila</i></b>			
<i>per</i>	Varios alelos, incluyendo período de 16 h, período de 19 h, período de 28 h, arritmicidad.	si	no
<i>tim</i>	Arritmicidad.	si	Degradación de la proteína
<i>dClock (Jrk)</i>	Arritmicidad, bajo <i>per</i> , expresión de <i>tim</i> .	si (ciclo luz-oscuridad)	n.d
<i>Cycle (dbm11)double time</i>	Arritmicidad, bajo <i>per</i> , expresión de <i>tim</i> . Período de 18 h, período de 27 h, arritmicidad.	n.d  no	n.d  no

**Tabla 2.** Genes circadianos en el reloj molecular de mamíferos y de *Drosophila*. Donde puede apreciarse el fenotipo circadiano que presentan, así como el ritmo circadiano del ARNm y/o de la expresión de la proteína. n.d. no determinado. Modificado de (Takahashi y Wilsbacher, 1998).

## 2. ANTECEDENTES.

Los primeros estudios dirigidos a explorar la potencialidad del alimento como sincronizador se realizaron en ratas y se vio que al restringir el acceso del alimento diariamente se modifica la distribución temporal de su conducta al desplegar intensa actividad motora y de búsqueda durante las 3-4 h previas a la presentación del alimento, la cual se conoce como actividad de anticipación al alimento (Bolles y Stokes, 1965). Esta anticipación depende de un oscilador circadiano ya que persiste en animales con lesión bilateral del NSQ y bajo condiciones constantes de iluminación (Stepahn et al, 1979), se produce cuando el acceso a la comida se permite en rangos cercanos a las 24 h y persiste por varios ciclos bajo condiciones de ayuno (Stephan, 1992).

Cuando el alimento se restringe a 2 h diarias durante 2-3 semanas los ritmos diarios de varios procesos endócrinos y de balance energético (Escobar et al, 1998) se sincronizan preferentemente a los horarios de alimentación y por lo tanto pierden su ajuste hacia la alternancia día-noche (Escobar et al, 2001). Se ha podido determinar que este oscilador se manifiesta únicamente bajo condiciones catabólicas, con varios protocolos de restricción de alimento. En contraste, no se observa en condiciones de alimentación *Ad libitum*, ni en animales obesos. También se sabe que para que el pulso de alimento adquiera propiedades como sincronizador, debe aportar la carga principal de calorías del día (Stephan, 1997).

La identidad del reloj sincronizado por alimento es hasta el momento incierta. Diversos grupos se han enfocado en localizar estructuras del sistema nervioso central (SNC) que pudieran ser el substrato anatómico de este reloj. Algunas áreas prosencefálicas como la ventromedial (HVM), lateral (HL), y la dorsomedial hipotalámica (HDM), así como el núcleo accumbens, han sido implicadas en la expresión del OSA. Mittleberger et al (1984), mostró que las ratas con lesión del HVM, las cuales tenían un largo período de recuperación (14-20 semanas), recobraban completamente la capacidad de exhibir la AA.

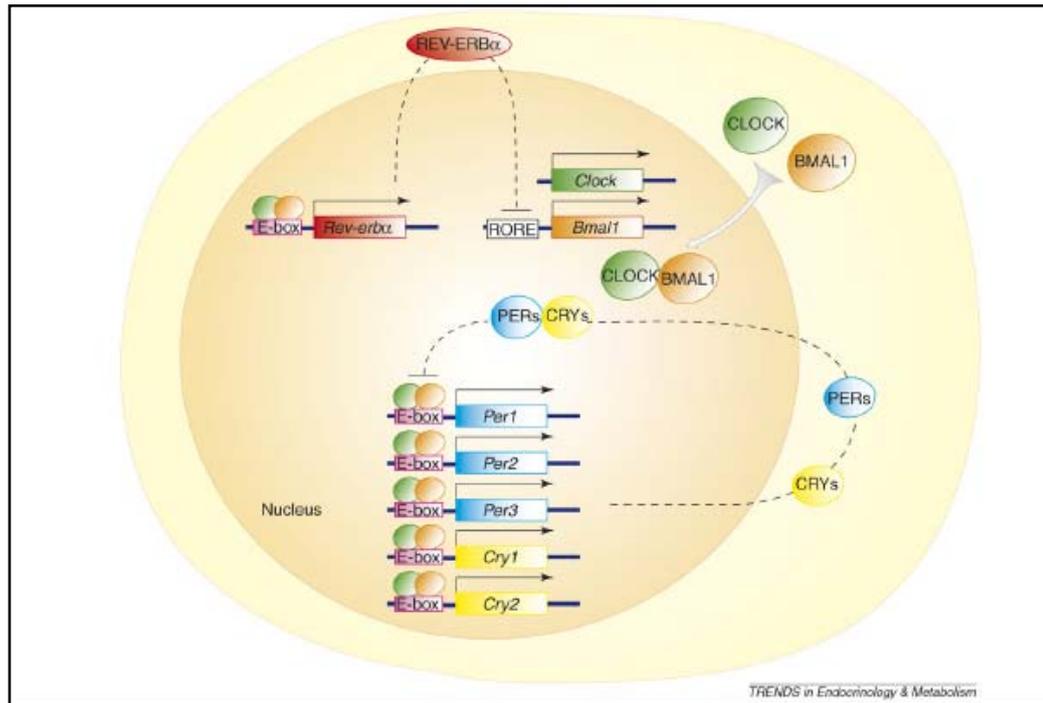
### 2.1 Proteína reloj *Per1*.

Konopka y Benzer (1971), a través de simples observaciones reportaron que los ritmos de actividad locomotora en *Drosophila melanogaster* eran hereditarios y podían ser alterados a través de mutaciones deliberadas. Por medio de revisiones en moscas que presentaban variaciones en la longitud de sus ciclos de actividad, identificaron el primer reloj circadiano mutante de *D. melanogaster*. El cual fue denominado “*Period*” o “*Per*”. Desde su hallazgo,

Per1 ha sido ampliamente estudiado por su gran expresión rítmica en el NSQ y su fuerte correlación con la fase de cambio en la manifestación de los ritmos (Shigeyoshi et al., 1997b), lo que sugiere que el control en la expresión de mPer1 en el NSQ juega un papel central para la generación y mantenimiento de los ritmos circadianos en los mamíferos (Shigeyoshi et al., 1997b). Además de su semejanza estructural con la proteína reloj *dPER* en *Drosophila*, cuya función en la mosca de fruta está involucrada con la actividad motora y la eclosión.

Experimentos realizados en hamsters han mostrado que la luz y la actividad durante períodos de quiescencia en animales nocturnos (eventos no fóticos) tienen efectos convergentes pero opuestos en la expresión de PER1, ya que mientras la luz eleva la expresión de esta proteína reloj, los eventos no fóticos la disminuyen (Toshiyuki et al, 2004). La observación de que la acumulación y desaparición de la proteína Per seguía a su transcripción llevó a Hardin et al (1990) a proponer que el mecanismo central del reloj envolvía un asa de retroalimentación transcripción-traducción.

Los componentes moleculares del reloj (Fig. 2) son conservados en plantas, invertebrados y vertebrados y consisten en un par de activadores: CLOCK (circadian locomotor output cycles kaput) y BMAL1 (brain and muscle Arnt-like proteína 1). En los mamíferos estos activadores inducen la transcripción de un par de represores PER y CRY, los cuáles adicionalmente son regulados por modificadores como la caseína kinasa epsilon (CKI $\epsilon$ ). CLOCK y BMAL1 se dimerizan en el citoplasma y se traslocan al núcleo. El heterodímero CLOCK-BMAL1 entonces se une a su enhancer, ubicado en las cajas E de la región promotora de los genes Per y Cry, lo cual activa la transcripción de éstos. Per y Cry en traslocación núcleo-citoplasma forman heterodímeros y retornan al núcleo para inhibir la acción de CLOCK-BMAL1, lo que resulta en un decremento en la transcripción de los genes Per y Cry. CLOCK-BMAL1 también induce la transcripción de de Rev-erb $\alpha$ , el cual a su vez inhibe la transcripción de BMAL1 a través de su unión a RORE dentro del promotor de BMAL1. La autorregulación del asa de transcripción-traslación incluye a CLOCK-BMAL1 y Per-Cry integrando el centro del reloj y generando ritmos de transcripción génica de 24 h.



**Figura 2.** Asa de retroalimentación transcripcional del reloj circadiano en los mamíferos. CLOCK y BMAL1 se dimerizan en el citoplasma y se traslocan al núcleo. El heterodímero CLOCK-BMAL1 se une a su enhancer (E-box) localizada en la región promotora de los genes *Per* y *Cry*, activando su transcripción. Las proteínas PER y CRY se heterodimerizan y regresan al núcleo para inhibir a CLOCK-BMAL1, lo que resulta en un decremento en la transcripción de los genes *Per* y *Cry*. CLOCK-BMAL1, también inducen la transcripción de *Rev-Erb $\alpha$* , el cual inhibe la transcripción de *Bmal1*, a través de su unión a RORE en la región promotora de *Bmal1*. Esta asa de transcripción-traducción constituye el mecanismo del reloj molecular y genera ritmos de transcripción génica de 24h. Tomado de (Bass y Kohsaka, 2007).

El modelo anterior establece que, el reloj consiste de un grupo de genes que se transcriben en ARNm y se traducen en proteínas, las cuáles sucesivamente estimulan la activación de otros genes y proteínas que a su vez inhiben la expresión de los genes que les dieron origen.

Durante la restricción diaria del acceso al alimento por 2-3 horas al día, la fase del ritmo circadiano de PER1 y otras proteínas reloj, así como el comportamiento de los animales experimentales cambia en tejidos periféricos, como el hígado (Hara et al, 2001). Por lo que las oscilaciones de dicha proteína reloj se han asociado al ritmo de actividad y de alimentación. También se ha podido determinar que algunos tejidos como el pulmón y el hígado mantienen oscilaciones en la expresión de la proteína reloj *Per1* en las preparaciones *in vitro* (Yamazaki, et al. 2000).

La observación de que los sistemas metabólicos y neuroendócrinos están sujetos a un fuerte control circadiano, junto con el descubrimiento de una extensiva variación de 24 h en los ARNms que inducen factores clave relacionados con el metabolismo, ha llevado a plantear la hipótesis de que las cadenas génicas, metabólicas y circadianas pueden estar correguladas.

La sincronización de los osciladores circadianos con el mundo exterior se lleva a cabo por la luz (u otras señales externas) y ha tenido efectos agudos en el nivel de uno o más componentes del reloj. Las consecuencias de estos efectos son experimentados a través de la interconexión de asas moleculares, las que dan una alineación estable de fase del ritmo endógeno y las condiciones de sincronización externas.

La expresión génica diaria de *Per1* avanza instantáneamente en el NSQ, pero avanza lentamente en órganos periféricos como el hígado, después de un cambio en el ciclo LD (Yamazaki et al 2000). También ha sido reportado que, el *mPer1* en el hígado de ratas, se expresa de manera circadiana durante la fase nocturna (Zylka et al, 1998). Sin embargo, al examinar el patrón de expresión de *mPer1* algunos días después de un régimen de restricción alimenticia, el pico de expresión se mueve a la fase diurna (Hara et al, 2001). Indicando que, un horario de restricción de alimento es una potente señal sincronizadora en el hígado (Hara et al, 2001).

## ***2.2 Zonación hepática.***

El hígado, es la glándula más grande en los vertebrados, tiene una consistencia blanda y está situado en el cuadrante superior derecho de la cavidad abdominal, justo abajo del diafragma. Este órgano se divide en 4 lóbulos –izquierdo, derecho, cuadrado y caudal- de los que los 2 primeros constituyen la mayor parte. El hígado es de color rojo oscuro o pardo rojizo en estado fresco debido a su abundante riego sanguíneo, ya que recibe sangre oxigenada de la arteria hepática izquierda y la arteria hepática derecha y sangre rica en nutrientes a través de la vena porta. Ambos vasos penetran en el hígado por el hilio hepático.

El hígado es poco común porque sus elementos de tejido conectivo son escasos; por tanto casi la totalidad del hígado está compuesta por células parenquimatosas uniformes, los hepatocitos, los cuáles conforman el 75% del peso de este órgano. Los hepatocitos, son células poligonales de 20-30  $\mu\text{m}$  de diámetro y están dispuestos en lobulillos en forma de hexágonos (lobulillos clásicos) de casi 2 mm de largo y 700  $\mu\text{m}$  de diámetro. Sin embargo,

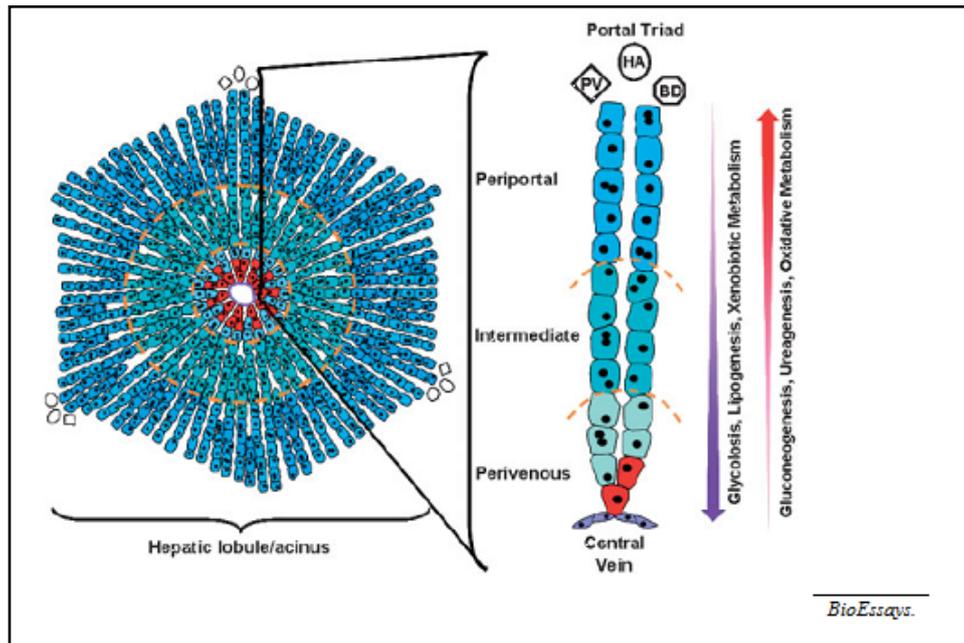
por la escasez de tejido conectivo y la agrupación densa de los lobulillos en el hombre, los límites de los lobulillos clásicos sólo pueden estimarse de manera aproximada.

Los hepatocitos muestran variaciones en sus propiedades estructurales, histoquímicas y bioquímicas, según su localización dentro del lobulillo hepático. Este fenómeno es conocido como “heterogenicidad funcional” o “zonación metabólica” (Gebhard, 1992).

La organización microanatómica de la unidad funcional más pequeña del hígado (el acino o lobulillo hepático) se acompaña por una heterogenicidad funcional y estructural a nivel celular. La unidad es dividida en 3 zonas: La zona periportal, la cual rodea los vasos aferentes y la triada portal y recibe sangre rica en oxígeno y nutrientes resultantes de la absorción intestinal, así como hormonas gastrointestinales (insulina y glucagon) que tienen efectos sobre la regulación del metabolismo hepático; la zona intermedia, la cual rodea la zona periportal y la zona más externa denominada perivenosa (Fig. 3).

En el hígado adulto los hepatocitos se disponen en láminas que se ramifican y se anastomosan para formar un retículo tridimensional, a través del cual circula la sangre. De igual forma, se advierten regiones llamadas *zonas* o *conductos portales*, cada una de las cuales contiene ramas de la vena porta, de la arteria hepática, un conducto biliar y a menudo también un vaso linfático, incluidos en una pequeña cantidad de tejido conectivo. El cual aumenta en los sitios en que los 3 lobulillos clásicos están en contacto unos con otros.

Las zonas portales están dispuestas de tal manera que delimitan los lobulillos del tejido hepático. El *lobulillo hepático* o *clásico*, tiene varios conductos portales en su periferia, y en su centro hay una vena central, tributaria de la vena cava inferior, a partir de la cual irradian las láminas de células parenquimatosas como los rayos de una rueda a partir de su eje. Esta unidad estructural se repite miles de veces, con los vasos aferentes (vena porta y arteria hepática) en la periferia del lobulillo y los vasos eferentes (vena central) en el centro del mismo, es evidente que el flujo sanguíneo va de la periferia a la vena central, pasando por los conductos sinusoidales situados entre las láminas de células hepáticas. Las partes periféricas de un lobulillo (las más próximas a la vena porta y la arteria hepática) recibirán un mayor aporte de materiales alimenticios y oxígeno. Este aporte será menor en la zona central.



**Figura 3.** Representación esquemática de la unidad microanatómica del hígado, el acino o lobulillo hepático. Cada acino, presenta una forma hexagonal, con hileras de hepatocitos que radian desde la vena central. A intervalos regulares del acino hepático, se encuentran las triadas portales. Las cuales están formadas por una rama de la arteria hepática (HA), la vena porta (PV) y el conducto biliar (BD). A lo largo del eje porta-venoso, los hepatocitos pueden ser divididos en 3 zonas: periportal, intermedia y perivenosa. Gradientes de algunas vías metabólicas como gluconeogénesis, glicólisis, metabolismo de xenobióticos, lipogénesis y ureogénesis, se presentan a lo largo del eje. Los hepatocitos de la zona perivenosa expresan la glutamino sintetasa (rojo), mientras que los hepatocitos posteriores expresan la carbamoilfosfato sintetasa (azul). Tomado de (Burke y Tosh, 2006).

El hígado, es considerado el órgano central en la manutención del suministro de energía, ya que:

- Está implicado en la homeóstasis de glucosa, tomándola durante la alimentación y liberándola durante la postabsorción.
- Está implicado en la homeóstasis de lípidos, produciendo cuerpos cetónicos como sustratos alternativos de energía para el cerebro durante una inanición prolongada.
- Es el órgano central en el metabolismo de aminoácidos (a.a); la liberación de amonio por la degradación de a.a se lleva a cabo por el ciclo de la urea, exclusivamente en el hígado.
- Además, el hígado cataliza procesos biosintéticos, biodegradativos y excretorios de los productos finales del metabolismo.

Debido a la función de los gradientes de sustratos y enzimáticos de una zona a la otra, la mayoría de las funciones hepáticas muestran diferencias en la actividad dentro de las zonas periportales y pericentrales, como se muestra en la Tabla 3.

La heterogenicidad zonal del parénquima hepático es dinámica más que estática, lo que permite la adaptación a períodos prolongados de alteraciones en el metabolismo. Por lo tanto, es posible modificar la zonación de un subconjunto de funciones hepáticas por un cambio en la dirección del flujo sanguíneo (Kinugasa et al, 1986), lo cual invierte la concentración del gradiente de oxígeno y metabolitos a través del hígado. El reloj local hepático regula la expresión de varias enzimas esenciales para el metabolismo de los nutrientes básicos y en la síntesis y eliminación de productos endógenos y exógenos, tales como hormonas esteroideas, fármacos y ácidos biliares.

<b>HEPATOCITOS PERIPORTALES.</b>	<b>HEPATOCITOS PERICENTRALES.</b>
Metabolismo oxidativo (Ciclo de Krebs, fosforilación oxidativa).	Captación de glucosa (glicólisis, síntesis de glucógeno vía directa, glucogenólisis a lactato y ciclo de las pentosas).
Salida de glucosa (gluconeogénesis, síntesis de glucógeno desde lactato y aminoácidos por vía indirecta, glucogenólisis).	Metabolismo de aminoácidos (formación de glutamina).
Metabolismo de aminoácidos (captación de aminoácidos, aminoácido oxidasa, ureogénesis de amonio intestinal, ureogénesis de aminoácidos).	Metabolismo de lípidos (lipogénesis de novo, formación y secreción de VLDL, formación de Acetil CoA).
Metabolismo de lípidos (oxidación de ácidos grasos, síntesis de colesterol, formación de ácidos biliares, conversión de acetato a Acetil CoA).	

**Tabla 3.** Distribución zonal (periportal o pericentral) de algunas funciones metabólicas presentes en el acino hepático.

La expresión génica heterogénea dentro del acino hepático, responde a una variedad de señales que son diferentes en el tejido periportal y pericentral. Y las cuáles se han verificado por estudios bioquímicos e histoquímicos. Además, el metabolismo del hígado es excepcionalmente rítmico, cerca del 20% de las proteínas hepáticas muestran fluctuaciones circadianas, y la mayoría de los eventos bioquímicos y fisiológicos en este órgano presentan algún tipo de variación durante un período de 24 h (Jungermann y Katz, 1989).

La ritmicidad hepática es principalmente sincronizada por el acceso y procesamiento del alimento. Las principales funciones hepáticas como son el control y/o la síntesis de metabolitos sanguíneos críticos como la glucosa, lipoproteínas, ácidos grasos libres, cuerpos cetónicos, aminoácidos, hormonas, factores de crecimiento, y mediadores de respuesta de fase aguda, muestran variaciones circadianas.

### 3. JUSTIFICACIÓN.

El hígado es el órgano principal en el procesamiento y manejo de nutrientes para el adecuado suministro de energía al organismo. Bajo horarios diarios de restricción alimenticia, el alimento actúa como una señal sincronizadora principal en este órgano, la cual, atenúa la influencia jerárquica del reloj biológico principal (NSQ).

Aunque el sustrato del OSA aún es desconocido, el hígado es considerado una parte fundamental del mismo. Reportándose que en este órgano, las acrofases de los genes reloj, se recorren a las horas de alimentación, lo que supondría que una serie de cambios metabólicos se llevan a cabo con el fin de aprovechar al máximo los nutrientes ingeridos. Por lo tanto, es importante entender las adaptaciones bioquímicas y fisiológicas de cada una de las poblaciones celulares hepáticas en condiciones alimenticias diferentes (grupo *Ad Libitum* y grupo con horario restringido de alimentación), donde 2 osciladores diferentes se están manifestando: NSQ y OSA, respectivamente. Esto nos dará un mejor entendimiento de cómo el hígado se adapta a diferentes protocolos de alimentación, y a la vez lleva a cabo la medición circadiana del tiempo.

#### **4. HIPÓTESIS.**

La especialización celular y metabólica de la zonación hepática en condiciones de alimentación *Ad libitum* y restringida, determina una expresión y distribución diferencial de la proteína reloj PER1 en los hepatocitos periportales y pericentrales.

#### **5. OBJETIVOS.**

- a) En el tiempo de expresión máxima, determinar los niveles de PER1 en las poblaciones de hepatocitos periportales y pericentrales en ratas en restricción de alimento y alimentadas *Ad libitum*.
  
- b) Determinar la expresión de PER1 en las poblaciones celulares del acino hepático en animales bajo un protocolo de condición alimenticia agudo (Ayuno simple de 22h + realimentación de 2 h y ayuno simple de 46 h + realimentación de 2h).

## 6. MÉTODOS.

### 6.1 Animales y condiciones experimentales.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso de entre 180-220 g, las cuales se mantuvieron en un ciclo de luz-oscuridad 12:12 h (encendido de luz 08:00 h) y una temperatura constante de  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ . La intensidad luminosa fue de 350 luxes. Todos los experimentos fueron aprobados por las normas de la Guía para el Cuidado y Manejo de Animales para Experimentación (Universidad Nacional Autónoma de México).

Las ratas se mantuvieron con libre acceso al alimento (Purina Chow) y fueron aclimatadas a las condiciones del laboratorio durante 3 días, antes de iniciar el experimento. Se asignaron de manera aleatoria a los animales en cada uno de los siguientes grupos: 1) grupo *Ad Libitum* el cual tuvo libre acceso al alimento (Purina Chow), 2) un grupo sincronizado por alimento, que accedió al alimento por 2 h al día (12:00 a 14:00 h), 3) un grupo que tuvo un ayuno único de 22 h, 4) un grupo que fue realimentado por 2 h después de un ayuno único de 22:00 h, 5) un grupo que tuvo un ayuno único de 46:00 h y 6) un grupo que fue realimentado 2h después del ayuno único de 46:00 h. La duración del protocolo fue de 3 semanas para los animales con horario restringido y alimentación *Ad libitum* (Díaz-Muñoz et al., 2000).

Los grupos con alimentación *Ad Libitum* y con horario restringido de alimentación se sacrificaron en diferentes puntos temporales (8:00, 11:00, 14:00, 17:00, 20:00 y 23:00 h). Las ratas de ayuno simple de 22 h se sacrificaron a las 11:00 h y las del grupo realimentado a las 14:00 h (Díaz-Muñoz y col., 2000).

### 6.2 Inmunohistoquímica.

Las ratas se sacrificaron mediante decapitación y se les extrajo el hígado, el cual se pesó inmediatamente. Del peso total de este órgano, se tomaron 5g para fraccionamiento y la parte restante de tejido se cortó cuidadosamente en trozos pequeños de  $1\text{-}2\text{ mm}^3$ , los cuales se utilizaron para inmunohistoquímica.

Las muestras para inmunohistoquímica se fijaron en formalina 0.08 M (formaldehído al 37% 100 ml, agua destilada 900 ml, fosfato de sodio monobásico 4 g y fosfato de sodio dibásico 6.5 g). Una vez fijadas, se deshidrataron en un tren de alcoholes (60% 2 h, 70% 2 h, 80% 2 h, 96% 1 h, alcohol absoluto 2 h, ETOH 50%- Xileno 50% 2 h, xileno 2 h).

Posteriormente, las muestras fueron incluidas en parafina y se cortaron en un micrótopo de rotación, a un grosor de 7  $\mu\text{m}$ . Los cortes obtenidos fueron recolectados en portaobjetos gelatinizados. Para llevar a cabo la inmunohistoquímica, las muestras fueron desparafinadas en el horno a 60° C durante 12 h, al término de las cuales fueron introducidas en los siguientes solventes: xilol 100% (15 min), xilol 100% (15 min), xilol absoluto-etanol absoluto (10 min), etanol absoluto (10 min), etanol absoluto (10 min), etanol 96% (15 min), etanol 96% (15 min), etanol 80% (15 min), etanol 60% (15 min) y agua destilada (15 min). Las muestras fueron hervidas en buffer de citratos durante 20 min y posteriormente se bloquearon con leche baja en grasa al 1% durante 1 h. El agente bloqueador se removió con TBST (TBS (Tris/HCl 20 mM, pH 7,4; NaCl 150 mM, Tritón X100 10ml) y las muestras fueron incubadas con el anticuerpo primario Per-1 de cabra (dilución 1:250 en TBST) durante toda la noche en una cámara húmeda. Al día siguiente, las muestras se lavaron 3 veces con TBST (5 min por vez) y se incubaron durante 2 h en la oscuridad con el anticuerpo secundario anti-cabra acoplado a rojo Tejas (dilución 1:300 en TBST). Se conservaron laminillas sin anticuerpo primario como control negativo y para verificar la fluorescencia endógena. Para preservar las preparaciones, las muestras se lavaron 3 veces con TBST (5 min por vez) y se dejaron secar para su sellado con glicerol y esmalte transparente. Las muestras selladas, se mantuvieron en refrigeración hasta llevar a cabo la cuantificación de su fluorescencia.

### **6.3 Cuantificación de la fluorescencia.**

#### **6.3.1 Fluorescencia total.**

Para cuantificar la fluorescencia total de PER1 en el hígado, se empleó el microscopio de fluorescencia Olympus CX31, acoplado a una cámara Olympus DP71. Con el cual se observaron utilizando el objetivo 4X, tres laminillas por cada animal experimental (dos laminillas utilizadas como control positivo y una laminilla utilizada como control negativo). De cada laminilla positiva, se fotografiaron 5 cortes histológicos (Fig. 5), mientras que de cada laminilla negativa, se fotografiaron 10 cortes histológicos, para su posterior cuantificación. Cada grupo experimental tuvo una  $n=4$  animales, por lo que el total de cortes histológicos fotografiados en cada grupo que integró los horarios del estudio fue  $n=40$ . La fluorescencia total se obtuvo con el programa Image Pro-Plus al promediar los valores arrojados por una macro (de área y forma determinada) en cada una de los cortes histológicos mencionados. La prueba estadística aplicada fue una t Student ( $p<0.05$ ).

### **6.3.2 Expresión zonal de PER1.**

Las laminillas anteriores, fueron observadas en el microscopio de fluorescencia Olympus CX31, utilizando el objetivo 10 X (tres laminillas/animal: dos como control positivo y una como control negativo). Cada grupo experimental tuvo una n=4 animales. El propósito de utilizar este objetivo fue detectar las referencias anatómicas del acino hepático (Fig. 7), que nos permitieron identificar con claridad las poblaciones de hepatocitos periportales y pericentrales en el hígado de rata. Cada población fue fotografiada con el objetivo 40X, lo que permitió cuantificar PER1 en cada célula hepática. La fluorescencia de PER1 se obtuvo con el programa Image Pro-Plus, al promediar los valores obtenidos por una macro (de área y forma determinada) en cada uno de los hepatocitos periportales y en cada uno de los hepatocitos pericentrales fotografiados. El número de hepatocitos cuantificados fue de 100 hepatocitos/rata. Por lo que, el número total de hepatocitos cuantificados en cada grupo experimental fue: 400 hepatocitos periportales y 400 hepatocitos pericentrales. La prueba estadística utilizada fue una t Student ( $p < 0.05$ ).

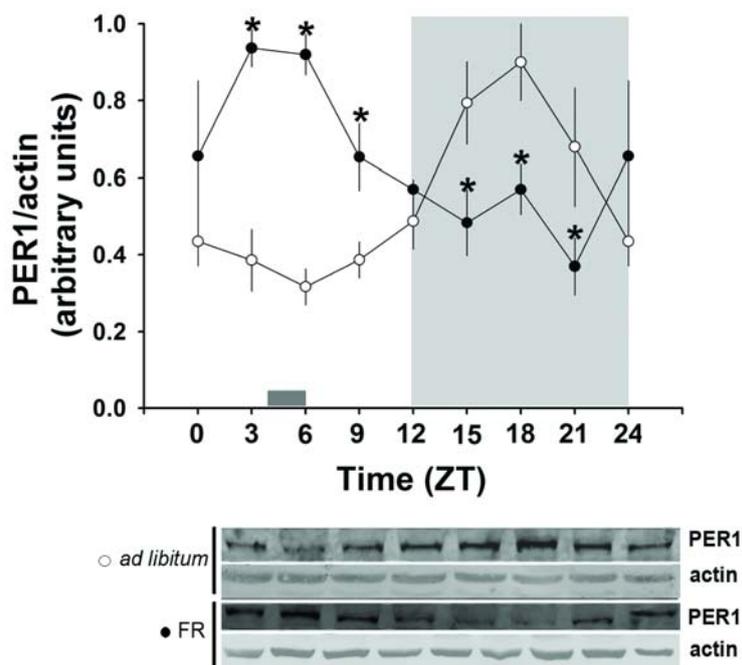
### **6.4 Western blot.**

La fracción celular correspondiente al homogenado hepático, se resuspendió en el buffer de muestra SDS (duodecil sulfato de sodio) en condiciones reductoras y desnaturalizantes. La proteína fue separada en un gel de electroforesis SDS-PAGE al 7.5 %. Posterior a la electroforesis, la proteína se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se bloqueó con leche con leche descremada al 5% y PBS Tween al 0.1 % durante 1 h a temperatura ambiente. Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo policlonal anti PER-1 de cabra toda la noche, el cual se utilizó a una dilución de 1:500. Las membranas fueron lavadas y reveladas con el anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina. La relación entre la actina y la señal de la proteína experimental se utilizó para cuantificar los resultados del inmunoblot.

## 7. RESULTADOS.

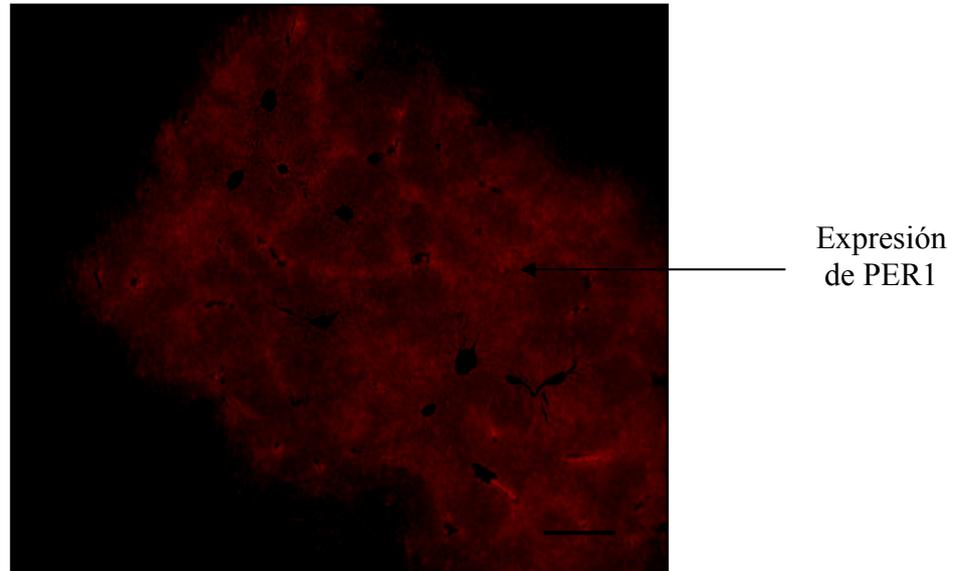
### 7.1 Expresión total de PER1 en los grupos experimentales *Ad Libitum* y con alimentación restringida (HRA).

La primera parte del experimento, consistió en reproducir la ritmicidad de PER1 hepática, en animales con alimentación *Ad Libitum* y animales con restricción alimenticia, a través de la metodología inmunohistoquímica. Así como el validar estos resultados con los antecedentes que ya se han obtenido en el laboratorio a través de la técnica de Western blot (Fig. 4).



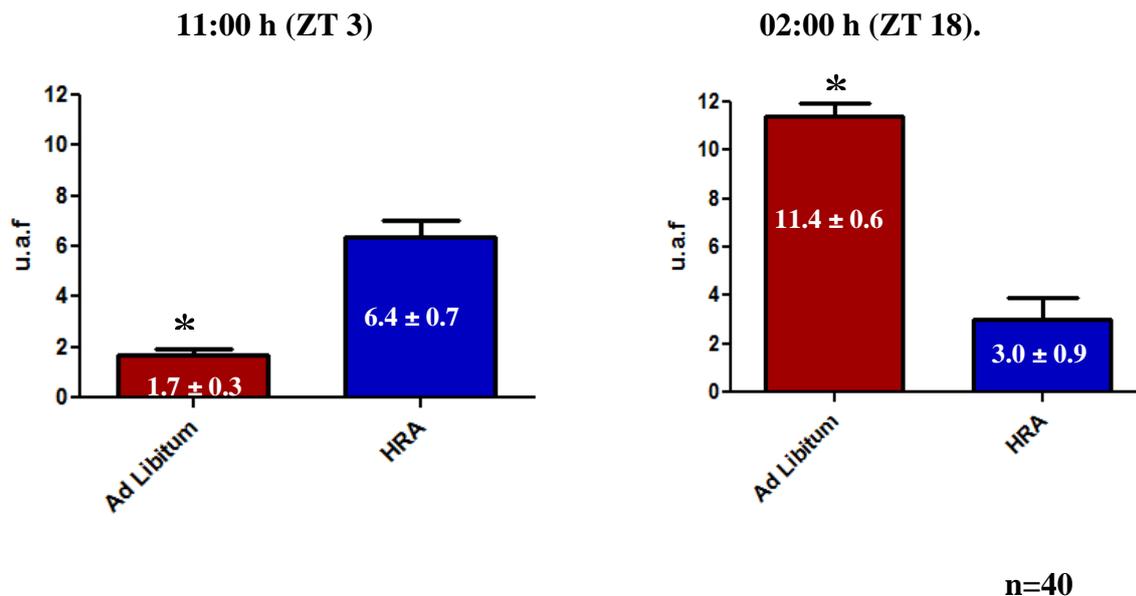
**Figura 4.** Ritmicidad de PER1 hepática, en animales alimentados *Ad Libitum* (círculos blancos) y animales con restricción alimenticia (FR) en círculos negros. La barra gris en el eje X, indica el tiempo en que se alimentó a los animales bajo FR. El bloque blanco representa la fase diurna y el bloque gris representa la fase nocturna. En la parte inferior, se muestra el Western blot de PER1, obtenido de fracciones citosólicas de hígado, en ambas condiciones alimenticias. Puede apreciarse que, la mayor expresión de PER1 (acrofase) en los animales *Ad Libitum* es durante la fase nocturna, en ZT 18 (02:00 h). Mientras que, la acrofase de PER1 en los animales con restricción alimenticia se mueve hacia la fase diurna, cerca de la hora de alimentación, a ZT 3 (11:00 h).

Los resultados inmunohistoquímicos fueron observados a través de microscopía de fluorescencia, al tomar fotografías panorámicas con el objetivo 4X para cada uno los cortes histológicos utilizados. En estos, pueden observarse regiones específicas de expresión de PER1 (Fig. 5).



**Figura 5.** Imagen panorámica de los cortes histológicos de hígado, en los que puede apreciarse regiones de mayor fluorescencia que indican la expresión de PER1. Barra de calibración= 1mm.

La cuantificación de fluorescencia en los cortes histológicos del hígado de rata, fue llevada a cabo en los horarios de las 11:00 h y las 02:00 h, correspondientes a las acrofases de PER1 en animales con HRA y animales *Ad Libitum*, respectivamente (Fig. 6).

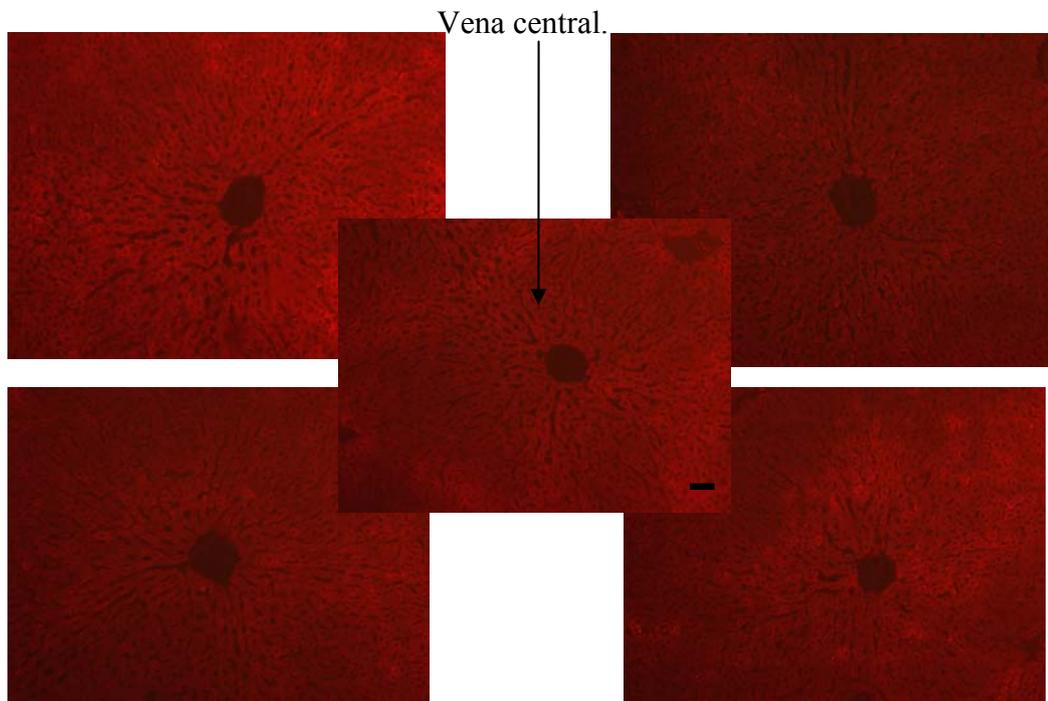


**Figura 6. Expresión total de la proteína reloj PER1 hepática en los grupos experimentales *Ad Libitum* y con alimentación restringida (HRA).** En el horario de las 11:00 h (ZT 3), el grupo de ratas HRA presenta una mayor expresión en la señal fluorescente de la proteína PER1 hepática ( $6.4 \pm 0.7$ ), respecto al grupo control *Ad Libitum* ( $1.7 \pm 0.3$ ), cuya diferencia estadísticamente significativa se marca con un asterisco. Dicha diferencia equivale a un incremento total del 276.4% en la señal de PER1. Confirmando que la acrofase de PER1 en el grupo HRA se presenta a las 11:00 h, (Luna-Moreno et al, 2009). Sin embargo, en el horario de las 02:00 h (ZT 18), el grupo de ratas HRA presenta una disminución en la expresión de PER1 ( $3.0 \pm 0.9$ ) aproximadamente del 73.6 % respecto al grupo *Ad Libitum* ( $11.4 \pm 0.6$ ), la diferencia estadística se marcó con un asterisco. Lo anterior, nos indica que la acrofase de Per1 en el grupo *Ad Libitum*, se presenta a las 02:00 h (Luna-Moreno et al, 2009), ya que es el período de mayor actividad de dicho grupo, debido a que las ratas son animales de hábitos nocturnos. La relación pico PER1/valle PER1 en cada condición alimenticia es: Grupo *Ad Libitum* =  $6.7 \pm 2.0$ ; Grupo HRA =  $2.13 \pm 1.2$

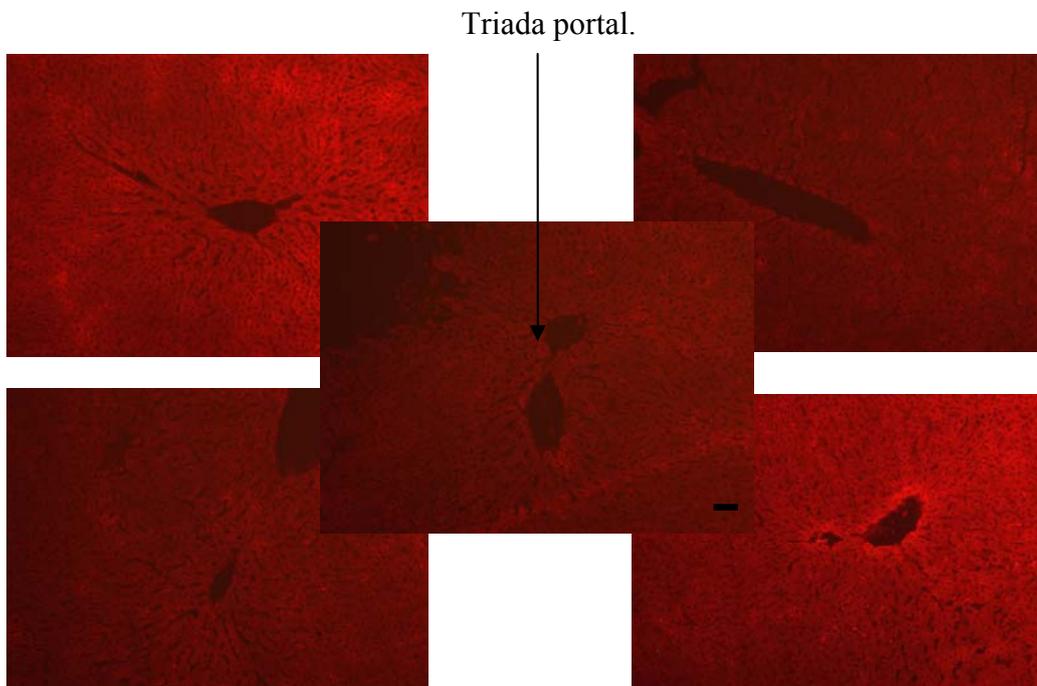
Una vez validado el resultado inmunohistoquímico y encontrar que las acrofases de PER1 en ambas condiciones alimenticias, coinciden con lo previamente reportado por western blot; el siguiente paso fue determinar como se distribuía PER1 a lo largo del acino hepático en condiciones de alimentación *Ad Libitum* y restringida, en las poblaciones de hepatocitos periportales y pericentrales. Para lo cual, se tomaron fotografías de los cortes histológicos a

un aumento de 10X, lo cual permitió identificar con claridad cada población hepática de acuerdo a ciertas referencias anatómicas en el acino hepático (Fig. 7).

A)



B)



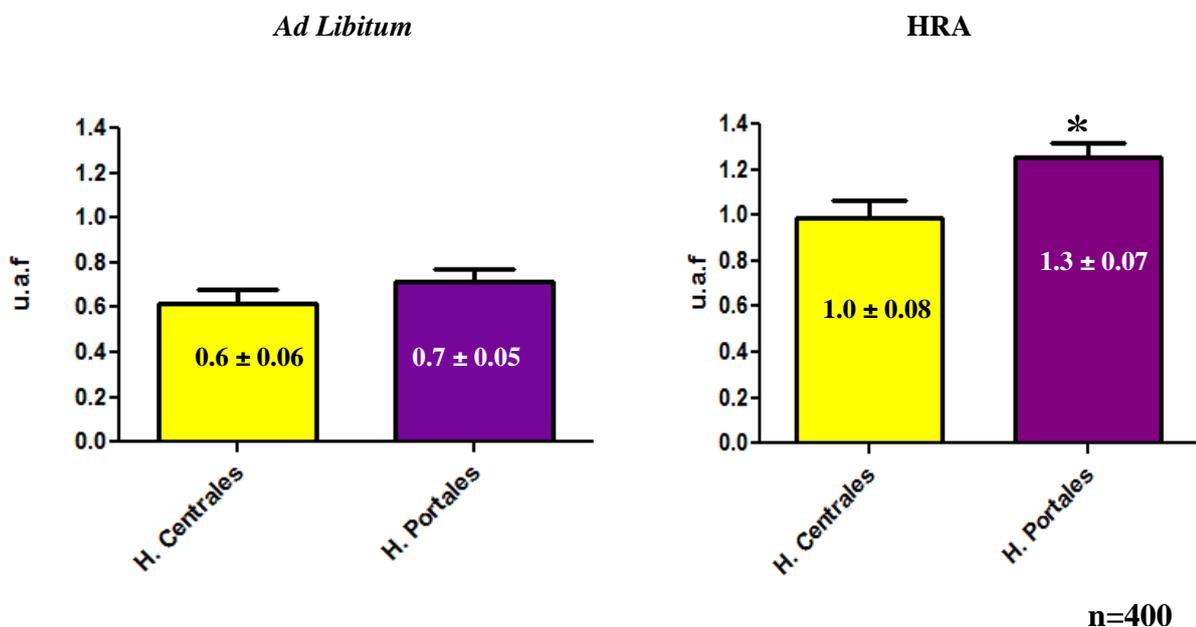
**Figura 7.** Imágenes representativas con sus respectivas referencias anatómicas de 2 regiones diferentes del acino hepático, donde hay expresión de PER1. A) Región pericentral o perivenosa, en la cual puede apreciarse el trayecto que deja a su paso la vena central y la cual es la principal referencia anatómica de esta zona y B) Región periportal, en la cual se aprecia

el trayecto que dejan a su paso los elementos de la triada portal (arteria hepática, vena porta y conducto biliar), característicos de esta zona del acino. Barra de calibración= 25  $\mu$ m.

Una vez identificada cada población de hepatocitos, se tomaron fotografías a un aumento 40X, lo cual permitió cuantificar la fluorescencia de un gran número de células conformantes de cada una de las poblaciones en estudio. Este experimento fue realizado tanto en condiciones de alimentación *Ad Libitum* como HRA, en 2 puntos temporales, correspondientes a las acrofases PER1 en el Oscilador Sincronizado por Luz (02:00 h) o ZT 18 y en el Oscilador Sincronizado por el Alimento (11:00 h) o ZT 3. (Figs. 8 y 9).

## 7.2 Expresión zonal de PER1 en los grupos *Ad Libitum* y HRA.

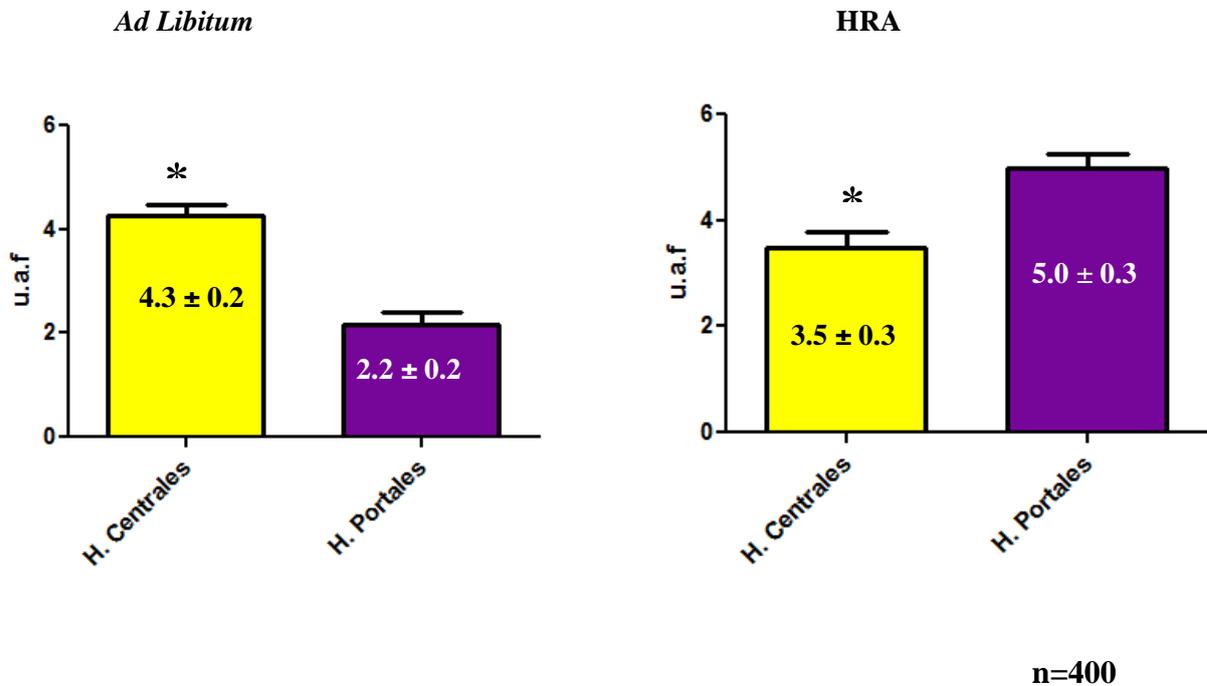
### • 11:00 h (ZT 3).



**Figura 8.** En el horario de las 11:00 h (ZT 3), el grupo control *Ad Libitum*, no muestra una expresión zonal de la proteína reloj PER1 hepática entre las poblaciones de hepatocitos pericentrales ( $0.6 \pm 0.06$ ) y portales ( $0.7 \pm 0.05$ ). Ya que, la diferencia entre ellos no es significativa. En el mismo horario, pero en el grupo HRA, la presencia de PER1 hepática es dual en ambas poblaciones de hepatocitos, pero su expresión preponderante es periportal ( $1.3 \pm 0.08$ ), presentando un aumento en su expresión del 30%, respecto a la población de hepatocitos centrales ( $1.0 \pm 0.08$ ). Dicha diferencia es significativa y está marcada con un asterisco. La señal de PER1 incrementó 66% en los hepatocitos centrales del grupo HRA respecto al grupo control, mientras que el incremento de la señal en los hepatocitos portales

fue del 86%. En este horario, la relación de hepatocitos periportales/pericentrales (PP/PC) en cada condición alimenticia es: Grupo *Ad Libitum* =  $1.16 \pm 0.8$ . Grupo HRA =  $1.3 \pm 0.9$

- **02:00 h (ZT 18).**



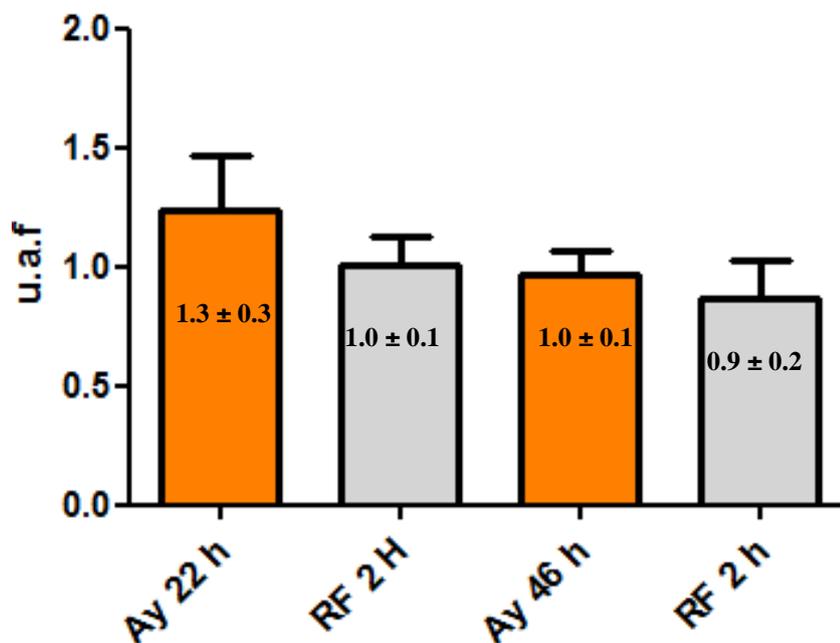
**Figura 9.** En el horario de las 02:00 h (ZT 18), el grupo *Ad Libitum*, presenta una expresión zonal de PER1 preponderante en la población de hepatocitos centrales ( $4.3 \pm 0.2$ ), lo cual equivale a un incremento del 95.4% respecto a la población de hepatocitos periportales ( $2.2 \pm 0.2$ ). La diferencia entre ambas poblaciones es significativa y se marcó con un asterisco. Sin embargo, en el mismo horario, pero en el grupo HRA, se aprecia una mayor expresión de PER1 hepática en la población de hepatocitos periportales ( $5.0 \pm 0.3$ ), presentando un aumento en su expresión del 42.8%, respecto a la población de hepatocitos centrales ( $3.5 \pm 0.3$ ). Dicha diferencia también es significativa y está marcada con un asterisco. La relación PP/PC en cada condición alimenticia es: Grupo *Ad Libitum* =  $0.5 \pm 1.0$ ; Grupo HRA =  $1.4 \pm 1.0$

Hasta este punto, se ha estudiado la expresión de PER1 desde un punto de vista temporal y de condición alimenticia cuando están establecidos el OSL o el OSA. Y se ha observado que PER1 se comporta de manera diferente en ambos Osciladores, lo cuál puede ser debido a cambios metabólicos causados por el estado alimenticio crónico *Ad Libitum* o restringido. Sin

embargo, ¿cómo se comporta PER1 bajo un protocolo de alimentación agudo? ¿Es diferente su distribución zonal?

Ante estas preguntas, el siguiente paso en la parte experimental fue cuantificar (como en los experimentos anteriores) la expresión y distribución de PER1 utilizando controles de condición alimenticia aguda, constituidos por un ayuno simple (Ay) de 1 día (22 h de ayuno), seguido de una realimentación (RF) de 2 h y un Ay simple de 2 días (46 h de ayuno), seguido de una RF de 2h (Figs. 10, 11 y 12).

### 7.3 Expresión total de PER1 en los controles de condición alimenticia.

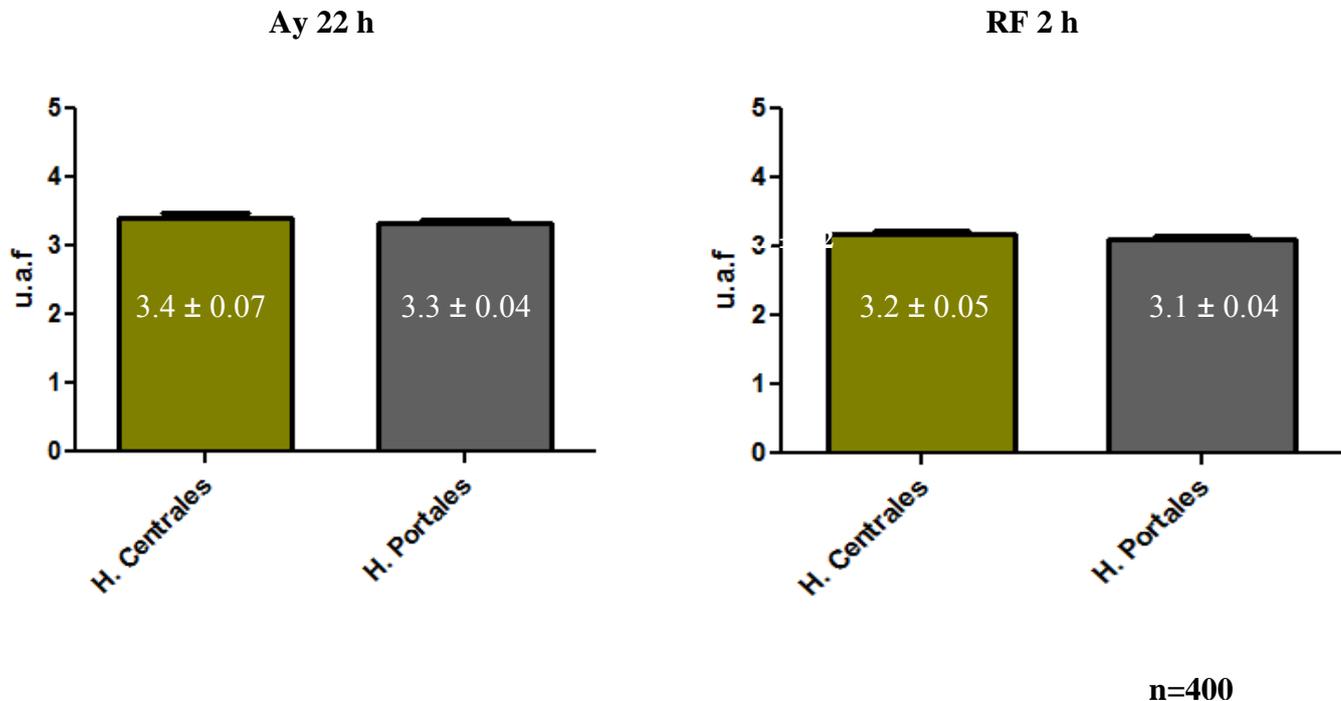


n=40

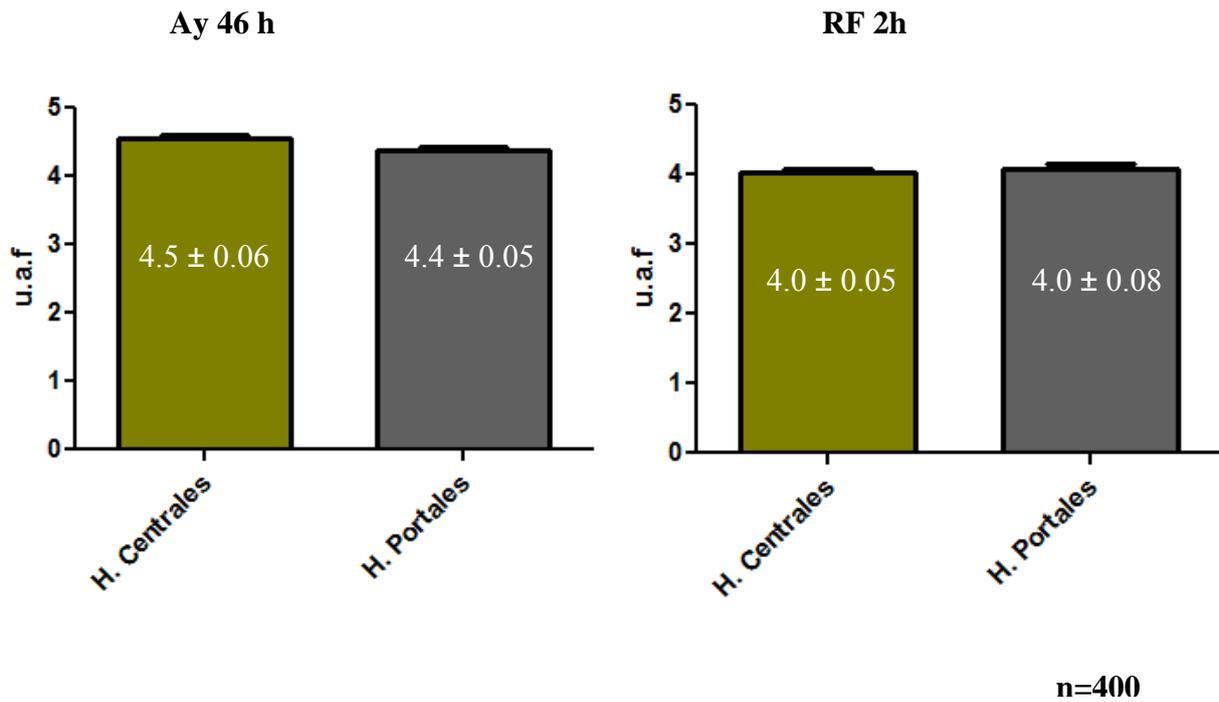
**Figura 10.** El grupo de animales sometidos al efecto agudo del protocolo experimental, correspondiente a un ayuno simple (Ay) de 22 h ( $1.3 \pm 0.3$ ), muestran una pequeña diferencia en la expresión de PER1 respecto a su grupo realimentado (RF) de 2 h ( $1.0 \pm 0.1$ ), la cual es no significativa. Al proseguir el Ayuno un día más (Ayuno de 46 h), la expresión de Per1 decae ligeramente ( $1.0 \pm 0.1$ ), respecto al Ay de 22 h, sin mostrar diferencias significativas. La realimentación posterior de este grupo RF de 2 h ( $0.9 \pm 0.2$ ) se ve decrementado ligeramente en la expresión de PER1, la cual tampoco es estadísticamente significativa respecto al grupo Ay 46 h. Puede apreciarse en la figura que no existen diferencias significativas entre los grupos ayunados con una posterior realimentación (Ay 22h vs RF 2h; Ay 46 h vs RF 2h). Así

como tampoco entre los grupos de ayuno (Ay 22 h vs Ay 46 h), como en su correspondiente realimentación (RF 2h del grupo Ay 22 h vs Rf 2 h del grupo Ay 46 h).

#### 7.4 Expresión zonal de PER1 en los controles de condición alimenticia.



**Figura 11.** El nivel de expresión de PER1 en el Ay 22 h es muy parecida tanto en la población de hepatocitos centrales ( $3.4 \pm 0.07$ ), como en la población de hepatocitos periportales ( $3.3 \pm 0.04$ ), sin que exista una diferencia estadísticamente significativa entre ambas poblaciones, por lo cual se puede afirmar que, bajo tal protocolo experimental no hay una zonación metabólica. De igual manera, en la posterior RF de 2 h del grupo Ay de 22 h, no se presenta una diferencia significativa en la expresión de PER1 entre las poblaciones de hepatocitos centrales ( $3.2 \pm 0.05$ ) y periportales ( $3.1 \pm 0.04$ ). Por lo tanto, también puede afirmarse que el fenómeno de zonación no está presente. La relación PP/PC en cada control de condición alimenticia es: Ay 22 h =  $1.0 \pm 0.6$ ; RF 2 h =  $1.0 \pm 0.8$



**Figura 12.** La expresión zonal de la proteína reloj PER1 hepática en el Ay 46 h es idéntica tanto en la población central ( $4.5 \pm 0.06$ ), como en la población periportal ( $4.4 \pm 0.05$ ), por lo que podemos decir que no se presenta una zonación hepática bajo tal condición. En el grupo RF 2 h, tampoco se aprecia una zonación hepática, ya que la expresión de PER1 entre ambas poblaciones es muy similar, sin tener una diferencia estadísticamente significativa.

La relación PP/PC en cada control de condición alimenticia es: Ay 46 h =  $1.0 \pm 0.8$ ; RF 2 h =  $1.0 \pm 1.6$

## 8. DISCUSIÓN.

El análisis cuantitativo de las fracciones citosólicas hepáticas a través de Western blot en nuestro grupo de trabajo, ha mostrado que en el hígado de los animales sincronizados por luz (*Ad Libitum*), la acrofase de la proteína reloj PER1 se presenta durante la fase nocturna 02:00 h (ZT18) (Luna-Moreno et al, 2005). Esta fase de oscuridad, corresponde al período de mayor actividad en los roedores. Sin embargo, la acrofase de PER1 en el hígado de los animales sincronizados por el alimento (HRA), se presenta durante la fase diurna a las 11:00 h (ZT 3) (Luna-Moreno et al, 2009). Lo cual es debido a que en tejidos periféricos, los ritmos circadianos conductuales y fisiológicos modifican sus oscilaciones recorriendo sus acrofases alrededor de las horas de alimentación. Ya que el alimento adquiere relevancia como principal sincronizador con cierta independencia del ciclo luz-oscuridad (Escobar et al, 2001). Los datos anteriores, fueron reproducidos y confirmados en este trabajo, a través del análisis inmunohistoquímico de la señal fluorescente de PER1, cuantificada por microscopía a un bajo aumento (4 X). Figura 4.

En el horario de las 11:00 h (ZT 3), correspondiente a la acrofase del grupo HRA y a la batifase del grupo control (*Ad Libitum*), se observa una diferencia del 276.4% en la expresión total de Per1. Mientras que, en el horario de las 02:00 h (ZT 18), correspondiente a la acrofase del grupo *Ad Libitum* y a la batifase del grupo HRA, la diferencia de expresión de PER1 es del 73.6%

La relación acrofase/batifase de PER1 (Grupo *Ad Libitum*=  $6.7 \pm 2.0$  y grupo HRA=  $2.13 \pm 1.2$ ) nos muestra que durante un ciclo completo, el grupo control tiene el triple de expresión de PER1, respecto al grupo HRA. Lo cual probablemente es debido a que, desde el punto de vista metabólico, la alimentación *Ad Libitum* y el HRA son 2 condiciones alimenticias diferentes, ante las cuales el organismo tiene que adaptarse y echar mano de diversas rutas metabólicas que a su vez tienen disimilitud en su impacto sobre el reloj molecular. En este sentido, puede hablarse de una regulación cronostática (Aguilar-Roblero y Díaz-Muñoz, 2009), en la cual hay una relación recíproca entre el mecanismo molecular del reloj circadiano y las rutas señaladores que controlan las vías metabólicas en puntos de interacción a diversos niveles, como son: carga energética, estado redox, receptores nucleares y la dinámica de calcio (Fig.1). Aunado a esta relación, el hígado, considerado como el órgano central en el mantenimiento del suministro de energía al organismo, presenta desde un punto de vista anátomo-funcional, capacidades metabólicas diferentes, lo cual le confiere una heterogeneidad celular en las funciones que desempeña. Esta especialización poblacional

establecida por la localización de los vasos sanguíneos, la concentración de oxígeno, nutrientes y enzimas, y la actividad de éstas últimas, propicia el fenómeno conocido como “zonación metabólica.” (Gebhardt 1992). Lo que da lugar a la división del acino hepático en 3 zonas: pericentral, intermedia y periportal.

Durante el horario de las 11:00 h (ZT 3), la expresión zonal de PER1 en el valle del ritmo, correspondiente al control *Ad Libitum*, no presenta zonación en las poblaciones hepáticas. En tanto que, en el grupo HRA correspondiente al pico del ritmo, la expresión zonal es periportal. La relación de hepatocitos periportales/hepatocitos pericentrales (PP/PC) en este horario es: Grupo *Ad Libitum*= $1.16 \pm 0.8$ ; Grupo HRA =  $1.3 \pm 0.9$ , lo que nos indica ligeramente una mayor zonación del grupo HRA, respecto al control, ver Fig. 5

En el horario de las 02:00 h (ZT 18), correspondiente a la acrofase de PER1 en el grupo *Ad Libitum*, la zonación hepática es pericentral. Sin embargo, en el valle del ritmo de PER1 correspondiente al grupo HRA, la expresión zonal sigue siendo periportal y la relación PP/PC (Grupo *Ad Libitum* =  $0.5 \pm 1.0$ ; Grupo HRA =  $1.4 \pm 1.0$ ). Lo cual, nos indica una zonación más evidente del grupo control, respecto al grupo HRA.

La diferencia en el patrón de zonación entre el grupo *Ad Libitum* y el grupo HRA, sugiere fuertemente que, en cada grupo de animales, el manejo de nutrientes está siendo procesado de manera diferente. Ya que después de un determinado número de ciclos bajo restricción alimenticia, cierta adaptación conductual y fisiológica empieza a ser observada. La gran ingesta de comida que ocurre durante el acceso al alimento después de la restricción, 6 veces más que en condiciones *Ad Libitum* (Martínez-Merlos et al, 2004) produce una gran distensión estomacal que decrece lentamente, de acuerdo a como el alimento es procesado. Además, durante la actividad anticipatoria al alimento (AA) diferentes eventos bioquímicos toman lugar en el hígado. Hay un incremento de ácidos grasos que promueve la cetogénesis y al mismo tiempo el glicógeno hepático es parcialmente degradado. Lo cual indica que durante la AA la energía hepática deriva de la oxidación de lípidos, más que del metabolismo de carbohidratos (Báez-Ruíz et al, 2005; Luna-Moreno et al, 2007). Lo cual tiene una relación directa con la alta especialización metabólica y el gradiente enzimático presente en cada población hepática (Braeuning et al, 2006). Ya que, mientras que los hepatocitos pericentrales llevan a cabo la captación de glucosa (glicólisis, síntesis de glucógeno vía directa, glucogenólisis a lactato y ciclo de las pentosas); metabolismo de aminoácidos (formación de glutamina); metabolismo de lípidos (lipogénesis de novo, formación y secreción de VLDL y formación de Acetil CoA). Los hepatocitos periportales están implicados en el metabolismo oxidativo (Ciclo de Krebs y fosforilización oxidativa); salida de glucosa (gluconeogénesis,

síntesis de glucógeno desde lactato y aminoácidos por vía indirecta, glucogenólisis); metabolismo de aminoácidos (captación de aminoácidos, aminoácido oxidasa, ureogénesis de amonio intestinal y ureogénesis de aminoácidos); metabolismo de lípidos (oxidación de ácidos grasos, síntesis de colesterol, formación de ácidos biliares y conversión de acetato a Acetil CoA). Lo cual hace sentido con que la zonación hepática bajo la expresión del OSA sea periportal a lo largo del ritmo.

Por otra parte, la condición de ayuno simple, es un factor importante que incrementa la expresión de ARNm de PER1, (Kawamoto et al, 2006). Los resultados muestran que no se produjo zonación en ninguno de los grupos ayunados (22 y 46 h), ni en los grupos ayunados con posterior realimentación de 2h. Esto es contundente al observar las relaciones PP/PC entre ellos (Ay 22 h =  $1.0 \pm 0.6$ ; RF 2 h =  $1.0 \pm 0.8$  y Ay 46 h =  $1.0 \pm 0.8$ ; RF 2 h =  $1.0 \pm 1.6$ ), donde prácticamente los 4 grupos se comportan igual y tienen ausencia en la zonación. Esto es debido a que, la restricción aguda del alimento no es suficiente para inducir cambios metabólicos significativos que se manifiesten a través de la zonación, pues la zonación de Per1 está asociada al funcionamiento del reloj molecular (ya sea por el oscilador sincronizado por luz o por el oscilador sincronizado por el alimento) y no responde a la condición alimenticia (ayuno y realimentación).

Lo anterior sugiere que, los cambios metabólicos se producen de manera gradual ante una determinada condición alimenticia, cuando esta se vuelve crónica. Lo cual se ejemplifica durante el establecimiento del OSA.

La discusión anterior implicaría que, durante el establecimiento del OSA, rutas metabólicas específicas llevadas a cabo en la zona periportal del hígado están soportando las necesidades energéticas de los animales sometidos a restricción alimenticia. A diferencia de la adaptación metabólica que ocurre en el grupo *Ad Libitum* y que éstas adaptaciones bioquímicas tienen una repercusión directa en el mecanismo molecular del reloj circadiano, evaluado por la expresión de Per1.

## 9. CONCLUSIONES.

### **Grupo *Ad Libitum*.**

- ▶ La zonación de PER1 es mayor en el pericentro del acino hepático, durante el valle de su ritmo de expresión (ZT3).
- ▶ Durante la acrofase de PER1 (ZT 18), se pierde la zonación.

### **Grupo con HRA.**

- ▶ En contraste con el grupo control, PER1 se expresa principalmente en los hepatocitos periportales, tanto en el valle (ZT 18) como en el pico (ZT 3) del ritmo.

### **Controles de Condición Alimenticia.**

- ▶ El ayuno de 1 ó 2 días, seguido de realimentación no influye en la expresión zonal de PER1.

LA EXPRESIÓN DE PER1 SE VUELVE PREPONDERANTE DE LA ZONA PERIportal DEL HÍGADO CUANDO SE EXPRESA EL OSA.

Lo anterior implicaría que, un órgano aparentemente homogéneo como el hígado, cuya oscilación en sus proteínas es constante, al ser estudiado más detalladamente muestra que la medida del tiempo es realizada de manera diferente por poblaciones celulares específicas, las cuáles tiene una estrecha relación con el estado metabólico y alimenticio del organismo.

## 10. PERSPECTIVAS.

En condiciones fisiológicas, la enzima glutamino sintetasa (GS), es un marcador de la zona pericentral hepática (Brauning et al, 2006). Además, por estudios con microarreglos, se tiene el antecedente de que la GS aumenta antes de la presentación del alimento y disminuye después de que los animales comen, podríamos medir la actividad enzimática de GS y correlacionarla en ambos Osciladores con las rutas metabólicas en las que participa. Y posteriormente, utilizarlo como referencia, para que pudiera estudiarse el proceso dinámico de la zonación (Kinugasa et al, 1986). Lo cual, se llevaría a cabo al medir la presencia y actividad enzimática de la carbamil fosfato sintetasa (enzima limitante del ciclo de la urea), en animales *Ad Libitum* donde la expresión es principalmente portal, pero cuya distribución se encuentra en gradiente a lo largo del acino hepático, versus animales con restricción alimenticia, en los cuales podría modificarse la concentración enzimática o el gradiente de distribución. Estos experimentos, podrían darnos información sobre los cambios en la zonación hepática “dinámica” al presentarse diferentes condiciones alimenticias.

Además, podríamos estudiar la relación entre el reloj molecular y el metabolismo al seleccionar una vía metabólica específica en el manejo de algún nutriente y obtener la ritmicidad de alguna de sus enzimas y de PER1 al implementarse el OSA. Lo cual podría complementarse al realizar hibridación in situ para PER1 o algún otro componente del mecanismo molecular del reloj en cada población de hepatocitos. Ya que esto podría indicarnos si existiera la posibilidad de que las 2 poblaciones de hepatocitos marquen el tiempo de igual manera.

## 11. REFERENCIAS.

1. Aguilar-Roblero R y Díaz-Muñoz M. (2009). Chronostatic adaptations in the liver to restricted feeding: The FEO as an emergent oscillator. *Sleep and Biological Rhythms*. En prensa.
2. Aguilar R, Díaz-Muñoz M, Encinas F y Escobar C. (1998). Persistence of metabolic rhythmicity during fasting and its entrainment by restricted feeding schedules in rats. *Am. J. Physiol.* 274: R2048-R2056.
3. Aida R, Akiyama M, Hara R, Moriya T, Shíbata S, Wakamatsu H y Wan K. (2001). Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells.* 6: 269-278.
4. Ángeles M, Escobar C, Martínez MT y Mendoza JY. (2001). El alimento como sincronizador de los ritmos biológicos: su relevancia para la identificación de un oscilador circadiano. *Rev. Fac. Med. UNAM.* 44:58-62.
5. Antle MC, Silver R y Toshiyuki H. (2004). The role of *Period 1* in non-photic resetting of the hamster circadian pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Neurosci.* 362: 87-90.
6. Badiu C. (2003). Genetic clock of biologic rhythms. *J. Cell. Mol. Med.* 4: 408-416.
7. Báez-Ruíz A, Escobar C, Aguilar-Roblero R, Vázquez-Martínez O, Díaz-Muñoz M. (2005). Metabolic adaptations of liver mitochondria during restricted feeding schedules. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 289: G1015-23.
8. Balsalobre A, Damiola F, Schibler U. (1998). A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell.* 93: 929-937.
9. Bass J y Kohsaka A. (2007). A sense of time: How molecular clocks organize metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 18: 4-11.
10. Basu-Modak S, Braissant O, Desvergne B, Escher P, Michalik L y Wahli W. Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding. (2001). *Endocrinology.* 142:4195-4202.
11. Benzer S y Konopka RJ. (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68: 2112-2116.
12. Blei AT y Zee P. (1998). Abnormalities of circadian rhythmicity in liver disease. *J. Hepatol.* 29: 832-835.
13. Bolles RC y Stokes LW. (1965). Rat's anticipation of diurnal and a diurnal feeding. *J. Comp. Psychol.* 60: 290-294.
14. Braeuning A, Buchmann A, Bonin M, Hailfinger S, Ittrich C, Köhle C y Schwarz M. (2006). Differential gene expression in periportal and perivenous mouse hepatocytes. *FEBS Journal.* 273: 5051-5061.

15. Burke ZD y Tosh D. (2006). The Wnt/ $\beta$ -catenin pathway: master regulator of liver zonation? *BioEssays*. 28: 1072-77.
16. Damiola F, Fleury-Olela F, Kornmann B, Le Minh N, Preitner N y Schibler U. (2000). Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev*. 14: 2950-2961.
17. Dunlap JC (1996). Genetic and molecular analysis of circadian rhythms. *Annu Rev. Genet*. 30: 579-601.
18. Escobar C, Díaz-Muñoz M, Encinas F, Aguilar-Roblero R. (1998). Persistence of metabolic rhythmicity during fasting and its entrainment by restricted feeding schedules in rats. *Am. J. Physiol*. 274: 1309-16.
19. Fujimoto K, Furukawa M, Honda K, Hamada T, Honma K, Honma S, Kato Y, Katsura Y, Kawamoto T, Nakashima A, Noshiro M, Ueshima T y Usui E. (2006). Effects of Fasting and Re-Feeding on the Expression of *Dec1*, *Per1*, and Other Clock-Related Genes. *J. Biochem*. 140, 401–408
20. Gebhardt R. (1992). Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function. *Pharmacol. Ther*. 53: 275-354.
21. Hara R, Wan K, Wakamatsu H, Aida R, Moriya T, Akiyama M, Shibata S. (2001). Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes to Cells*. 6:269-278.
22. Hunter-Ensor M, Sehgal A y Ousley A. (1996). Control of circadian rhythms by a two-component clock. *Mol. Cell. Neurosci*. 7: 165-172.
23. Jungermann K y Katz N. (1989). Functional Specialization of Different Hepatocyte Populations. *Physiol. Rev*. 69(3): 708-51.
24. Kinugasa R y Thurman RG. (1986). Differential effect of glucagon on gluconeogenesis in periportal and pericentral regions of the liver lobule. *Biochem. J*. 236: 425-430.
25. Klein DC, Moore RY y Reppert SM. (1991). *Suprachiasmatic Nucleus. The Mind's Clock*. Oxford University Press. USA.
26. Luna-Moreno D, Vásquez-Martínez O, Báez-Ruíz A, Ramírez J, Díaz-Muñoz M. (2007). Food restricted schedules promote differential lipoperoxidative activity in rat hepatic subcellular fractions. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol*. 146:632-43.
27. Luna-Moreno D, Aguilar-Roblero R, Díaz-Muñoz M. (2009). Restricted feeding entrains rhythms of inflammation-related factors without promoting an acute-phase response. *Chronobiol. Int*. 26(7): 1409-29.
28. Martínez-Merlos MT, Ángeles-Castellanos M, Díaz-Muñoz M, Aguilar-Roblero R, Mendoza J, Escobar C. (2004). Dissociation between adipose tissue signals, behavior and the food entrained oscillator. *J Endocrinol*. 181: 53-63.

29. Mendoza J. (2006). Circadian Clocks: Setting Time by Food. *J. Neuroendocrinol.* 19: 127-137.
30. Mittleberger RE y Rechtschaffen (1984). Recovery of Anticipatory Activity to restricted feeding in rats with ventromedial hypothalamic lesions. *Physiol. Behav.* 33: 227-235.
31. Mittleberger RE (1994). Circadian Food-Anticipatory Activity: Formal Models and Physiological Mechanisms. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 18: 171-195.
32. Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M, Schultz PG, Kay SA, Takahashi JS y Hogenesch JB, (2002). Coordinated Transcription of Key Pathways in the Mouse by the Circadian Clock. *Cell.* 109: 307.
33. Phillips JL and Mikulka PJ. (1979). The effects of restricted food access upon locomotor activity in rats with suprachiasmatic nucleus lesions. *Physiol. Behav.* 23: 257-262.
34. Reppert S y Weaver D. (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature.* 418: 935-41.
35. Shigeyoshi Y, Taguchi K, Yamamoto S et al. (1997b). Light induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the *mPer-1* transcript. *Cell.* 91: 1043-1053.
36. Sisk CL, Stephan FK y Swann JM. (1979). Anticipation of 24 hr feeding schedules in rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus. *Behav. Neural Biol.* 25: 346-63.
37. Stephan FK. (1992). Resetting of a circadian clock by food pulses. *Physiol. Behav.* 52: 997-1008.
38. Stephan FK. (1997). Calories affect zeitgeber properties of the feeding entrained circadian oscillator. *Physiol. Behav.* 62: 995-1002.
39. Takahashi JS y Wilsbacher LD. (1998). Circadian Rhythms: molecular basis of the clock. *Curr. Op. Gen. Develop.* 8:595-602.
40. Yamazaki et al. (2000). Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science.* 288: 682-85.
41. Zylka MJ, Sheaman LP, Weaver DR, Reppert SM (1998). Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron.* 20: 1103-10.

## 12. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.

Tabla 1. Período de los ritmos biológicos clasificados de acuerdo a su frecuencia.	2
Tabla 2. Genes circadianos en el reloj molecular de mamíferos y de <i>Drosophila</i> .	7
Tabla 3. Distribución zonal (periportal o pericentral) de algunas funciones metabólicas presentes en el acino hepático.	15
Figura 1. Representación de algunos puntos de interacción entre el reloj molecular circadiano y el metabolismo energético.	4
Figura 2. Asa de retroalimentación transcripcional del reloj circadiano de mamíferos.	10
Figura 3. Representación esquemática de la unidad microanatómica del hígado.	13
Figura 4. Ritmicidad de PER1 hepática en animales alimentados <i>Ad Libitum</i> y animales con restricción alimenticia (HRA).	22
Figura 5. Imagen panorámica de los cortes histológicos de hígado.	23
Figura 6. Expresión total de la proteína reloj PER1 hepática en los grupos experimentales <i>Ad Libitum</i> y con alimentación restringida (HRA).	24
Figura 7. Imágenes representativas con sus respectivas referencias anatómicas de 2 regiones del acino hepático, donde hay expresión de PER1	25
Figura 8. Expresión zonal de PER1 en los grupos <i>Ad Libitum</i> y HRA, 11:00 h (ZT 3).	26
Figura 9. Expresión zonal de PER1 en los grupos <i>Ad Libitum</i> y HRA, 02:00 h (ZT 18).	27
Figura 10. Expresión total de PER1 en los controles de condición alimenticia.	28
Figura 11. Expresión zonal de PER1 en los controles de condición alimenticia (Ay 22h, RF 2 h).	29
Figura 12. Expresión zonal de PER1 en los controles de condición alimenticia (Ay 46 h, RF 2h).	30