
Doctorado en Ciencias Biomédicas
Instituto de Neurobiología Campus UNAM-Juriquilla



505008154, Baez Ruiz Germa
"Caracterización del manejo de Ca^{2+} intracelular hepático durante la
expresión del Oscilador Sincronizado por Alimento"

TESIS

Que para obtener el grado académico de

Doctor en Ciencias

Presenta

Germán Adrián Báez Ruiz

Tutor

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Comité tutorial:

Dr. Rolando E. Hernández Muñoz

Dr. Luis Vaca Domínguez



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

**DEDICADO A MIS PADRES, Y A TODOS
AQUELLOS A QUIENES TAMBIÉN DEBO MIS LOGROS**

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Mauricio Díaz, por su gran apoyo, tiempo, paciencia, consejos, y todo el respaldo que me dio, y que fue una sólida plataforma para que pudiésemos lograr este logro.

Nuevamente mis reiteradísimos agradecimientos a mis padres (Martha y Germán) y hermanos (Paty y Diego), por todo lo que me brindaron durante este largo camino.

ECARELIC, que me diste una buena parte de combustible para seguir adelante, y no perder el rumbo de mi proyecto.

A todos los integrantes del laboratorio B-11 (Oli, Moy, Dalia, Julieta, Christian, Dalita, Braulio y todos los demás implicados), por su entusiasmo y apoyo.

Ivonne, que me diste un ejemplo de lucha y perseverancia, mil gracias donde quiera que estés, y espero entiendas el porqué, del retraso en darme cuenta del ejemplo que me dejaste.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Rolando Hernández Muñoz y Dr. Luis Vaca D., por su tiempo y comentarios a lo largo de todos los intensos tutorales.

A mi jurado: Dr. Carlos Valverde, Dr. Manuel Miranda, Dr. Raúl Aguilar y Dr. Arturo Hernández, por sus valiosos comentarios y precisiones que enriquecieron este proyecto.

Al personal de apoyo del Posgrado, Leonor y Carmen, por hacer posible que este importante evento en mi vida profesional pueda culminar con éxito.

A la DGEP y CONACYT por su apoyo financiero en la realización de este proyecto de investigación.

INDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	7
ABREVIATURAS.....	8
RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	11
PRESENTACIÓN.....	13
1. INTRODUCCIÓN.....	14
2. ANTECEDENTES.....	18
2.1 Ritmos biológicos.....	18
2.1.1 Los componentes moleculares del reloj circadiano.....	22
2.1.2 El Oscilador Sincronizado por Alimento (OSA).....	26
2.1.3 El hígado y la sincronización por alimento.....	32
2.1.4 El papel del hígado en la fisiología de la alimentación.....	33
2.1.5 El hígado como un elemento del OSA.....	34
2.2 Señalización de Ca ²⁺	35
2.2.1 Proteínas moduladoras de la señalización de Ca ²⁺ intracelular...37	
2.2.1.1 Los Receptores a Inositol trifosfato (IP ₃ R).....	38
2.2.1.2 Los Receptores a Ryanodina (RyR).....	40
2.2.1.3 Bombas de Ca ²⁺ dependientes de ATP (SERCA y PMCA).42	
2.2.2 Señalización de Ca ²⁺ en el hígado.....	44
2.2.3 Señalización de Ca ²⁺ y ritmos biológicos.....	48
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	50
4. HIPÓTESIS.....	51
5. OBJETIVOS.....	52
6. METODOLOGÍA.....	54
7. RESULTADOS.....	65

7.1 Experimento 1. Determinación de la ritmicidad diurna en proteínas reguladoras de la señalización de Ca ²⁺ intracelular en hígado.....	65
7.1.1 Modificación en la ritmicidad de corticosterona circulante y de la proteína reloj PER1 hepática como evidencias de sincronización por alimento.....	65
7.1.2 Cuantificación de la actividad y presencia de proteínas moduladoras de Ca ²⁺ intracelular hepático después de la sincronización por alimento.....	67
7.1.2.1 Ensayo de unión específica de IP ₃ R y RyR.....	69
7.1.2.2 Cuantificación de IP ₃ R1 e IP ₃ R2 por Western blot.....	72
7.1.2.3 Estimación de proteína RyR hepática.....	74
7.1.2.4 Cuantificación de actividad enzimática de SERCA Y PMCA.....	76
7.1.2.5 Cuantificación de SERCA2 por Western blot.....	77
7.1.2.6 Cuantificación de PMCA1 y PMCA4 por Western blot....	79
7.1.2.7 Propiedades de los ritmos diurnos de actividad y presencia de proteína de IP ₃ R, RyR, SERCA y PMCA.....	81
7.1.2.8 Caracterización de la distribución zonal hepática de IP ₃ R, RyR, SERCA y PMCA por inmunohistoquímica.....	84
7.2 Experimento 2. Chronic inhibition of endoplasmic reticulum Ca ²⁺ -release channels and Ca ²⁺ -ATPase lengthen the period of hepatic clock gene <i>Per1</i> ..	87
8. DISCUSIÓN.....	88
9. CONCLUSIONES.....	96
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
11. ANEXOS.....	113
11.1 Feeding as a regulator of biochemical circadian rhythms in the liver (ARTÍCULO 1).....	115
11.2 Chronic inhibition of endoplasmic reticulum calcium-release channels and calcium-ATPase lengthen the period of hepatic clock gene <i>Per1</i> (ARTÍCULO 2).....	116

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Perfil rítmico diurno de corticosterona plasmática y proteína reloj PER1 en ratas sometidas a distintas condiciones de alimentación.....	67
Tabla I. Características de los ritmos diurnos de corticosterona plasmática y PER1 afectados por la sincronización por alimento.....	68
Tabla II. Índices de recuperación de RE y MP.....	69
Figura 2. Ensayos de unión específica de IP ₃ R y RyR hepáticos bajo diferentes condiciones de alimentación.....	72
Figura 3. Cuantificación por Western blot de IP ₃ R1 e IP ₃ R2 hepáticos bajo diferentes condiciones de alimentación.....	74
Figura 4. Estimación de proteína RyR hepática bajo diferentes condiciones de alimentación.....	76
Figura 5. Actividad enzimática de SERCA y PMCA hepáticas bajo diferentes condiciones de alimentación.....	78
Figura 6. Cuantificación por Western blot de SERCA2 hepática bajo diferentes condiciones de alimentación.....	80
Figura 7. Cuantificación por Western blot de PMCA1 y PMCA4 hepáticas bajo diferentes condiciones de alimentación.....	82
Tabla III. Características de los ritmos diurnos de IP ₃ R, RyR, SERCA y PMCA modificados por la sincronización por alimento	84
Figura 8. Mapa de fases de actividad y presencia de proteína de IP ₃ R, RyR, SERCA y PMCA.....	85
Figura 9. Distribución zonal hepática de proteínas reguladoras de la dinámica de Ca ²⁺ intracelular.....	88

ABREVIATURAS

2-APB	2-Aminoetoxidifenil borato
AL	Grupo con libre acceso al alimento (<i>ad libitum</i>)
AY	Grupo ayunado 22 h
BAPTA	1,2-bis (o-aminofenoxi) etano-N,N,N',N'-tetraacetato
BSA	Bovine serum albumine (Albúmina bovina sérica)
CAA	Conducta anticipatoria al alimento
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EGTA	Etilenglicol tetraacetato
ES	Error estándar
<i>g</i>	Gravedades
GCGR	Genes controlador por genes reloj
IP₃R	Receptor a Inositol 1,4,5 trifosfato
M	Concentración molar
mM	Concentración milimolar
μM	Concentración micromolar
MOPS	3-(N-morfolino) propanesulfonato
MP	Membrana plasmática
nM	Concentración nanomolar
NSQ	Núcleo supraquiasmático
OSA	Oscilador sincronizado por alimento
PBS	Solución amortiguadoras de fosfatos
PC	Pericentral
PER1::LUC	Proteína PERIOD1:: LUCIFERASA transgénica
PMCA	Plasmatic membrane Ca ²⁺ ATPase (ATPasa de Ca ²⁺ calcio de membrana plasmática)
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PP	Periportal
RA	Grupo bajo horario de restricción de alimento
ReA	Grupo realimentado por 2 h después de un ayuno de 22 h
RE	Retículo endoplásmico
R_yR	Receptor a ryanodina
SERCA	Sarco-endoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase (ATPasa de Ca ²⁺ de retículo sarco-endoplasmico)
ZT	Zeitgeber time (tiempo de inicio de la sincronización)

RESUMEN

La fisiología del hígado se encuentra bajo coordinación de factores tanto alimentarios como rítmicos que sustentan la expresión de un oscilador sincronizado por alimento (OSA), el cual es un reloj biológico que se sincroniza por eventos de restricción de alimentación circadiana. También ha sido ampliamente documentado que el Ca^{2+} intracelular es un segundo mensajero que actúa como un factor importante en la respuesta metabólica para equilibrar condiciones de alimentación y ayuno. Como la sincronización por alimento en el hígado está sustentada por ciclos de ayuno-alimentación, nosotros hemos estudiado las adaptaciones bioquímicas de proteínas hepáticas encargadas de regular la señalización de Ca^{2+} intracelular bajo distintos regímenes de alimentación: libre acceso al alimento (AL) y horario restringido de alimentación (RA) durante 3 semanas, además de ayuno agudo de 22 h (AY) y realimentación de 2 h posterior a un ayuno agudo de 22 h (ReA) para corroborar si es efecto agudo del ayuno o de la instalación del OSA. La caracterización bioquímica (experimentos de unión específica a radio-ligando y ensayos enzimáticos), cuantificación de proteínas (por Western-Blot) y determinación de distribución zonal hepática (por inmunohistoquímica) de canales intracelulares (receptores a inositol 1,4,5-trifosfato [IP_3R] y a ryanodina [RyR]) así como de bombas de Ca^{2+} (ATPasas de retículo endoplásmico [SERCA] y membrana plasmática [PMCA]) fueron estudiadas en ratas bajo las diferentes condiciones de alimentación antes descritas. Además, nuestros resultados fueron complementados mediante una segunda fase de experimentos realizados en cultivos de explantes hepáticos provenientes de ratas transgénicas (PER1::LUC) a los cuales se les

adicionaron diferentes agentes inhibitorios de la función de RyR, IP₃R y SERCA. Para la primera fase experimental, bajo condiciones de AL, se observaron ritmos diarios en la actividad de IP₃R, RyR, SERCA y PMCA, así como en los niveles de proteínas de las primeras tres, y todos presentaron su acrofase durante el periodo de oscuridad. En cambio, bajo condiciones de RA, la acrofase en la actividad y presencia de IP₃R, SERCA y PMCA se presentó durante la fase de luz, siendo RyR y la cantidad de proteína de PMCA4 las únicas en presentarse durante la fase de oscuridad, es decir, no respondieron a la RA. Además, la amplitud del ritmo de SERCA2 tuvo un aumento de 4-5 veces en comparación al grupo AL. Adicionalmente, la condición de un ayuno agudo afectó la actividad y presencia de RyR (decremento) y de IP₃R y SERCA (incrementó). Mediante inmunohistoquímica se caracterizó una marcada distribución de IP₃R y SERCA en la zona pericentral hepática, mientras que RyR y PMCA lo fueron para la zona periportal. Lo anterior sugiere que la distinta distribución de estas proteínas a lo largo del acino hepático estaría implicada en un posible manejo diferencial de la señalización de Ca²⁺ en el hígado. Por lo tanto, concluimos de estos experimentos que tanto las condiciones alimentarias como también la influencia de la adaptación después de la sincronización por alimento, fueron capaces de modular la ritmicidad en la actividad y presencia de las principales proteínas reguladoras de la homeostasis de Ca²⁺ intracelular. Por otro lado, en los explantes de hígado provenientes tanto de animales AL y RA, fue evidente que el periodo de ritmicidad de la proteína reloj PER1 sufrió un alargamiento significativo cuando los diferentes agentes farmacológicos contra IP₃R, RyR y SERCA fueron utilizados en explantes *in vitro*. Dados todos estos resultados,

concluimos que la señalización de Ca^{2+} hepática es modulada en su funcionamiento y sus componentes por el oscilador circadiano de este tejido bajo condiciones donde el OSA se manifiesta. Pero además se pone de manifiesto en nuestros resultados la importancia que tiene un adecuado manejo del Ca^{2+} intracelular durante el desarrollo del periodo circadiano de los componentes del reloj molecular en el hígado.

ABSTRACT

Liver physiology is under alimentary and rhythmic coordination that underlie the expression of the food-entrainable oscillator (FEO), a biological clock entrained by daily meal time. It is also accepted that intracellular calcium acting as a second messenger is an important factor in the metabolic response to equilibrate the feeding and fasting conditions. As FEO seems to consist in daily fasting-refeeding cycles, we have studied the biochemical adaptations of hepatic calcium-handling proteins in distinct alimentary regimens: free-access to meal as well as under food-restricted schedules, also, an acute fasting of 22 h and a refeeding condition of 2 h after a 22 h fasting. Biochemical characterization (specific ligand-binding experiments and enzymatic assays), protein levels quantification (by Western blot) and zonal distribution determination (by immunohistochemistry) of intracellular calcium-release channels (inositol 1,4,5-trisphosphate receptor [IP₃R] and ryanodine receptor [RyR]) as well as calcium pumps (microsomal [SERCA] and plasmatic membrane calcium-dependent ATPases [PMCA]), were studied under the previously mentioned alimentary conditions. Data indicated that a combined influence of circadian rhythms and nutritional conditions modified the intracellular calcium regulating machinery. Additionally, our results were complemented by a second experimental phase consisting in the use of liver explant cultures from transgenic rats (PER1::LUC1) whose were treated with different pharmacological agents which were used with the proposal to inhibit RyR, IP₃R and SERCA proteins. In the first experimental phase, we observed by immunohistochemistry a marked pericentral distribution of hepatic proteins IP₃R and SERCA,

meanwhile RyR and SERCA were most distributed in the periportal area. These suggest that a distinct distribution of these proteins along hepatic acinus could be related with a differential Ca^{2+} signaling in the liver. Also, under free meal access, diurnal rhythms were observed in the activity of IP_3R , RyR, SERCA and PMCA, as well as in the protein levels of the 3 first ones, but restricted feeding shifted the phase and modified amplitude of IP_3R , RyR and SERCA, and changed the phase of the activity of PMCA. Fasted condition promotes an increase in the RyR and IP_3R activity. In conclusion, feeding conditions during the expression of the FEO modulate the rhythmicity of the levels and activities of the main liver calcium-handling proteins. By other side, liver explants from *ad libitum* and food-restricted feeding, presented an evident period lengthening of the PER1 clock protein when different inhibitory agents against IP_3R , RyR and SERCA were added. All these evidences direct the attention to the importance that these proteins have toward the circadian periodicity regulation of the hepatic molecular clock. Our results suggest that liver Ca^{2+} signaling it is modulated, but also regulates, the hepatic circadian clock.

PRESENTACIÓN

El presente trabajo como objetivos principales estudiar la manera en que las principales proteínas que regulan la señalización de Ca^{2+} intracelular presentan cambios en su actividad y presencia durante la adaptación que sufre el hígado debido a la expresión del Oscilador Sincronizado por Alimento (OSA), y también como el funcionamiento de dichas proteínas es capaz a su vez de afectar al reloj molecular de este tejido. La principal conclusión derivada de este trabajo es que el Ca^{2+} como segundo mensajero es un elemento clave en la comunicación que se da entre las asas de regulación del reloj circadiano y el metabolismo hepático, siendo un proceso importante en la optimización del manejo de nutrientes y que posteriormente desprende señales de hambre-saciedad ocurriendo en tiempos bien definidos a lo largo del día. Este trabajo fue llevado a cabo en el laboratorio de Fisiología Celular, el cual está a cargo del Dr. Mauricio Díaz Muñoz. La segunda fase experimental de mi proyecto fue llevada a cabo en la University of Virginia, E.U., en el laboratorio a cargo del Dr. Michael Menaker, y con la participación experimental y asesoría técnico por parte del Dr. Michael Sellix.

Las preguntas derivadas de este proyecto de investigación durante el doctorado son: ¿De qué manera el manejo de la señalización de calcio intracelular es modificado durante las adaptaciones bioquímicas y fisiológicas hepáticas durante la expresión del oscilador sincronizado por alimento?, y ¿Cómo la señalización de calcio puede a su vez influir sobre el reloj circadiano del hígado durante la expresión del oscilador sincronizado por alimento?

Preguntas tales como ¿qué es el oscilador sincronizado por alimento?, ¿cómo se lleva a cabo la regulación de la señalización de calcio en el hígado? y ¿cómo el Ca^{2+} influye sobre la regulación de la fisiología hepática; y a su vez, son tratadas en la sección de **Antecedentes**. Cabe indicar que la sección correspondiente a la sincronización de la fisiología hepática por alimento, es descrita en el **artículo 1**, el cual fue publicado como capítulo de libro: Báez-Ruiz A, Luna-Moreno AD, Vázquez-Martínez O, and Díaz-Muñoz M. 2009. ***Feeding as a regulator of biochemical circadian rhythms in the liver***, publicado en “Comparative aspects in circadian rhythms” y editado por Dra. María L. Fanjul y Dr. Raúl Aguilar R, Ed. Transworld Research Network, India.

La primera fase experimental de este trabajo es presentada a detalle en este documento, mientras que la segunda fase experimental de este proyecto consistiendo en la pregunta ¿cómo influye la señalización de Ca^{2+} en el reloj molecular circadiano? están contenidas en el **artículo 2**: Báez-Ruiz A and Díaz-Muñoz M. 2011. **Chronic inhibition of endoplasmic reticulum calcium channels and calcium-ATPase lengthens the period of hepatic clock *Per1***. J Circadian Rhythms, 9:7.

1. INTRODUCCIÓN

En los mamíferos, una gran variedad de funciones fisiológicas y conductuales muestran ritmos circadianos (se presentan con una frecuencia cercana a las 24 horas), los cuáles son controlados por una pequeña porción del hipotálamo en el cerebro, conocida como núcleo supraquiasmático (NSQ). Sin embargo, a pesar de que los ciclos diarios de luz-oscuridad son un sincronizador muy importante para los mamíferos, se sabe que mediante un procedimiento de restricción temporal en el acceso de alimento, también es posible hacer notar y sincronizar a otro oscilador distinto al NSQ, llamado oscilador sincronizado por alimento (OSA), el cual es independiente al NSQ durante ésta maniobra experimental (Honma y Honma, 2009; Blum et al, 2011).

No se ha definido aún la ubicación anatómica donde reside el OSA, pero se piensa que éste consiste en una compleja red de elementos que forman asas de retroalimentación entre sistema nervioso y órganos periféricos, implicados con el control hambre-saciedad (Davidson, 2009; Aguilar-Roblero y Díaz-Muñoz, 2010; Blum et al, 2011 y Mistlberger 2011). Una manifestación de salida del OSA, es la llamada conducta anticipatoria al alimento (CAA), un fenómeno que implica cambios conductuales y fisiológicos y que se presenta como un fenómeno que aparece horas previas al acceso al alimento (Mistlberger, 2009).

Los mecanismos de sincronización del OSA no están del todo claros. De manera habitual, los organismos diurnos, nocturnos o ambos, en la naturaleza tienen acceso restringido al alimento, situación que en condiciones de laboratorio no ocurre ya que éste se encuentra disponible todo el tiempo. A pesar de ello, muchos animales aún en estas condiciones artificiales conservan sus horarios de alimentación. Cuando esto ocurre, se piensa que su(s) OSA(s) estaría(n) acoplado(s) al NSQ, pero cuando se restringe el alimento a horas no habituales del día, varios tejidos (entre ellos el hígado) adoptan cambios en la fase de muchos de sus ritmos biológicos en respuesta al cambio de la hora de acceso a la comida. Al respecto, nuestro grupo de trabajo ha logrado obtener datos en los que se exhiben cambios importantes en el tejido hepático referentes al metabolismo energético (incremento en la síntesis de ATP), estado redox (oxidativo), aumento de la actividad mitocondrial, expresión genética (análisis por microarreglos) y manejo de ácidos grasos, todos estos coincidentes a la expresión del OSA (Escobar et al, 1998; Díaz-Muñoz et al, 2000; Báez-Ruiz et al, 2005¹; Báez-Ruiz et al, 2005²; Luna-Moreno et al, 2007; Díaz-Muñoz et al, 2010 y Rivera-Zavala et al, 2011). Dados los antecedentes anteriores, es notorio que la fisiología y metabolismo hepáticos muestran cambios debidos a la adaptación que presentan durante la sincronización por alimento. A pesar de la información colectada, no se conocen aún los mecanismos que permiten la coordinación entre el metabolismo y el reloj circadiano hepático, cuando éste último es sincronizado por una señal regular periódica como lo es el acceso al alimento durante la restricción.

El Ca^{2+} es un catión que funciona como segundo mensajero, esencial en los mecanismos de control de procesos metabólicos y otras varias funciones celulares (Berridge, 1993; Clapham, 1995 y Carafoli, 2004). Aunque se ha demostrado que este segundo mensajero está involucrado en la regulación de los sistemas circadianos de diversos organismos (Edmunds et al, 1992) y que además, la permeabilidad del mismo Ca^{2+} es modulada por el reloj circadiano, aún no se sabe de qué manera éste mensajero y los elementos que lo regulan, pudieran participar en mecanismos subyacentes de regulación de los ritmos circadianos del hígado. Al respecto, el manejo de Ca^{2+} intracelular en el hígado pudiera presentar modificaciones en su dinámica durante la expresión del OSA, dado que las condiciones metabólicas (tanto anabólicas como catabólicas), son moduladas por la señalización de Ca^{2+} (Pralong et al, 1994 y Gaspers y Thomas, 2008).

Para comprobar ésta hipótesis, se estudiarán la presencia y la actividad de los receptores/canal a Ryanodina e IP_3 , así como de las ATPasas de Ca^{2+} (tanto de retículo endoplásmico como de membrana plasmática), mediante diferentes técnicas bioquímicas e inmunohistoquímicas durante la expresión del OSA. Además se estudiará de qué manera la manipulación farmacológica de la dinámica del calcio intracelular afecta la regulación de la ritmicidad de la proteína reloj PERIOD1, en un modelo de cultivo *ex vivo* de tejido hepático, de ratas previamente sincronizados a dos diferentes horarios de alimentación.

2. ANTECEDENTES

2.1 Ritmos biológicos

Un ritmo se define como un fenómeno que ocurre de manera cíclica, es decir, que se lleva a cabo con periodicidad (tiempo en que tarda en repetirse) y que se puede ejemplificar en casi todos los procesos fisiológicos y conductuales. Incluso se piensa que sería inusual encontrar algún proceso biológico que no presentara ritmicidad. Los ritmos biológicos son fluctuaciones periódicas que se presentan tanto en eventos fisiológicos como conductuales en los organismos. Son procesos bien conservados a lo largo de la escala filogenética (desde bacterias hasta mamíferos), y cuyo origen se sugiere responde a la selección de mecanismos adaptativos que permiten a los organismos predecir e incluso anticipar cambios geofísicos en su medio (por ejemplo, el ciclo de rotación de la Tierra), para entonces beneficiarse de éstos (Sharma, 2003; Tauber et al, 2004; Matsuo e Ichira, 2010; McClung et al, 2010 y Johnson et al, 2011). Además los ritmos pueden dividirse en tres tipos de acuerdo a su frecuencia (número de ciclos por día): ultradianos (del latín *ultra* = mas allá de y *dien* = día) con una frecuencia inferior a 20 horas (latido cardiaco, secreción de algunas hormonas); los ritmos circadianos (del latín *circa* = alrededor de y *dien* = día), ocurren con una frecuencia alrededor de 24 horas y son los más ubicuos en la naturaleza (ciclo sueño-vigilia); y los infradianos (del latín *infra* = inferior o debajo y *dien* = día), cuya frecuencia es mayor a 28 horas (ciclo menstrual) (Koukkari y Sothorn, 2006). Los ritmos biológicos no son un seguimiento pasivo ante los diferentes cambios geofísicos que se van dando en nuestro entorno de manera cíclica (ciclo de

luz-oscuridad, ciclos lunares que duran alrededor de 28 días, el movimiento de translación con sus respectivos cambios estacionales, etc.), sino más bien representan una adaptación afinada a través de la evolución por contar con un mecanismo que nos permita adaptarnos y predecir los cambios que van sucediendo durante los distintos periodos antes mencionados.

El concepto de tiempo y la curiosidad hacia la periodicidad de los fenómenos naturales, probablemente surgió desde la antigüedad. Aristóteles y más tarde Galeno, describieron la periodicidad del ciclo sueño-vigilia, centrando su origen en el corazón el primero, y en el cerebro el segundo. Carl von Linné (naturalista sueco del siglo XVIII, inventor de la nomenclatura binomial taxonómica) llegó a decir que estando en un jardín, podía saber la hora del día simplemente mirando las flores, ya que hay algunas que se abren al amanecer, otras al mediodía, otras que cierran sus pétalos al anochecer. En 1760 el astrónomo francés Jean Jacques D'ortous De Mairan, reportó de manera sistemática la primera evidencia experimental de la naturaleza endógena de los relojes. Observó que plantas de mimosa (*Mimosa pudica*) presentaban ciclos naturales de luz-oscuridad en la apertura y cierre de sus hojas, y que cuando éstas eran aisladas de cualquier señal de luz, continuaban mostrando el ciclo de abrir y cerrar las hojas. En 1910, Augusto Forel reportó que las abejas se presentaban a la misma hora en la que solía desayunar en su jardín, y que si cambiaba la hora del desayuno, las abejas mantenían el anterior, a lo que le llamo el Zetgenachdis (memoria temporal). Lo anterior fue descrito como un mecanismo de anticipación al alimento relacionada a una memoria temporal. En 1922, Carl Richter reportó que en

ratas sometidas a una sola comida al día, manifestaban un aumento en su actividad locomotora antes de tener presente su alimento (Moran y Tamashiro, 2007). Todos estos ejemplos son pruebas de la existencia de un sistema de medición de tiempo endógeno. Dicho sistema es conocido como reloj biológico y existe virtualmente en casi todas las especies.

La cronobiología (del griego *crono* = tiempo y *bios*= vida y *logos* = estudio) es la ciencia encargada del estudio de los relojes biológicos, su funcionamiento y sus implicaciones en los sistemas de organización de la vida. Esta disciplina es relativamente joven, ya que fue hasta la década de los 60 cuando maduró como ciencia moderna, gracias a los conocimientos básicos que nos legaron personajes como Franz Halberg, Colin Pittendrigh y Jürgen Aschoff (Refinetti, 2005).

Un gran hallazgo fue el hecho de haber descubierto el sitio anatómico donde reside el reloj principal en los mamíferos. Dicho descubrimiento fue realizado por dos grupos de trabajo, el de Robert Y. Moore y el de Frederick Stephan a principios de los 70's (siglo pasado), dando a conocer que una compacta estructura hipotalámica, ubicada en la región superior del quiasma óptico en el hipotálamo, y por lo tanto llamada núcleo supraquiasmático (NSQ), era la responsable de regular los ritmos circadianos, ya que si ésta era lesionada bilateralmente, los animales mostraban patrones arrítmicos en su actividad diaria, por lo que se le adjudicó el papel de marcapasos circadiano (Moore y Eichler, 1972 y Stephan y Zucker, 1972). También en el mismo año, se describió que la luz funciona como sincronizador (ajustador del tiempo

biológico en referencia al ambiental) del NSQ, entrado por la retina, recorriendo el tracto retinohipotalámico en forma de mensaje químico y llegando hasta él (Moore y Lenn, 1972). Después se describieron fenómenos rítmicos en otros tejidos, demostrando que también hay osciladores circadianos fuera del sistema nervioso central, y que más tarde fueron denominados “osciladores periféricos” (Yamazaki et al, 2000; Herzog y Tosini, 2001; Glossop y Hardin, 2002 y Tsuchiya y Nishida, 2003), ya que éstos no muestran una persistencia en su ritmicidad como lo hace el NSQ en condiciones *in vitro* (tanto rebanadas del tejido como en neuronas individuales) y al cual se le denomina como reloj maestro (Inouye y Kawamura, 1979; Welsh et al, 1995 y Mohawk y Takahashi, 2011).

Una característica importante de los ritmos circadianos, es persisten ante condiciones ambientales constantes (ejemplo, oscuridad continua). Por lo tanto, los procesos rítmicos son regulados por mecanismos endógenos que tienen la capacidad de generar y mantener un orden temporal entre los diferentes eventos fisiológicos y conductuales del organismo (Pittendrigh, 1993). Al sistema que dicta el orden temporal a estos procesos cíclicos se le denomina reloj biológico. Debido a su función adaptativa, estos sistemas de organización temporal reciben ajustes continuos de diversas señales del medio ambiente. Dichas señales son conocidas como sincronizadores y ajustan diariamente la hora (ponen en fase) en que se iniciarán los ritmos, y por lo tanto, los ritmos del organismo se sincronizan a ellos, e incluso puede anticiparlos. Los sincronizadores se pueden clasificar básicamente en dos

tipos fóticos (luz) y no fóticos (alimento, ruido, temperatura, etc.) (Aguilar-Roblero, 1993).

En las última década, se han descrito de manera detallada los mecanismos que generan las oscilaciones circadianas a nivel celular (Lowrey y Takahashi, 2011). Dichos procesos se llevan a cabo en virtualmente todas las células de nuestro cuerpo y son las responsables de que sus funciones se lleven a cabo de manera ordenada en el tiempo, es decir, que oscilen en periodos determinados. Sin embargo aún no se comprende del todo porqué la supremacía de marcapasos existe en el NSQ.

2.1.1 Componentes moleculares del reloj circadiano

El mecanismo celular de cómo los relojes circadianos logran mantener su oscilación de manera endógena, se ha aclarado en parte, con el descubrimiento de los genes/proteínas reloj. Sin lugar a dudas, uno de los descubrimientos que le dio otra cara al estudio de los relojes biológicos, es el esclarecimiento del sistema molecular que se encarga de llevar a cabo la función de cronómetro circadiano en cada célula (Silver et al, 2010). Dicho sistema está formado por una compleja asa de retroalimentación positiva y negativa, constituida por un limitado número de genes que codifican para factores de transcripción y enzimas, los cuales tienen características únicas en su función y expresión (Harmer et al, 2001).

El estudio de organismos mutantes para los diferentes genes denominados “reloj”, permitió conocer de que manera cada uno de estos

elementos moleculares participan en el sistema circadiano. Por ejemplo, mutaciones en estos genes producen diversos fenotipos, que van desde organismos cuyos periodos del ritmo de actividad locomotora es acortado alargado o incluso arrítmicos (revisado en Alvarez, 2004). El primer gen reloj fue reportado por los investigadores Konopka y Benzer en 1971 en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) y fue bautizado con el nombre de *periodo* (*Per*), ya que la mutación inducida por un agente químico mutagénico en este elemento genético provocaba cambios en la longitud o incluso arritmia en el periodo de actividad de este invertebrados (Konopka y Benzer, 1971). Más tarde, Menaker y colaboradores, reportaron un hámster mutante que presentaba un periodo de actividad mucho menor a 24 horas (alrededor de 20 horas), y fue denominado como “*tau*” (Ralph y Menaker, 1988). Años más tarde, se comprendió que el mutante *tau* presenta una alteración funcional en el gen que codifica para la cinasa de caseína I ϵ (CKI ϵ), la cual fosforila a la proteína PER para promover su degradación. Al paso del tiempo, fueron estudiados diferentes modelos experimentales (cianobacterias, hongos, invertebrados y diversos mamíferos, principalmente roedores). El número de genes reloj reportados en mamíferos y que se expresan en el NSQ fue aumentando, y se ha dilucidado parte del complejo sistema molecular de marcapasos en la intimidad del reloj circadiano (Okamura, 2004). A finales de los 90’s, también se reportaron genes reloj que oscilaban circadianamente en distintos órganos periféricos (hígado, páncreas, músculo, corazón, etc.); es decir, hay otros tejidos fuera del NSQ capaces de tener la maquinaria necesaria para medir el tiempo, pero que se sabe, éstos son usualmente supeditados a la jerarquía del NSQ (Sakamoto e Ishida, 2000;

Guido y de la Iglesia, 2002). Sin embargo, estos tejidos periféricos también pueden ajustar la fase de sus genes reloj a otros factores aparte de los comandados por el NSQ, como es el caso del alimento (Stokkan et al, 2001).

Estos factores de transcripción y enzimas oscilan de manera circadiana tanto en su expresión, traducción y actividad fuera y dentro del núcleo, y que forman asas de retroalimentación positivas y negativas entre sí. Algunas de sus características principales son: 1) un dominio de unión a motivos de ADN tipo bHLH (Basic Helix-Loop-Helix), las cuales son regiones activadoras que se encuentran en secuencias promotoras relacionadas a los genes reloj, conocidas como caja-E; 2) los productos de estos genes forman heterodímeros por interacción de dominios tipo PAS (PER-ARNT-SIM), y 3) son moduladores de la expresión de otros genes, conocidos como genes controlados por genes reloj (GCGR) (Reppert y Weaver, 2001 y Looby y Loudon, 2005). Como se mencionó previamente, si un gen reloj es afectado, los GCGR pierden ritmicidad e incluso se afecta profundamente su expresión, mientras que alteraciones en los GCGR no perturba la expresión de genes reloj (Paranjpe y Sharma, 2005).

Se sabe que en mamíferos, los genes *Bmal* (Brain and muscle-ARNT like protein 1 y 2), así como *Clock* (Circadian locomotor cycle “kaput”) y *Npas2* (Neuronal PAS domain-containing protein 2) forman un asa de retroalimentación positiva. Al ser traducidos en sus respectivas proteínas, forman posteriormente los heterodímeros (BMAL1-2:CLOCK y BMAL1-2:NPAS2) y entran al núcleo, reconociendo las regiones promotoras conocidas como cajas E. En este momento inducen la expresión de diversos

genes reloj como son *Per*, (1, 2 y 3), *Cry* (Cryptochrome 1 y 2), *Ror* (Retinoid orphan receptor) y *Rev-erba* (Reverse-erb alpha), así como los llamados genes controlados por genes reloj (Ko y Takahashi, 2006). Por el contrario, el papel de los genes reloj *Per* y *Cry*, es el de inhibir su propia transcripción. Aunque dicho mecanismo no es muy claro, se sabe que una vez que PER y CRY se han traducido, éstas forman heterodímeros que viajan hacia el núcleo, no sin antes sufrir una serie de modificaciones post-traduccionales (Lee et al, 2001; Gallego y Virshup, 2007 y Mehra et al, 2009). PER y CRY actúan como represores del heterodímero CLOCK-BMAL1 y NPAS2- BMAL1, e inhiben de esta forma su propia transcripción. Debido a modificaciones post-traduccionales sobre el heterodímero PER-CRY, (como el caso de la fosforilación efectuada por las cinasas de caseína CKI δ y CKI ϵ), se determina la vida media de dichas proteínas antes de ser ubiquitinadas para su correspondiente degradación, permitiendo así que nuevamente se reinicie la transcripción mediada por CLOCK-BMAL1 y NPAS2-BMAL1 (Sato et al, 2006). A su vez, el reloj molecular circadiano comunica la hora a un gran número de rutas de salida, ya sea de manera directa o indirecta, mediante la regulación de la expresión de genes involucrados en diversos procesos celulares, ya sea metabolismo, elementos de señalización intra e intercelular, ciclo celular, entre muchas otras más (Yagita, 2000 y Looby y Loudon, 2005).

De esta forma, los genes reloj actúan con otros genes y actúan como “engranes” moleculares de los relojes biológicos y modulan la velocidad en que se presentan los ritmos (que pueden ser vistos como las “manecillas” del reloj). A este respecto, el conocimiento de la existencia de genes reloj en

otros sitios anatómicos fuera del núcleo supraquiasmático, permitieron concebir a los organismos multicelulares como un complejo de multi-osciladores capaces de medir el tiempo y de coordinarse a través de señales humorales y neurales (Antle y Silver, 2009 y Escobar et al, 2008).

2.1.2 El Oscilador Sincronizado por Alimento (OSA)

En el caso de los mamíferos, los ritmos circadianos conductuales y fisiológicos, son controlados por el NSQ, nombrado así por su ubicación anatómica (residen en la parte ventral del hipotálamo, por encima del quiasma óptico). El NSQ es un reloj que se sincroniza principalmente por señales fóticas diarias a través de fotorreceptores de la retina que transmiten la señal vía el tracto retinohipotalámico (Tsuchiya y Nishida, 2003). Además se reconoce la existencia de un reloj circadiano independiente del NSQ cuya característica principal es que éste se manifiesta ante la restricción alimentaria periódica. La caracterización de este oscilador, conocido como Oscilador Sincronizado por Alimento (OSA), incluye desde pruebas conductuales (manifestación de anticipación al alimento debida a horarios restringidos de alimentación), hasta la determinación de la participación de diversos núcleos hipotalámicos y tejidos periféricos involucrados con el manejo y distribución de nutrientes (Mistleberger 1994; Ángeles-Castellanos et al, 2008; Verwey y Amir, 2009 y Mistleberger 2011). Entonces, la existencia de un segundo reloj que en vez de sincronizarse a la luz responde al alimento, debe tener las propiedades que corresponden a un verdadero reloj. En cuanto a si el OSA cumple con los requisitos necesarios para ser considerado como reloj, las evidencias hablan por sí solas: es susceptible de sincronizarse

a un ritmo ambiental que posean un valor de periodo de 24 horas, en este caso al alimento; es un reloj endógeno, persiste aún sin la presencia del sincronizador, como por ejemplo el ayuno, con un periodo cercano a las 24 horas; la ritmicidad puede dejar de expresarse bajo ciertas condiciones ambientales como la alimentación *ad libitum*, es decir, se detiene y se acopla al mando del NSQ; es independiente del NSQ y además utiliza la información temporal para controlar aspectos bioquímicos, fisiológicos y conductuales (Mistleberger 2004; Aguilar-Roblero y Díaz-Muñoz, 2010 y Blum et al, 2011).

Los animales en condiciones de laboratorio, normalmente tienen un libre acceso al alimento a lo largo del día, y por lo tanto no buscan su alimento, a diferencia de los animales que se encuentran en su hábitat natural, donde el alimento no siempre está disponible, espacial o temporalmente, por lo que éstos tienen que poseer estrategias que les permitan tener mayor eficiencia en la adquisición de su sustento (Schibler et al, 2003). Por ejemplo, los depredadores optimizan sus esfuerzos para atrapar a su presa y recuperar la energía perdida durante el proceso, evento que ocurre de manera aleatoria y esporádica. En cambio, los consumidores primarios, como los animales forrajeros, necesitan estar comiendo grandes cantidades de plantas, porque la ganancia calórica no es mucha. Resumiendo los dos casos anteriores, podríamos decir que en general los animales necesitan encontrar la mejor oportunidad para comer, y si esta se da sólo en algún lapso del día, entonces debe haber un mecanismo que les permita saber a qué hora es “conveniente” alimentarse. Cuando el alimento funciona como una señal de tiempo (es decir, su disponibilidad se restringe a una

misma hora diariamente), entonces los organismos logran responder ante dicho estímulo con la manifestación de un cambio conductual y fisiológico reconocido como conducta anticipatoria al alimento (CAA), la cual se ha reconocido en gran número de vertebrados (peces, aves y mamíferos), así como también en abejas (Mistlberger, 1994). Por lo tanto, una manifestación de salida del OSA, es la (CAA), un fenómeno que implica cambios conductuales (aumento de actividad locomotora, búsqueda de alimento y mayor ingesta de agua) y fisiológicos (aumento de temperatura y corticosterona circulante y modificaciones en el estado energético hepático) y que se presenta como un fenómeno que aparece horas previas al acceso al alimento (Lima et al, 1981; Díaz-Muñoz et al, 2000 y Mistlberger, 2009). Desde finales del siglo XIX, Curt Richter, aportó valiosas estrategias para la comprensión de diferentes fenómenos fisiológicos y conductuales, incluidas la respuesta anticipatoria al alimento (Woods y Ramsay, 2007). Fue uno de los primeros fisiólogos en estudiar los mecanismos detrás de dicha anticipación al alimento, así como también el intentar explicarlo en términos cronobiológicos (Moran y Tamashiro, 2007). Sin embargo, el camino para comprender la naturaleza de éste fenómeno de salida del reloj no ha terminado, y a pesar de los múltiples hallazgos sobre su fisiología, aún quedan muchas preguntas por responder (Mistlberger, 2011).

Para lograr evaluar la expresión de la CAA en animales de laboratorio, se emplea una maniobra experimental que consiste en restringir a un tiempo limitado el acceso a la comida diariamente (de 1 a 4 horas) y con una diferencia de tiempo entre cada horario de alimentación que no exceda los

límites circadianos. La CAA va acompañada de un incremento en la actividad locomotora, aumento de temperatura, niveles altos de corticosterona y movilización de diversos metabolitos, previo a la hora de alimentación (Mistleberger, 1994 y Escobar *et al.*, 1998).

La CAA también se ha intentado interpretar como un proceso de aprendizaje (como si se tratara de una señal condicionada a la hora de llegada del alimento). Sin embargo, hay evidencias que señalan que la CAA está asociada a la expresión de un reloj biológico: 1) La CAA no se presenta si la disponibilidad de alimento está fuera de los límites circadianos (>30 h o <20 h); 2) persiste aún en condiciones constantes (luz u oscuridad) y en ausencia de señales medioambientales no fóticas, distintas al alimento (cámaras sonoamortiguadas, ablación del sistema olfativo, etc.); 3) desaparece enseguida de dar alimento *ad libitum* y persiste en condiciones de ayuno durante varios días, 4) es susceptible a retrasos o avances en su fase (tiempo en que aparece) debido a cambios en el horario de presentación del sincronizador (alimento); y 5) es susceptible a mutaciones en genes reloj (*Cry*, *Clock* y *NPAS2*) (Mistleberger 1994, Dudley *et al.*, 2003 y Davidson *et al.*, 2005 y Challet *et al.*, 2009).

Entonces, el OSA es un reloj capaz de provocar cambios en la fase de numerosos ritmos circadianos en individuos que son sometidos a un horario restringido de alimentación (Davidson *et al.*, 2005). Dentro de los parámetros estudiados durante la expresión del OSA, se han reportado cambios de fase en diferentes hormonas como la insulina, glucagon, corticosterona (Escobar *et al.*, 1998), leptina (Martínez-Merlos *et al.*, 2004 y Hara *et al.*, 2001),

metabolitos como triacilglicéridos, cuerpos cetónicos y ácidos grasos (Díaz-Muñoz et al, 2000; Díaz-Muñoz et al, 2010 y Rivera-Zavala et al, 2011), modificaciones en distintos parámetros fisiológicos hepáticos como son: aumento en la síntesis de ATP, manejo de equivalentes reductores (NADH, NADPH) y consumo de oxígeno mitocondrial (Báez-Ruiz et al, 2005¹), tendencia a mantener un estado reducido e hipotiroideo durante la CAA y oxidado e hipertiroideo al final de la alimentación (Aceves et al, 2003), cambios en la expresión de genes implicados en gran cantidad de procesos celulares, incluyendo genes reloj (Polidarová et al, 2011) y otros diversos genes regulados por genes reloj (Hara et al, 2001 y Báez-Ruiz et al, 2005²).

Una pregunta que deriva de lo anterior es si el NSQ participa en la expresión del OSA. La lesión bilateral del NSQ provoca arritmia en osciladores periféricos, De manera interesante se sabe que en animales con lesión del NSQ mantuvieron la CAA, por lo que entonces se postuló la existencia de otro reloj, independiente del NSQ, y que es susceptible de ser sincronizado por los horarios de alimentación restringida (Clarke y Coleman, 1984; Stephan, 1989; Hiroshige et al, 1991 y Gooley et al, 2006).

A diferencia del NSQ, no se ha encontrado un sitio anatómico definido para el OSA. La lesión de numerosas estructuras cerebrales y órganos periféricos (todas ellas vinculados con el control del hambre-saciedad y la ingesta y metabolismo del alimento), no han logrado abatir la expresión de este oscilador. Se han lesionado tantas estructuras que la lista es cada vez más cercana al número de tejidos periféricos y regiones del sistema nervioso

central involucradas con el procesamiento del alimento: núcleos hipotalámicos (ventromedial, paraventricular y lateral) y otras regiones del sistema nervioso central (núcleo accumbens, área postrema, núcleo de tracto solitario, núcleo parabraquial, área infralímbica y bulbo olfatorio) y autónomo (nervio vago), glándulas (hipófisis y páncreas) e incluso se ha buscado mediante la afectación funcional del hígado utilizando CCl_4 , una poderosa hepatotoxina que induce fibrosis (Davidson y Stephan, 1999; Davidson¹⁻² et al, 2001; Escobar et al, 2002; Davidson et al, 2002; Nakahara et al, 2004; Ohishi et al, 2004; Mendoza et al, 2005 y Recabarren et al, 2005). Ninguna de estas maniobras ha podido abolir la CAA. En algunos casos, las lesiones provocaron disminución en la CAA (la del nervio vago y núcleo parabraquial), sin embargo la atenuación de la CAA no es garantía de que el OSA se haya afectado. Sólo la lesión del núcleo dorsomedial hipotalámico al parecer ha logrado abatir la aparición de la CAA (Gooley et al, 2006). Sin embargo, la sincronización de genes reloj (*Per2*) en osciladores periféricos como el hígado, no se ve afectada por lesión de este núcleo, lo cual sugiere que estructuras involucradas con la CAA no necesariamente son el lugar donde reside el OSA, o que de cierta manera dichos parámetros son disociables bajo ciertas condiciones (Tahara et al, 2010).

Entonces, se ha propuesto que el OSA consiste en un asa de retroalimentación sostenida entre núcleos hipotalámicos de control de alimentación y órganos periféricos encargados de la ingesta y procesamiento de nutrientes, con la capacidad de sincronizarse en conjunto por el alimento (Aguilar-Roblero y Díaz-Muñoz, 2010 y Blum et al, 2011). Lo anterior describe

que el OSA es una propiedad emergente del organismo, integrada de manera distinta e independiente al NSQ y que le permite integrar una compleja red de elementos y sistemas que se preocupan por el horario de alimentación. El OSA de manera normal, se encuentra virtualmente bajo la regulación del NSQ, pero que cuando las condiciones ameritan optimizar el horario de alimentación, entonces se desacoplan y ello no impida que el organismo se alimente de acuerdo a las condiciones temporales del medio. Bajo estas circunstancias conceptuales, el OSA estaría representándose no como una estructura definida, sino como un nuevo nivel de complejidad e integración entre diferentes tejidos y/o células que representarían cada uno osciladores sincronizados por alimento, o dicho de otra forma, una propiedad emergente constituido por diferentes tejidos cuya función adaptativa estaría en función de optimizar la ingesta de alimento en función del tiempo (Rae y Balsam, 2010).

2.1.3 Hígado y sincronización por alimento

Es bien sabido que el hígado es muy importante en los eventos de integración de un gran número de funciones metabólicas, además de ser el encargado de procesar el alimento que ingiere el organismo. Russek (1963) planteó que el hígado es un sitio donde cambios en su metabolismo y estado energético son detectados por sistema nervioso central, por medio de comunicación nerviosa y humoral (Friedman et al, 2005). También hay evidencias que señalan que cuando el hígado presenta alguna condición patológica (cirrosis por ejemplo), esto genera problemas en los ritmos de

sueño-vigilia / actividad -reposo (Turek y Allada, 2002).

Se han reportado una gran cantidad de procesos que expresan una ritmicidad circadiana y en el hígado hay muchos de ellos. El factor tiempo es vital para mantener la regulación de combustibles metabólicos (glucógeno), síntesis de proteínas, almacén de vitaminas y hierro, ingesta de nutrientes, regulación de aminoácidos, metabolismo de toxinas y fármacos (Davidson et al, 2004). Otro elemento que hace interesante al hígado, es que éste expresa también a los genes reloj de una manera circadiana, aunque la fase de expresión de estos engranes moleculares es diferente a la del NSQ (Stokkan et al, 2001 y Davidson et al, 2003).

2.1.4 Papel del hígado en la fisiología de la alimentación

De manera detalla sobre la manera en que el hígado participa en la regulación de la asimilación de nutrientes, cómo se modula el catabolismo y anabolismo durante la ingesta de alimento o en ausencia de éste, y de qué manera se relacionan el tiempo de alimentación con los ritmos diarios presentes en la fisiología del hígado, se presenta en el **artículo 1** que se agregó como anexo de este trabajo: Báez-Ruiz A, Luna-Moreno AD, Vázquez-Martínez O, and Díaz-Muñoz M. 2009. ***Feeding as a regulator of biochemical circadian rhythms in the liver***, in “Comparative aspects in circadian rhythms” Ed. Dra. María L. Fanjul and Dr. Raúl Aguilar R, Ed. Transworld Research Network, India.

2.1.5 El hígado como un elemento del OSA

El descubrimiento de que los genes reloj también se encontraron en otras estructuras del sistema nervioso central, e incluso en tejidos periféricos (hígado, páncreas, riñón, corazón, etc.), dio un mayor impulso a tomar en consideración la existencia de relojes circadianos fuera del NSQ. El hígado es el órgano cuya principal característica es la manera en que organiza e integra decenas de procesos metabólicos, que van desde la asimilación y distribución de nutrientes, desintoxicación (metabolismo de compuestos xenobióticos), respuestas inmunes innatas (como la llamada respuesta de fase aguda), además de contribuir con un equilibrio metabólico y fisiológico en el organismo (Püschel, 2004), lo hacen sin duda un modelo de estudio sumamente interesante como parte del OSA.

Por ejemplo, se han reportado datos interesantes en cuanto a cambios presentados en la fisiología del hígado durante la expresión del OSA: tales como modificaciones en el metabolismo de glucógeno y ácidos grasos (Escobar et al, 1998), estado redox y carga energética (Díaz-Muñoz et al, 2000), manifestación de estados hiper e hipotiroideo transitorios (Aceves et al, 2003), análisis histológicos y esterológicos (Díaz-Muñoz et al, 2010), señalización de receptores nucleares sensibles a ácidos grasos (Rivera-Zavala et al, 2011) así como también en su expresión genética (²Báez-Ruiz et al, 2005) y la presencia de una condición homeorrética mitocondrial (¹Báez-Ruiz et al, 2005). Stokkan y colaboradores (2001) reportó que en respuesta a la condición de restricción de alimento, el hígado responde ante dicho estímulo

sincronizando la expresión de su gen reloj *Per1* casi inmediatamente (al segundo día ya hay efectos en su fase de expresión). Dichas características sugieren que el hígado tiene un enorme potencial como elemento del OSA, y que posiblemente tenga una participación muy importante en su expresión. A partir de estos antecedentes en los cuales se ve una coincidencia entre la adaptación del metabolismo hepático con la expresión del OSA, es que nuestro grupo de trabajo comprender así la fisiología del hígado durante la manifestación del OSA ante el estímulo del alimento como sincronizador.

A pesar de que se conocen algunos posibles mecanismos mediante los cuales el hígado se sincroniza (Rutter et al, 2002 y Li y Lin, 2009), y que su metabolismo a su vez, regula su reloj circadiano (Eckel-Mahan y Sassone-Corsi, 2009), aún hay elementos de dichos mecanismos que no han sido caracterizados. Por ejemplo, aunque se conoce la manera en que la señalización por Ca^{2+} se ve involucrada en los procesos circadianos de otros sistemas, incluido el NSQ (Ikeda et al, 2003), no se tienen evidencias sobre el papel que este segundo mensajero tiene sobre la modulación de los ritmos circadianos en el hígado, y cómo el reloj circadiano a su vez es capaz de regular el manejo de este mensajero.

2.2 Señalización de Ca^{2+}

Es bien sabido que el Ca^{2+} como mensajero celular tiene un rol fundamental en la regulación de una amplia gama de funciones en prácticamente todas nuestras células. Estos procesos en los que está

involucrado van desde la contracción muscular, el latido cardiaco, la comunicación sináptica, la fertilización, metabolismo energético, control de la expresión génica, muerte celular programada, hasta eventos como son la consolidación de la memoria (Carafoli, 2002; Berridge, 2003). Como es de esperarse, una versatilidad cómo esta amerita procesos finos en su regulación. Por esto mismo, diferentes tipos celulares cuentan con una batería de elementos que les permiten combinar una serie de mecanismos los cuales de manera precisa adecuan las respuestas de Ca^{2+} según sean las necesidades de su fisiología (Berridge, 2003).

A propósito de lo anterior, la manera en que este catión actúa, es a través de cambios en su concentración, ya sea en el interior celular u otros sitios (organelos celulares) donde regula la actividad de proteínas sensibles a éste, Por ejemplo, se sabe que de manera basal la concentración de Ca^{2+} citosólico está en el orden de 100 nM aproximadamente, mientras que en el espacio intracelular es de 1mM, y de 2 a 3mM en el interior de organelos intracelulares, cómo el caso del retículo endoplásmico (Pozzan, 1994). Después de algún estímulo que desencadene movilización de Ca^{2+} hacia el espacio citosólico, se causan incrementos de varios órdenes de magnitud de diferencia (~ 1 mM) con respecto a la concentración basal. Esto se logra de varias formas, siendo principalmente mediante dos mecanismos ampliamente estudiados: 1) la apertura de canales de Ca^{2+} operados por voltaje en la membrana plasmática, los cuales permiten una entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular al intracelular, y 2) a través de la movilización de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico hacia el citosol regulado por los

receptores a IP_3 así como los de ryanodina (Berridge, 1993 y Berridge et al, 2003). Los incrementos en la permeabilidad al Ca^{2+} son inducidos por diversas hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento. Además se sabe que la célula es capaz de tener sus propios depósitos de Ca^{2+} , por lo que los incrementos de su concentración pueden darse por regulación de depósitos intracelulares. Dichos depósitos son principalmente el retículo endoplasmático (RE) y las mitocondrias, los cuales cuentan con proteínas que ayudan tanto a su liberación como a su regreso a estas pozas intracelulares (Evenäs *et al.*, 1998).

Una vez que incrementa la concentración intracelular de calcio, la célula cuenta con mecanismos que le permiten regresar a la concentración basales y esperar hasta el siguiente estímulo para volver a activar los mecanismos que introducen el Ca^{2+} al interior de la misma (Berridge, 2003). Dichos mecanismos requieren el trabajo de bombas (ATPasas) que pueden mandar el Ca^{2+} hacia el espacio extracelular (ATPasas de membrana plasmática o PMCA) y las que lo hacen pero hacia el interior del retículo endoplásmico (ATPasas denominadas como SERCA). Por lo tanto, se cuenta con una gran gama de proteínas que se encargan de modular la amplitud del flujo de Ca^{2+} de una manera espacio-temporalmente organizada.

2.2.1 Proteínas moduladoras de la señalización de Ca^{2+} intracelular

Debido a que el Ca^{2+} es un mensajero que no se puede metabolizar como otros (ejemplo: cAMP, NO, ATP, etc.), la manera en que las células lo

regulan es a través de flujos mediante proteínas que lo transportan de una manera organizada. Por lo tanto, dicha homeostásis en la señalización de Ca^{2+} intracelular solo es posible por medio de la actividad de receptores/canal, ATPasas dependientes de Ca^{2+} , intercambiadores iónicos membranales, proteínas quelantes de este catión, entre otras más (Berridge 1993). La formación y velocidad de ondas de Ca^{2+} intracelular no solo depende de la expresión y distribución de los RyR e IP_3R , sino también de las isoformas de estos receptores, que como se verá más adelante, depende de la cinética distintiva de cada uno (Carafoli, 1999).

2.2.1.1 Los Receptores a Inositol trifosfato (IP_3R)

Los receptores a IP_3 son proteínas constituidas de aproximadamente 3000 aminoácidos, que actúan como tetrámeros y permiten la salida de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico hacia el citosol (Pozzan et al, 1994). Sin embargo, algunos autores manejan que también se encuentra en ciertos dominios enriquecidos con actina en la membrana plasmática (Guillemette et al, 1988 y Rossier et al, 1991). Su ligando endógeno es un derivado de fosfolípidos de membrana plasmática (inositol 1,4,5-trifosfato o IP_3) el cual es producido por diferentes isoformas de la enzima Fosfolipasa C. Dicha enzima es activada mediante proteínas G o por receptores con actividad de tirosin-kinasa, posterior a que éstos fueron activados por diferentes mensajeros como neurotransmisores, hormonas u otras señales intercelulares. Además, se sabe que tanto el IP_3R como el RyR son sensibilizados por el mismo Ca^{2+} , es decir, incrementos de este mensajero son capaces de modular la actividad de

dichos receptores por ejemplo afectando la afinidad por sus respectivos ligandos (Bootman y Lipp, 1999). Se sabe que los IP₃R en general presentan un comportamiento tipo “curva de campana” ante el Ca²⁺. Esto es, ante concentraciones bajas tanto de su ligando como también de este catión (100-200 nM), los IP₃R son activados, mientras que cuando se incrementa la concentración de Ca²⁺, esto resulta en un mensaje inhibitorio y los receptores/canal se cierran (Pietri et al, 1990).

El receptor de IP₃R ha sido ampliamente estudiado tanto en tejidos excitables como no excitables, por lo cual se acepta que éstos se expresan de manera ubicua (Carafoli, 1999). Sin embargo, debido a que al menos 3 diferentes genes codifican para isoformas de este receptor (tipo 1, 2 y 3), y el hecho de que cada uno tiene ciertas características distintivas funcionalmente hablando (por ejemplo diferencias en la afinidad por su ligando), incrementan su complejidad. Las tres isoformas de IP₃R tienen diferentes patrones de expresión en diversos tejidos. El IP₃R1 se presenta en abundancia en sistema nervioso central, principalmente en cerebelo, el IP₃R2 tiene un nivel alto de expresión en hígado y riñón, mientras que IP₃R3 es más ubicuo pero se expresa abundantemente en cerebro y tracto gastrointestinal (Carafoli, 1999). Si a lo anterior añadimos que cada isoforma de IP₃R tiene diferente afinidad por su ligando (IP₃R2 tiene la mayor afinidad por IP₃), así como una respuesta diferencial a grandes concentración de Ca²⁺ (la isoforma IP₃R1 es la que mayor inhibición sufre ante la presencia de altas concentraciones de este catión), entonces a pesar de que varios tejidos cuentan con las 3 isoformas, esto no indica una redundancia en la

participación de cada proteína para regular los flujos de Ca^{2+} intra e intercelulares (Bootman y Lipp, 1999).

2.2.1.2 Los Receptores a Ryanodina (RyR)

Los RyRs por su cuenta, también son complejas proteínas que al igual que el de IP_3R , trabaja como tetrámero, permiten la liberación de Ca^{2+} desde el R.E. pero que casi duplican el tamaño de éste último, siendo de aproximadamente 5000 aminoácidos su conformación (Pozzan et al, 1994). Este receptor fue caracterizado originalmente en músculo esquelético como un canal liberador Ca^{2+} inducido por Ca^{2+} (CICR), el cual es activado por el mismo Ca^{2+} , cafeína y por un alcaloide (extraído de la planta *Ryania speciosa*) denominado Ryanodina, de donde proviene su nombre. Sin embargo, no se reconoce un ligando producido de manera endógena para este receptor. Por ejemplo, no está claro de qué manera la ADP ribosa cíclica (cADPR) incrementa la sensibilidad de los RyR y promueve una mayor liberación de Ca^{2+} (Rossi y Sorrentino, 2002). Al igual que los IP_3R 's, se reconocen muchos factores que modulan la actividad de los RyRs, principalmente actuando sobre su región amino-terminal (aproximadamente un 80% del receptor) y que queda expuesta al ambiente citosólico, lo cual habla de su función como proteínas integradoras de múltiples señales desde la carga energética, estado redox, diversos iones (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+}), hasta modificaciones químicas como fosforilaciones reguladas por la proteína cinasa A y C (PKA y PKC respectivamente), los cuales son esenciales para adecuar la función de estos receptores bajo diferentes condiciones (Rossi y Sorrentino, 2002).

La ryanodina ha sido utilizada frecuentemente como un agente farmacológico que induce dos tipos de respuesta por parte del RyR, dependiendo de su concentración. Si se utiliza en concentraciones nM (~ 100), la ryanodina actúa como activador del RyR e induce la salida de Ca^{2+} del RE, mientras que en concentraciones μM -mM, ésta resulta inhibitoria (Masumiya et al, 2001). También ha sido ampliamente documentado que los nucleótidos de adenina inducen la apertura de estos canales (principalmente sobre la isoforma RyR1), pero que ante la presencia de Ca^{2+} , el RyR2 es capaz de activarse, pero sólo si la concentración de dichos nucleótidos es mayor que la requerida por los RyR1 (Butanda-Ochoa et al, 2006). Muy similar a los IP_3Rs , el Ca^{2+} también ejerce una respuesta en los RyR de tipo bifásica: a bajas concentraciones de Ca^{2+} éstos se activan, contrario a lo que ocurre cuando la concentración de Ca^{2+} alcanzada es μM -mM, lo cual resulta inhibitorio. Este evento es interesante desde el punto de vista de cinética de flujo de Ca^{2+} , ya que entonces la distribución de todas estas proteínas es determinante para la organización del manejo de este mensajero, tanto intra como intercelularmente. A este respecto, serían un tanto comparable la participación $\text{IP}_3\text{R1}$ y RyR en las oscilaciones de Ca^{2+} observadas en diferentes tejidos, ya que ambos se activan por este catión, pero cuando su concentración incrementa suficiente, éstos se inactivan y dejan de liberar Ca^{2+} , lo cual es una manera de modular la amplitud y duración de dicha oscilación (Bootman y Lipp, 1999).

Al igual que con el IP₃R, la expresión de estas proteínas no se limita a tejidos excitables. Se han reportado tres isoformas para estos receptores en vertebrados. RyR1 se presenta de manera abundante en músculo esquelético pero también se encuentra en sistema nervioso central y tracto gastrointestinal, RyR2 es expresado en grandes cantidades en músculo cardiaco principalmente, mientras que RyR3 lo hace de manera ubicua, expresándose en cerebro y músculo liso de manera preferente pero también en corazón, esófago, riñón y otros órganos (Carafoli, 1999).

2.2.1.3 Bombas de Ca²⁺ dependientes de ATP (SERCA y PMCA)

Como se menciona anteriormente, el mantenimiento de concentraciones bajas de Ca²⁺ es regulado por proteínas que se encargan de sacar literalmente el Ca²⁺ del citosol hacia el espacio extracelular (PMCA o intercambiadores Na⁺/Ca²⁺) o introducirlo al lumen del RE (SERCA). Esta situación es sumamente crítica para la célula, ya que el mantener concentraciones elevadas de Ca²⁺ está directamente relacionado con la inducción de muerte celular por apoptosis (Berridge et al, 2003).

Hay una gran familia de bombas iónicas dependientes de ATP (ATPasas), subdivididas en tres tipos: F, V y P. Éstas últimas se caracterizan por estar compuestas por una o máximo dos subunidades y tener un tamaño aproximado de 100 kDa, además de estar a cargo del flujo de diferentes iones como el K⁺, Na⁺, H⁺, Mg²⁺, y Ca²⁺ (Carafoli, 1999). La propiedad distintiva de este tipo de ATPasas es la forma enzimática intermedia que se forma

cuando ésta es energizada debido al uso del fosfato y proveniente de ATP, el cual es acoplado a un aspartato como sitio activo, y de esta manera tener dos formas de la misma enzima: E1 y E2 (Pedersen y Carafoli, 1987). La forma E1 corresponde a un estado en el que la enzima tiene una gran afinidad por el ion y se abre en su región citosólica; mientras que durante el estado E2, su afinidad por el ion disminuye y se abre la región externa de dicha proteína, es decir, la que se encuentra hacia el lumen del RE o fuera de la célula según sea el caso.

La ATPasa localizada en el RE es conocida como SERCA (ATPasa de Ca^{2+} de retículo sarco-endoplasmático), y ha sido bastante estudiada en músculo donde a través del uso de un fármaco inhibitorio conocido como thapsigargina (proveniente de la planta *Thapsia garganica*), se determinó su función como regulador de los eventos de contracción-relajación (Hasselbach y Makinose, 1961). Pero como era de esperarse, posteriores estudios determinaron que esta enzima tenía presencia en muchos otros tipos celulares, lo cual no era de dudarse dado su importante labor dentro de la homeostasis de Ca^{2+} . Se reconocen tres isoformas de SERCA cuya expresión también es variable dependiendo de su localización anatómica: SERCA1 tiene una rica expresión en músculo esquelético; SERCA2 también está presente en diferentes tipos de músculos, siendo muy enriquecida su presencia en músculo cardiaco, pero además cuenta con dos variantes derivadas de splicing alternativo, la forma SERCA2a (al parecer exclusiva de músculo) y SERCA2b, la cual es ubicua; y por último, la isoforma 3 que se encuentra

presente en diferentes tejidos pero de manera más discreta que las formas anteriores (Carafoli, 1999).

La ATPasa de membrana plasmática (PMCA) por su lado, es esencial en el delicado balance de la señalización de Ca^{2+} principalmente en células no musculares, ya que por ejemplo, se ha reportado que su contribución en la extrusión de Ca^{2+} en células cardiacas es mínima comparada con la presentada por SERCA (Stauffer et al, 1995). Esta enzima también proviene de la familia de ATPasas tipo P, caracterizadas por la formación de estados intermedios-fosforiladas y además ser moduladas por la proteína quelante de Ca^{2+} Calmodulina (Delgado-Coello et al, 2003). Se conocen al menos cuatro isoformas de esta enzima en mamíferos, siendo las isoformas 1 y 4 las que de manera ubicua se distribuyen en todos los tipos celulares, aunque se sabe que salvo el sistema nervioso central, el resto de los tejidos tienen una presencia muy baja de esta proteína en la totalidad de su membrana plasmática (alrededor de 0.1%), lo cual la hace ver como una proteína que de manera redundante con SERCA, participa en coordinar las oscilaciones de Ca^{2+} de una manera más fina (Stauffer et al, 1995).

2.2.2 Señalización de Ca^{2+} en el hígado

El hígado ha sido ampliamente estudiado en cuanto a la manera en que la señalización de Ca^{2+} se lleva a cabo (Barrit, 2000). El Ca^{2+} intracelular es un segundo mensajero clave en la regulación del metabolismo hepático, ya que se le ha asociado con muchos otros procesos más como son la secreción biliar, metabolismo de glucógeno, actividad mitocondrial, transcripción,

regulación de la osmolaridad, proliferación y muerte celular (Barrit, 2000; Dupont et al, 2000 y Pusch, 2004). Gracias a dichos estudios, se logró entender cómo la señalización por Ca^{2+} es capaz de regular múltiples eventos al mismo tiempo. Lo anterior fue cuidadosamente determinado mediante técnicas de microscopía que permitieron observar que aunque las oscilaciones de Ca^{2+} ocurran de manera masiva, existen dominios intracelulares o intercelulares donde se encuentran concentradas las proteínas necesarias para desencadenar eventos bien definidos. Por ejemplo, regiones de la membrana nuclear parecen tener extensiones hacia el RE, lo cual es conocido como membrana nucleoplásmica, y que al contar con las proteínas necesarias para coordinar flujos de Ca^{2+} , están relacionadas con la regulación de la expresión genética (Echevarría et al, 2003).

Se sabe que la formación de ondas de Ca^{2+} intracelular en células epiteliales polarizadas dependen principalmente de pozas intracelulares más que de canales de membrana plasmática (Ca^{2+} extracelular), ya que ni la orientación ni la velocidad de estas ondas se ve alterada en medios de cultivo libre de Ca^{2+} , a diferencia de lo que ocurre con tejidos excitables, como lo que se reportó para el NSQ (Lundkvist et al, 2005). Esto señala que proteínas intracelulares como IP_3R , RyR, SERCA y PMCA, son fuertes candidatos para ser estudiados como elementos clave en la regulación de la homeostasis de Ca^{2+} en tejidos como el hígado.

En células acinares hepáticas, algunas isoformas de IP_3R se encuentran concentradas en la región apical, mientras que el RyR se localiza en la parte

basolateral. Esto es un indicativo de que los IP₃R se requieren para iniciar la onda de Ca²⁺, mientras que el RyR se encarga de dispersar la señal basolateralmente. En contraste, células epiteliales no pigmentadas del ojo, no expresan RyR pero tienen la isoforma 1 de IP₃R en la región apical y la 3 basolateralmente, sugiriendo en este caso que esta última se encarga de diseminar al Ca²⁺ como lo hace el RyR en otros tipos celulares. En cuanto a SERCA, ésta es responsable de regular numerosas funciones a nivel celular como son: mantener baja concentración de Ca²⁺ citosólico en células en reposo; controla la actividad de canales operados por Ca²⁺; al término de un estímulo celular que fue acompañado de un incremento de Ca²⁺, esta proteína regresa a este mensajero a su reservorios así como también se le asocia con la modulación de las oscilaciones de este catión cuando se lleva a cabo una transmisión de señales celulares estimuladas por agonistas (Magnino, 2000).

Se sabe que el hígado cuenta con toda una exquisita gama de proteínas-canal y bombas dependientes de ATP para poder regular su homeostásis de Ca²⁺ intracelular: Expresa los tres distintos genes reportados para mamíferos del receptor a IP₃, (dos terceras partes corresponden a la isoforma 2, una tercera parte a la 1, y menos del 1% a la 3, la cual se encuentra solo en los colangiocitos o células del ducto biliar) (Wojcikiewick, 1994 y Magnino, 2000); una isoforma del receptor a Ryanodina (tentativamente una versión truncada de RyR1 de acuerdo a Pierobon et al, 2006), que a pesar de que su secuencia y estructura no están bien definidas aún en el hígado, funcionalmente está ampliamente reconocidas en este

tejido (Shoshan-Barmatz, 1990; Bazotte et al, 1991; Shoshan-Barmatz et al, 1991; Lilly y Gollan, 1995 y Díaz-Muñoz et al, 1998); presenta dos genes de SERCA, aunque la forma 2 es la más abundante (99%) y la 3 solo representa un 1% (Dun Wu et al, 1995); y dos isoformas de PMCA (1 y 4) (Stauffer et al, 1993 y Howard et al, 1994).

Se han estudiado ampliamente los mecanismos por los cuales las oscilaciones de Ca^{2+} intracelular hepático son conducidas tanto en condiciones normales (revisados en Gaspers y Thomas, 2005) como también los cambios que sufre la regulación de este catión en respuesta a diferentes modelos donde se altera la fisiología del hígado: regeneración inducida por hepatectomía (Díaz-Muñoz et al, 1998 y Magnino et al, 2000), cirrosis y fibrósis inducidas por intoxicación con CaCl_4 y ligación canalicular respectivamente (Katsumata et al, 1998 y Dufour et al, 1999) y por presencia de hepatocarcinomas (Delgado-Coello et al, 2003), entre otras más. Pero además, Rawson y colaboradores (2003) reportaron que debido a un decremento en la carga energética (que funciona como un indicador de la relación entre la cantidad de nucleótidos de adenina fosforilados disponibles, ATP, ADP y AMP), mediante el uso de un análogo no metabolizable de fructosa (2,5-anhidro-D-manitol) y el cual secuestra fosfatos, o un ayuno de una noche, ambos causaron incrementos importantes de la concentración de Ca^{2+} intracelular, lo cual fue acompañado de un aumento en la síntesis de ATP. En conclusión de estos ejemplos, al verse comprometido el metabolismo energético hepático, hay una clara respuesta por parte del

manejo de Ca^{2+} como respuesta correctiva a estos eventos que pueden desequilibrar la homeostasis de este tejido.

2.2.3 Señalización de Ca^{2+} y ritmos biológicos

Ha sido reportado en varios modelos experimentales la participación del Ca^{2+} como un regulador de diferentes componentes del reloj circadiano: sincronización (Ding et al, 1998 y Duguay et al, 2009), expresión de genes reloj (Lundkvist et al, 2006, Lamia et al, 2009 y Báez-Ruiz et al, 2011) y la salida del reloj (Hamada et al, 1999¹ y Aguilar-Roblero et al, 2007) como un abordaje a la pregunta de cómo el Ca^{2+} ejerce influencia sobre los procesos subyacentes al sistema circadiano. También, se han caracterizado fluctuaciones diurnas en el Ca^{2+} intracelular de diferentes organismos (Colwell, 2000 y Xu, 2007), así como en proteínas que manejan este ion (Díaz-Muñoz et al, 1999 y Hamada et al, 1999²).

Se conoce el papel que juega el Ca^{2+} en la regulación de la ritmicidad circadiana y activación de genes/proteína reloj en organismos unicelulares como los protistas *Euglena* y *Paramecium* (Goto et al, 1985 y Hasegawa et al, 1999), el molusco *Bulla* (Khalsa et al, 1993), plantas (Xu et al, 2007) e insectos como la *Drosophila melanogaster* (Harrisingh et al, 2007). Sin embargo, dentro del sistema circadiano en mamíferos, solo en el NSQ se ha estudiado la manera en que el Ca^{2+} participa en los diferentes procesos llevados a cabo en relación a los mecanismos que generan la ritmicidad (Ikeda et al, 2003, Aguilar-Roblero et al, 2007). Entonces esperamos que, si en nuestro modelo

hay cambios en la carga energética a diferentes horas (Díaz-Muñoz et al, 2000) en nuestro protocolo, entonces los procesos de regulación de la concentración de Ca^{2+} intracelular podrían presentar modificaciones durante la manifestación del oscilador circadiano del alimento. Sin embargo, no hay información acerca de cómo es regulado el manejo del Ca^{2+} por las células del hígado durante la expresión del OSA.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Teniendo cómo antecedentes inmediatos, la existencia de cambios significativos en la actividad metabólica y expresión genética del hígado durante la manifestación del OSA, además de tomar en consideración evidencias que señalan que este tejido participa en el control del hambre-saciedad, entonces es muy posible que además de las modificaciones encontradas en el metabolismo hepático, la forma en que se está movilizand o el calcio intracelular en dicho órgano, presente adaptaciones distintivas en animales que son sometidos a horarios de alimentación diferentes a los que normalmente están acostumbrados. Es por ello que el planteamiento de este proyecto busca explorar una posible relación entre el manejo de Ca^{2+} intracelular en el hígado y la expresión del OSA a partir del estudio de las proteínas que modulan la homeostasis de este catión, utilizando diferentes pruebas bioquímicas e inmunohistoquímicas, que permitan deducir si hay o no modificaciones en los mecanismos de movilización de Ca^{2+} intracelular en el hígado en los grupos experimentales bajo horarios restringidos de alimentación.

Es en este sentido planteamos las siguientes preguntas: ¿La maquinaria que orquesta el manejo de Ca^{2+} intracelular pueda verse modificada a lo largo del ciclo de 24 horas?; la instalación del OSA y la expresión de la AAA inducen cambios en los mecanismos que regulan la permeabilidad del Ca^{2+} y ¿De qué manera estas proteínas pueden influir sobre el reloj la ritmicidad de la expresión de *Per1*?

4. HIPÓTESIS

Si la expresión del OSA va acompañada de adaptaciones en los principales parámetros metabólicos y fisiológicos del hígado, entonces ocurrirán cambios en la actividad y presencia de las proteínas que modulan la dinámica de Ca^{2+} intracelular ¿en el mismo sentido en que ocurren otros cambios ya observados?. Además, también éste último tendrá un papel en la regulación de la ritmicidad en éste tejido, dada su importancia como regulador de procesos celulares críticos en el funcionamiento hepático.

5. OBJETIVOS

GENERAL

- ⌚ Caracterizar la actividad, presencia y distribución zonal hepática de proteínas reguladoras de señalización de Ca^{2+} intracelular durante la expresión del OSA y bajo diferentes condiciones de alimentación.
- ⌚ Determinar el efecto regulador que tienen proteínas moduladoras de la señalización de Ca^{2+} intracelular sobre la ritmicidad circadiana de la proteína reloj PER1 en un modelo *ex-vivo* hepático.

PARTICULARES

Condiciones in vitro

- ⌚ Caracterizar en tejido hepático de ratas y en distintos regímenes de alimentación la actividad de los canales-receptores RyR e IP_3R , mediante ensayos de unión a radioligando y la actividad de las bombas de Ca^{2+} , SERCA y PMCA mediante ensayos enzimáticos.
- ⌚ Cuantificar por Western blot la presencia de los canales-receptores RyR e IP_3R (isoforma 1 y 2) y las bombas de Ca^{2+} SERCA2 y PMCA1 en hígado de ratas con diferentes regímenes de alimentación a lo largo de un ciclo diurno.

- ⌚ Determinar mediante inmunohistoquímica la distribución zonal hepática de los canales-receptores RyR e IP₃R y las bombas de Ca²⁺ SERCA y PMCA en hígado de ratas con diferentes regímenes de alimentación.
- ⌚ Determinar por Cosinor los parámetros rítmicos en los perfiles temporales hepáticos de actividad y presencia de los canales-receptores RyR e IP₃R y las bombas de Ca²⁺ SERCA y PMCA de ratas bajo diferentes regímenes de alimentación

Condiciones ex vivo

- ⌚ Determinar el efecto que tiene el bloqueo farmacológico de los canales-receptores RyR e IP₃R y la bomba de Ca²⁺ SERCA, sobre la ritmicidad de la proteína reloj PER1 en una rata transgénica para la enzima reportera Luciferasa (LUC).

6. METODOLOGÍA

EXPERIMENTO 1.

Diseño experimental

Fueron utilizadas ratas macho Wistar de 200 ± 20 g (peso inicial) como modelo experimental y se dividieron en los siguientes grupos, de acuerdo a los protocolos de trabajo ya reportados (Báez Ruiz et al, 2005^{1,2}). Se mantuvieron con ciclos de luz/oscuridad de 12:12 horas (siendo considerada la hora de encendido de las luces como ZT0 o tiempo del sincronizador = 0, como punto de referencia para nuestros experimentos), con temperatura constante (25°C) y con disponibilidad de agua *ad libitum*, así como también con alimento para roedores (Purina Chow), excepto durante los experimentos de restricción de alimento, ayuno y realimentación. Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo a la Guía Institucional de Cuidado y Uso de Animales Experimentales (UNAM).

Las ratas fueron asignadas de manera aleatoria a los siguientes cuatro grupos experimentales:

1) Animales con libre acceso al alimento o *ad libitum* (AL)

Un grupo control (o de referencia, n=40) de animales se mantuvo sin restricción de comida todo el tiempo durante un lapso de 3 semanas. Estos animales se subdividieron en grupos (de 4-5 animales por grupo) y se sacrificaron mediante decapitación a diferentes horarios (cada 3 h), hasta

completar un ritmo diurno a partir de ZT0, considerando ZT0 como el encendido de las luces (ó equivalente a las 8:00 h tiempo geográfico).

2) Animales en Horario de Restricción de Alimento (RA)

Un segundo grupo de animales (n= 40) se sometió a un régimen de RA, el cuál consistió en ofrecer pellets de alimento solamente por un par de horas al día (del tiempo ZT4 a ZT6). Esta rutina se siguió por 3 semanas y posteriormente se sacrificó a los animales. Este grupo experimental se dividió en subgrupos y se sacrificó de la misma manera en que se hizo para los animales con alimentación AL, para completar un ciclo diurno.

3) Animales con Ayuno de 24 h (AY)

Un tercer grupo de ratas se mantuvo en ayuno total durante 22 horas y al término de estas se sacrificó. Esto con la finalidad de tener un control de condición alimenticia que se aproximara a las condiciones fisiológicas presentadas por el grupo RA del tiempo ZT3, el cual aunque tiene el mismo tiempo de ayuno (22 h), presenta la CAA como manifestación de sincronización por alimento y ha estado bajo varios ciclos de ayuno durante 3 semanas.

4) Animales Re-alimentados (ReA)

El último grupo de animales se mantuvo sin alimento durante 22 horas (a partir de ZT6) y al término de estas se les alimentó por 2 horas. Después del periodo de alimentación se sacrificaron, con la finalidad de tener un control que se aproximara a las condiciones presentadas en el grupo experimental HRA ZT6.

Fraccionamiento celular hepático

Se usó para este fin la técnica descrita por Díaz-Muñoz et al, (1998) y que consiste en fraccionar al hígado usando centrifugación diferencial y por gradientes, para poder obtener fracciones enriquecidas de retículo endoplásmico (RE) como de membrana plasmática (MP). Todos los procedimientos fueron realizados en frío (utilizando hielo y centrifugando a 4° C).

El tejido hepático fue obtenido y pesado de animales sacrificados con guillotina. Se tomaron de 5 g de hígado y se homogenizaron en 15 ml de la solución 1 (225 mM sacarosa, 0.3 mM EGTA, 10 mM Tris/HCl (pH 7.4) y 1 mM DTT, suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasa consistente en 0.1 mM PMSF, 0.1 mM benzamidina, 10 µM pepstatina A, 1 µg/ml aprotinina y 10 µg/ml leupeptina), previamente enfriada en hielo. El homogenado resultante fue llevado a una primera centrifugación de 1,000 g por 15 min en una centrífuga Sorvall. El sobrenadante fue recuperado por decantación y nuevamente fue centrifugado (dos veces a 7,700 g por 15 min para precipitar la fracción mitocondrial), mientras que el precipitado fue preservado para obtener la MP, como más adelante se detallará. El sobrenadante resultante fue ultracentrifugado usando un rotor de ángulo fijo Beckman 70Ti a 100,000 g por 60 min. El precipitado resultante corresponde a la fracción microsomal y el sobrenadante a la fracción citosólica. Ambas fracciones fueron colectadas, alicuotadas y refrigeradas a -70°C hasta ser utilizadas.

En cuanto al primer pellet obtenido, éste fue resuspendido en 20 ml de una solución 2 (250 mM de sacarosa y 10 mM de Tris-HCl pH 7.5) de acuerdo al método descrito por (Janicki et al, 1974). Posteriormente dicha mezcla se colocó cuidadosamente en un gradiente de 2.6 ml de Percoll (1.13 g/ml de densidad) y 0.4 ml de sacarosa 2 M, para después ser centrifugada a 35,000 g por 20 minutos, para obtener la fracción de membrana plasmática (MP) en medio del sobrenadante (se presenta como una fase blanca y espesa). Esta fracción se recuperó cuidadosamente y se mezcló con 5 ml de la solución 2 (a la cual se le adicionó 1.3 ml de CaCl_2) y se centrifugó a 37,000 g por 25 min, con el propósito de lavar ADN contaminante. El precipitado se resuspendió en 2 ml de solución 1 y se guardó a -70°C hasta su uso.

La concentración de proteína se determinó de acuerdo al método colorimétrico de Lowry (Lowry et al, 1950), utilizando albumina bovina sérica (BSA) como estándar. Adicional a esto, se calculó el rendimiento de recuperación de cada fracción obtenida (Idell et al, 1982), cuantificando la actividad de enzimas cuya presencia es específica para cada fracción subcelular. La actividad de Glucosa-6-fosfatasa (marcadora de fracción microsomal o RE) fue realizada según el método de Harper et al, 1992, mientras que la actividad correspondiente de 5'Nucleotidasa (marcadora de MP) fue llevada a cabo según el método reportado por Widnell y Unkelesy et al, 1972. Lo anterior es con el propósito de evaluar la pureza de cada fracción obtenida.

Determinación de corticosterona circulante

Muestras para obtención de suero fueron colectadas directamente de la sangre del tronco de cada rata y centrifugadas a 4,000 g por 15 minutos a 4°C. El plasma obtenido fue almacenado a -70 °C para las subsecuentes cuantificaciones de corticosterona. La concentración de corticosterona fue determinada por duplicado utilizando un kit commercial para ELISA (Assay Designs, Ann Arbor, MI).

Ensayos de unión específica a [³H]-IP₃

Los ensayos de unión a [³H]-IP₃ fueron realizados según el método reportado por Furiuchi et al, (1993) y modificado en Vázquez-Martínez et al, 2000: de 100 a 300 µg de fracción de RE y MP fueron incubados por triplicado por 30 minutos a 4 °C en 120 µl volumen final de una solución conteniendo 25 mM de Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM de NaHCO₃, 1 mM de EDTA, 0.25 mM de DTT. Para la cuantificación total, se agregaron de 0.5 a 100 nM de [³H]-IP₃ (NEN, actividad específica 21 Ci/mmol), mientras que para los ensayos no específicos se añadió lo anterior junto con un exceso de IP₃ no marcado (10 µM). Cada muestra se lavo posteriormente 5 veces con 5 ml de solución refrigerada de 25 mM de Tris-HCl, 5 mM de NaHCO₃ y 1 mM de EDTA. Para recuperar las muestras marcadas, éstas se filtraron usando filtros Wathman GF/F. Luego se dejaron secar y se cuantificaron en 10 ml de tritosol (Fricke, 1975) en un contador de centelleo LS6500 Beckman. Para determinar la actividad de unión específica se resta la actividad no específica de la total obtenida (Vázquez-Martínez et al, 2000).

Ensayos de unión específica a [³H]-Ryanodina

Este procedimiento fue llevado a cabo según el método de Hamilton et al, (1989). 400 µg de fracción microsomal (RE) fue incubada de 14-16 horas por triplicado junto con 250 µl de volumen final de una solución compuesta por 300 mM KCl, 100 µM de CaCl₂, 100 µg/ml de BSA y 20 mM de MOPS (pH 7.4) a temperatura ambiente. Al igual que con el método anterior, hubo 2 tipos de ensayos: de unión total utilizando diferentes concentraciones de [³H]-Ryanodine (de 0.5 a 500 nM) (NEN, actividad específica 56 Ci/mol) y de unión inespecífica utilizando las condiciones anteriores junto con un exceso de ryanodina no marcada (10 µM). Éstas se lavaron 5 veces en una solución de 0.3 mM de KCl refrigerado y se siguieron los mismos procedimientos descritos previamente para el ensayo anterior.

Cuantificación de la actividad enzimática de las ATPasas de Ca²⁺ SERCA y PMCA

Se utilizó el método reportado por Saborido et al, (1999), en donde se cuantificó la actividad específica de la ATPasa de Ca²⁺ mediante registros espectrofotométricos de la oxidación de NADH en un sistema reconstituido, el cual permite tener ATP disponible, en función del uso de NADH, el cual es el factor limitante de la reacción. Además, para contrarrestar posible contaminación entre fracciones celulares (ER y PM), se añadieron como inhibidores farmacológicos Tapsigargina (específica para SERCA) y eosina (específica para PMCA), con la finalidad de tener la actividad específica de cada una (Janicki et al, 2001).

La actividad de las ATPasas se cuantificó mediante un ensayo acoplado a otras enzimas, en el cual la proporción de la hidrólisis del ATP está ligada a la oxidación de NADH y es registrada a 340 nm. Fueron usadas muestras de RE y PM para los ensayos de SERCA y PMCA respectivamente. Se usaron de 50 a 100 μg de cada fracción, y fueron incubados en un amortiguador conteniendo 25 mM de MOPS, 0.2 mM de EGTA, 5 mM de MgCl_2 , 100 mM de KCl, 0.6 mM de fosfoenolpiruvato, 2.4 unidades. ml^{-1} de piruvato cinasa, 10 unidades. ml^{-1} de lactato deshidrogenasa, y 0.27 mM de NADH en un volumen final de 1 ml. Después de la pre-incubación de la mezcla del ensayo por 5 min a 37°C, la reacción fue iniciada por la adición de 1 mM de ATP (concentración final).

Cuantificación de proteínas por Western blot

Se usaron las fracciones RE y MP para poder semi-cuantificar las proteínas correspondientes a las diferentes isoformas reportadas para hígado del IP_3R , RyR, SERCA y PMCA, así como también la proteína reloj PER1 mediante Western blot. Los anticuerpos contra $\text{IP}_3\text{R1}$ (sc-6090), $\text{IP}_3\text{R2}$ (sc-7278), SERCA2 (sc-8095), PMCA1 (sc-16436), PER1 (sc-7724) y β -actina (sc-47778) fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

Las fracciones celulares fueron resuspendidas en el amortiguador de la muestra con SDS en condiciones reductoras como fue descrito por Laemli (1970). Las proteínas fueron separadas en dos diferentes geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) por electroforesis: de gradiente 4-15% para IP_3R (tipo 1 y 2) y RyR, y 7.5% para PER, SERCA2, y PMCA1. Las proteínas sujetas a

electroforesis fueron transferidas subsecuentemente a membranas de nitrocelulosa y bloqueadas con leche libre de grasas al 5% en PBS con Tween 0.1% por 1 h a temperatura ambiente. Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario toda la noche. Todos los anticuerpos fueron usados a una dilución 1:500 (excepto β -actina, 1:1000). Las membranas fueron lavadas y reveladas con el anticuerpo secundario acoplados a fosfatasa alcalina y correspondiente a la especie en que fue levantado cada anticuerpo primario. La relación contra β -actina y las señales de las proteínas experimentales fueron usadas para cuantificar los resultados de los Western blots. Para evaluar la presencia de RyR en el hígado, dado que ningún anticuerpo logró satisfacer los criterios necesarios para detectarla por Western blot, fue necesario incluir una técnica adicional para determinar dicha proteína. Después de la transferencia a membrana de nitrocelulosa de fracciones RE en geles de gradiente, ésta se sumergirá durante 1 minuto en una solución del colorante inespecífico y reversible Rojo de Ponceau. Aquí visualizamos las bandas de proteínas que se transfirieron del gel a la membrana y como control de peso molecular, se utilizaron fracciones subcelulares de músculo esquelético y que están enriquecidas con RyR (peso esperado ~500 kDa). Previamente se ha descrito también por otros métodos de tinción sobre el gel que dicha proteína corresponde al RyR en hígado (Shoshan-Barmatz, 1990). Adicional a esto, el anticuerpo anti-RyR (Abcam, ab-2868) fue utilizado y fue exitoso para demostrar la presencia de RyR en las muestras de músculo esquelético pero no para las de hígado.

Inmunohistoquímica de proteínas moduladoras de Ca²⁺ intracelular en rebanadas de hígado

Se tomaron muestras de tejido hepático y se fijaron en paraformaldehído al 4%, para después exponerlas a diferentes concentraciones de sacarosa e incluirlas en Tissue-Tek. Las rebanadas fueron hechas en criostato (4-6 μm de grosor), según el método de Joseph et al, (1995). Las dos isoformas de los receptores a IP₃ y PMCA, así como también SERCA, se marcaron con los mismos anticuerpos específicos descritos anteriormente. Para el caso de RyR, se usaron ligandos y antagonistas acoplados a fluoresceína, como fue descrito por Vázquez-Martínez et al, (2003), dado que no fue encontrado un anticuerpo que reconociera esta proteína en el hígado.

Para determinar la zonación acinar (pericentral y periportal) de la distribución de las proteínas RyR, IP₃R (tipo 1 y 2), SERCA2 y PMCA1, secciones de hígado de rata fueron marcadas con anticuerpos contra estas proteínas. La inmunohistoquímica fue realizada usando secciones de hígado fresco disecados en las condiciones anteriormente mencionadas. Las rebanadas (o secciones) fueron fijadas en paraformaldehído-PBS al 4% (peso/volumen) pH 7.5 toda la noche y criopreservadas en 30% (p/v) de sacarosa para otro ciclo de toda la noche. Después de permeabilizar con 0.05% de Tritón-PBS por 10 min con 5% de leche libre de grasa en PBS con 0.1% de BSA. Posteriormente, las secciones fueron incubadas con el anticuerpo primario respectivo, a la concentración recomendada por el proveedor, toda la noche a 4°C. Después, fueron lavadas en PBS 3 veces, las

secciones fueron incubadas a temperatura ambiente por 1 h con un anticuerpo secundario conjugado al colorante fluorescente FITC (Fluoresceína 5-isotiocianato).

Las rebanadas de hígado fueron visualizadas usando un microscopio CX31 Olympus. Las imágenes fueron colectadas con una cámara DP71 Olympus y obtenidas usando el programa Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Version 6.0, Silver Spring, MD, USA). A lo largo del estudio, la fluorescencia estandarizada fue puesta en todas las proteínas estudiadas contra su control negativo respectivo (el cual fue llevado a cabo omitiendo el anticuerpo primario específico). La intensidad de la fluorescencia fue cuantificada por el método descrito por Lahm et al, (2004) en las regiones de interés periportales (PP) y pericentrales (PC), y las proporciones PC/PP fueron calculadas en cada grupo experimental.

Análisis estadístico

Los resultados están expresados como el promedio \pm error estándar de la media (SEM) de 4-5 individuos por experimento. El análisis estadístico fue hecho usando el programa Prism versión 5.0 (GraphPad software, USA). Para detectar posibles diferencias debido a la condición de tiempo, se llevó a cabo un análisis lineal de ANOVA para la comparación dentro de cada grupo (AL y RA). La significancia fue estimada y contrastada por una prueba de Tukey con un nivel α de 0.05 por lo que las diferencias en las comparaciones con $p < 0.05$ fueron consideradas como significativas. Adicionalmente, una ANOVA de dos

vías fue realizada con el fin de reconocer diferencias dentro y entre los diferentes puntos temporales de los grupos AL vs RA. Por otro lado, para el caso de los controles de condición alimenticia (AY y ReA), una prueba “*t de Student*” fue usada para compararlos de la siguiente manera: AY vs ReA, AY vs RA-ZT3, ReA vs RA-ZT6; y RA-ZT3 vs RA-ZT6 respectivamente. Para el análisis cronobiológico, los perfiles temporales de todos los parámetros en donde se completo un ciclo diurno fueron analizados mediante el método de Cosinor simple con un periodo de 24 h, como es descrito por Nelson, et al, (1979). Las características rítmicas obtenidas por este método son: acrofase (una medida del tiempo en que el valor máximo de cada ciclo diurno es alcanzado), MESOR (media estadística estimada para un ritmo) y amplitud (la cual corresponde a la mitad del valor alcanzado entre el máximo y el mínimo según la función coseno ajustada a cada ritmo). El punto temporal ZT0 (tanto del grupo AL como RA) fue repetido en cada gráfica como ZT24 para alcanzar un ciclo completo diurno para fines visuales, pero éste no fue incluido en los análisis estadísticos y rítmicos ya mencionados.

7. RESULTADOS

7.1 Experimento 1. Determinación de la ritmicidad diurna en proteínas reguladoras de la señalización de Ca^{2+} intracelular en hígado

7.1.1 Modificación en la ritmicidad de corticosterona circulante y de la proteína reloj PER1 hepática como evidencias de sincronización por alimento

La Figura 1A muestra el perfil de ritmicidad diurna de corticosterona circulante de animales con libre acceso al alimento (AL) y bajo horarios de restricción de alimento (RA). El grupo AL muestra sus valores máximos antes de que las luces se apaguen (ZT12), mientras que en el caso de los animales bajo RA lo presentan previo al acceso de alimento (ZT3), además de presentar un segundo pico de corticosterona similar en horario al presentado por el grupo AL. El mismo patrón de ritmicidad fue observado para el caso de PER1 (Figura 1B): el grupo AL mostró un marcado incremento en la cantidad de dicha proteína reloj durante la fase de oscuridad, que corresponde a cuando éstos se alimentan; sin embargo, en el caso del grupo RA, éstos mostraron un claro desfasamiento de su nivel máximo de PER1, y que en este caso concuerdan con el horario en que dichos animales tienen acceso a su comida. Además, de acuerdo a la prueba de ANOVA de dos vías, tanto en la corticosterona como también en PER1, los horarios ZT3 y ZT6 del grupo RA fueron diferentes significativamente contra los del grupo AL ($p < 0.05$).

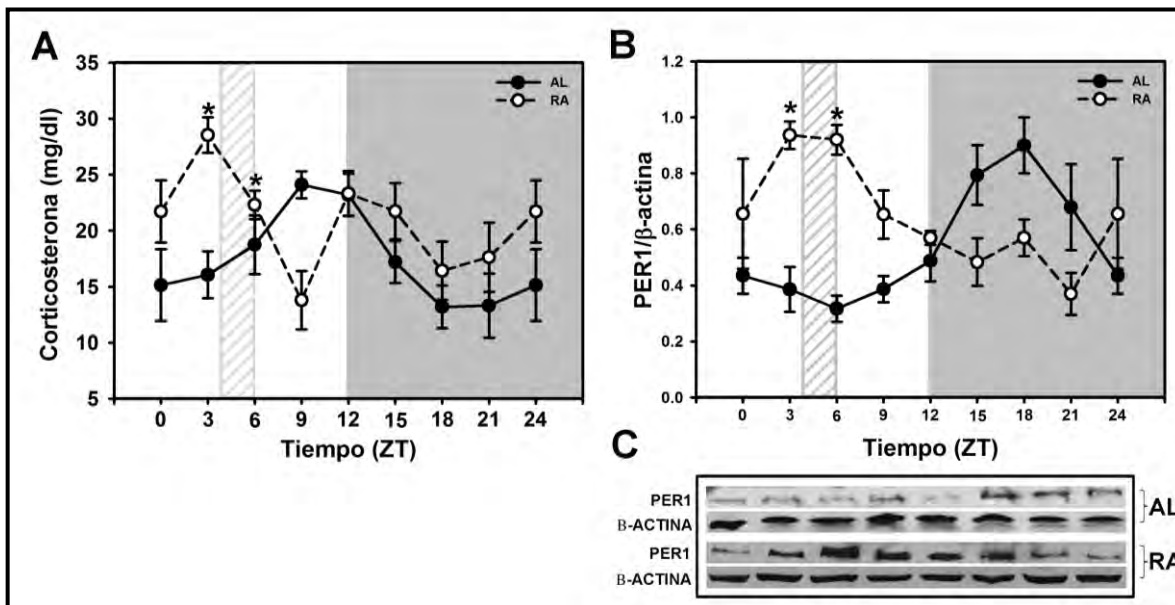


Figura 1. Perfil rítmico diurno de corticosterona plasmática y proteína de reloj PER1 en ratas sometidas a distintas condiciones de alimentación. En A se observa la concentración en plasma de corticosterona a lo largo de un ciclo diurno en ratas con libre acceso al alimento (AL) y bajo horario de restricción de alimento durante el periodo de luz (RA). En B se muestra la variación diurna en la presencia de PER1 a lo largo del día en ratas AL y RA. En ambas figuras, la barra rayada que cruza el eje Y representa el horario restringido de alimentación. El rectángulo gris en la gráfica representa el periodo de oscuridad (ZT12-ZT24). Los datos son promedio \pm error estándar de una $n = 5$. Las diferencias significativas vs AL son presentadas como $*p < 0.05$. En C se observan resultados representativos de un Western blot de PER1 y su respectivo control de β -actina.

La prueba de ajuste sinusoidal de un ritmo, o prueba de Cosinor fue aplicada para cada parámetro que fue muestreado a lo largo de un ciclo diurno. Como se describió anteriormente, la cantidad de corticosterona plasmática y de PER1 fueron notoriamente distintas a lo largo del día, lo cual aunado al hecho de que mediante la prueba de ANOVA se demostró que hubo diferencias significativas entre puntos temporales de cada grupo, hizo necesario que se utilizara una prueba que indicara la manera en que algunos parámetros rítmicos se comportaban para cada grupo. La Tabla I indica que la acrofase tanto de la corticosterona plasmática y de PER1 del grupo RA resultó con avances de fase (de 7 y 12 h respectivamente) con respecto a lo

observado en el grupo AL, y que los niveles diarios de corticosterona son aproximadamente un 25% más elevados en el grupo RA como lo demuestra el MESOR de dicho parámetro. Ambos resultados confirmaron que nuestro protocolo de RA es apropiado para implementar experimentalmente la expresión del OSA mediante la sincronización por alimento.

Tabla I. Características de los ritmos diurnos de corticosterona plasmática y PER1 bajo dos condiciones de alimentación

	Acrofase ZT (h)		Amplitud		MESOR	
	AL	RA	AL	RA	AL	RA
Corticosterona	09:13	02:15	3.13	3.39	17.6	21.7
PER1	17:18	05:06	0.27	0.22	0.54	0.64

Los parámetros acrofase, amplitud y MESOR fueron obtenidos según lo descrito en los métodos. Los datos se determinaron de los perfiles temporales de cada parámetro en donde cada punto temporal tuvo una n de 5 animales. Las unidades tanto de la amplitud como del MESOR para cada parámetro fueron: mg/dl para Corticosterona y unidades normalizadas de proteína para PER1.

7.1.2 Caracterización de la actividad y presencia de proteínas moduladoras de Ca²⁺ intracelular hepático después de la sincronización por alimento

Para asegurarnos que tanto la fracción RE como la MP fueron fraccionadas de manera similar en todos los grupos experimentales (tanto en todos los horarios de AL y RA, como en AY y ReA), y que los cambios que observaremos más adelante en los siguientes resultados no fueron debido a una inconsistencia entre cada muestreo, el uso de enzimas marcadoras de cada fracción celular (glucosa-6-fosfatasa para RE y 5' nucleotidasa para MP) nos ayudó a comprobar que dichas fracciones fueron obtenidas en las mismas condiciones para todos los grupos, de acuerdo al método reportado

por Jane y colaboradores (1982) (Tabla II). El índice de recuperación resultante es un valor que indica tanto el número de veces de recuperación de dicha fracción como también ayuda a comparar si entre los grupos experimentales hay homogeneidad con el fraccionamiento.

Tabla II. Índice de recuperación de RE y MP

Grupo	Enzima marcadora		
	Glucose-6-fosfatasa (RE)	5'Nucleotidasa (MP)	
AY	4.25 ± 0.48	3.43 ± 0.12	
ReA	4.12 ± 0.08	3.73 ± 0.24	
ZT0	3.90 ± 0.12	3.77 ± 0.21	
ZT3	4.01 ± 0.16	3.96 ± 0.14	
ZT6	4.08 ± 0.15	3.34 ± 0.18	
ZT9	4.31 ± 0.16	3.76 ± 0.11	
AL	ZT12	4.10 ± 0.16	3.92 ± 0.27
	ZT15	3.85 ± 0.35	3.59 ± 0.43
	ZT18	3.71 ± 0.54	4.00 ± 0.38
	ZT21	3.61 ± 0.26	3.89 ± 0.26
	ZT0	4.17 ± 0.17	4.51 ± 0.13
	ZT3	3.89 ± 0.12	3.61 ± 0.21
	ZT6	4.09 ± 0.49	3.51 ± 0.17
	ZT9	3.93 ± 0.15	3.40 ± 0.27
RA	ZT12	4.31 ± 0.09	3.98 ± 0.25
	ZT15	3.43 ± 0.06	3.87 ± 0.30
	ZT18	3.77 ± 0.12	3.28 ± 0.20
	ZT21	4.16 ± 0.10	3.73 ± 0.16

Los índices de recuperación son expresados como promedio ± ES de al menos 5 determinaciones independientes. El índice de recuperación fue calculado como la relación entre la actividad específica de cada enzima de fracción subcelular con respecto a la del homogenado total.

7.1.2.1 Ensayo de unión específica de IP_3R y RyR

El ensayo de unión específica de [3H]- IP_3 en la fracción microsomal o RE (Figura 2A) indicó cambios a lo largo del ciclo temporal en ambos grupos, pero con sus particularidades: el grupo AL presentó un claro pico de funcionamiento al inicio del periodo de oscuridad (ZT12); en contraste, el grupo RA solo mostró una discreta elevación durante la primera parte del día (entre ZT0-6), coincidente con el horario de acceso al alimento. En esta fracción celular (RE), la isoforma predominante es la tipo 1 (Gaspers y Thomas, 2005). En el caso de los grupos controles de ayuno agudo y realimentación, el grupo AY presentó un incremento en la unión de [3H]- IP_3 que al parecer se revirtió con el grupo ReA (Figura 2B). Este efecto no fue notorio en el caso de los puntos temporales ZT3 y ZT6 del grupo experimental RA, que a pesar de tener condiciones de alimentación similares (ayuno y realimentación respectivamente), tuvieron valores por debajo de los mostrados en los controles de condición de alimentación AY y ReA. En el caso del ensayo de unión específica de [3H]- IP_3 en MP, ambos grupos mostraron patrones diurnos, pero con diferencias en la hora en la que cada uno alcanza su acrofase o valor máximo (Figura 2C). Mientras que el grupo AL tiene su acrofase previo a que inicie el periodo de actividad de los animales (y con ello la alimentación), el grupo RA la muestra justo cuando recién terminaron de alimentarse, aunque con una evidente disminución en su funcionamiento, lo cual haría pensar que la participación de este receptor canal es menor a lo observado en los controles. También, el funcionamiento de este receptor en el grupo AY es mayor que el observado en ReA, pero éstos a su vez tienen

una menor actividad si se comparan con los grupos RA-ZT3 y RA-ZT6 respectivamente (Figura 2D). Estas modificaciones sugieren que hay otros elementos aparte de los periodos de ayuno-alimentación que contribuyen a modificar el funcionamiento de esta proteína.

El otro canal liberador de Ca^{2+} intracelular presente en el RE, RyR, también mostro un claro ritmo diurno en ambos grupos (Figura 2E). Sin embargo, en el grupo RA se presentan dos diferencias con respecto a lo que ocurrió con el grupo AL: 1) el acceso al alimento promovió un incremento de $\approx 80\%$ comparando entre los horarios ZT3 y ZT6 (antes y después de comer); y 2) aunque la fase de actividad máxima de RyR son similares entre RA y AL, hubo un incremento en dicho valor de 50% con respecto a lo observado en el grupo AL. No se presentaron cambios entre el grupo AY y ReA (Figura 2F). En contraste, el punto temporal de ayuno (RA-ZT3) mostró un decremento en la actividad del RyR ($\approx 30\%$) que fue revertido cuando éstos comieron (RA-ZT6).

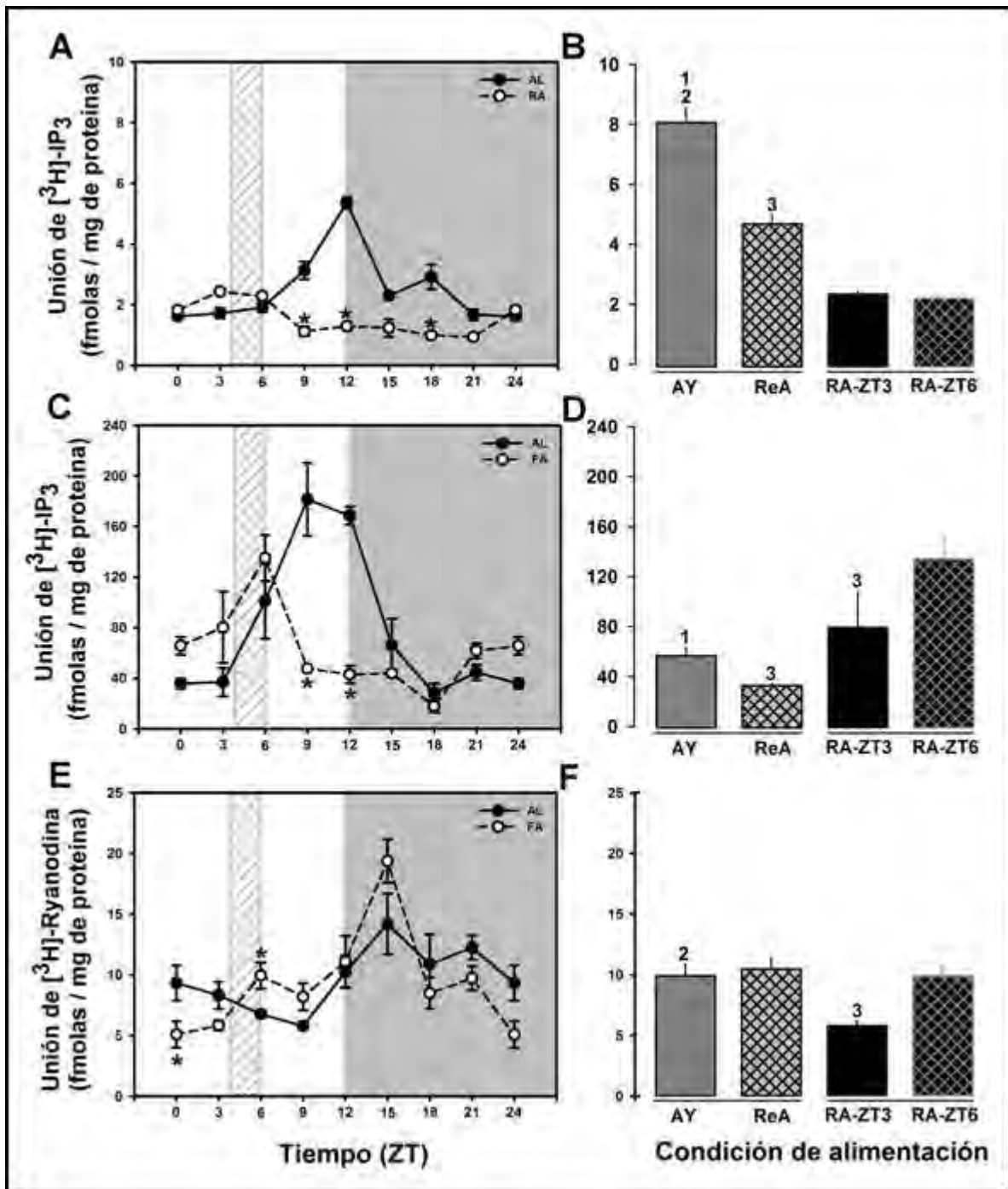


Figura 2. Ensayos de unión específica de canales intracelulares liberadores de Ca²⁺ IP₃R y RyR hepáticos bajo diferentes condiciones de alimentación. En los paneles izquierdos (A, C y E) se presentan los perfiles temporales de los ensayos de unión específica a IP₃ (en fracción RE y MP) y de RyR respectivamente. Los paneles derechos (B, D y F) muestran la comparación de los grupos controles de condición de alimentación (ayuno o AY y realimentación o ReA) comparadas con los horarios ZT3 y ZT6 del grupo experimental RA.

Los valores son promedios \pm E.S. de una n de 5 animales. Cada ensayo se realizó por triplicado. Las diferencias significativas se representaron como * ($P < 0.05$) vs el grupo AL; ¹ ($P < 0.05$) vs ReA; ² ($P < 0.05$) vs RA-ZT3 y ³ ($P < 0.05$) vs RA-ZT6. Para otros detalles de los paneles izquierdos véase la Figura 1.

7.1.2.2 Cuantificación de IP₃R1 e IP₃R2 por Western blot

Dada la vasta complejidad en la regulación de los receptores/canal IP₃R y RyR bajo condiciones *in vivo*, una estrategia alternativa para averiguar si los cambios observados en el funcionamiento de dichas proteínas se debieron a modificaciones en el número de receptores, o incluso a que hubo modificaciones específicas para alguna de las isoformas de IP₃R hepáticas, se llevaron a cabo determinaciones de la cantidad de proteínas de cada isoforma (1 y 2) mediante Western blot. Como se muestra en las Figuras 3A y 3C, la cantidad de proteínas claramente sigue los mismos patrones rítmicos que la actividad, además de también corresponder esto con lo observado en los grupos controles de condición de alimentación AY y ReA (Figuras 3B y 3F). Esto indica que el funcionamiento observado en estas proteínas, está relacionado con la cantidad de receptores presentes en estas fracciones celulares.

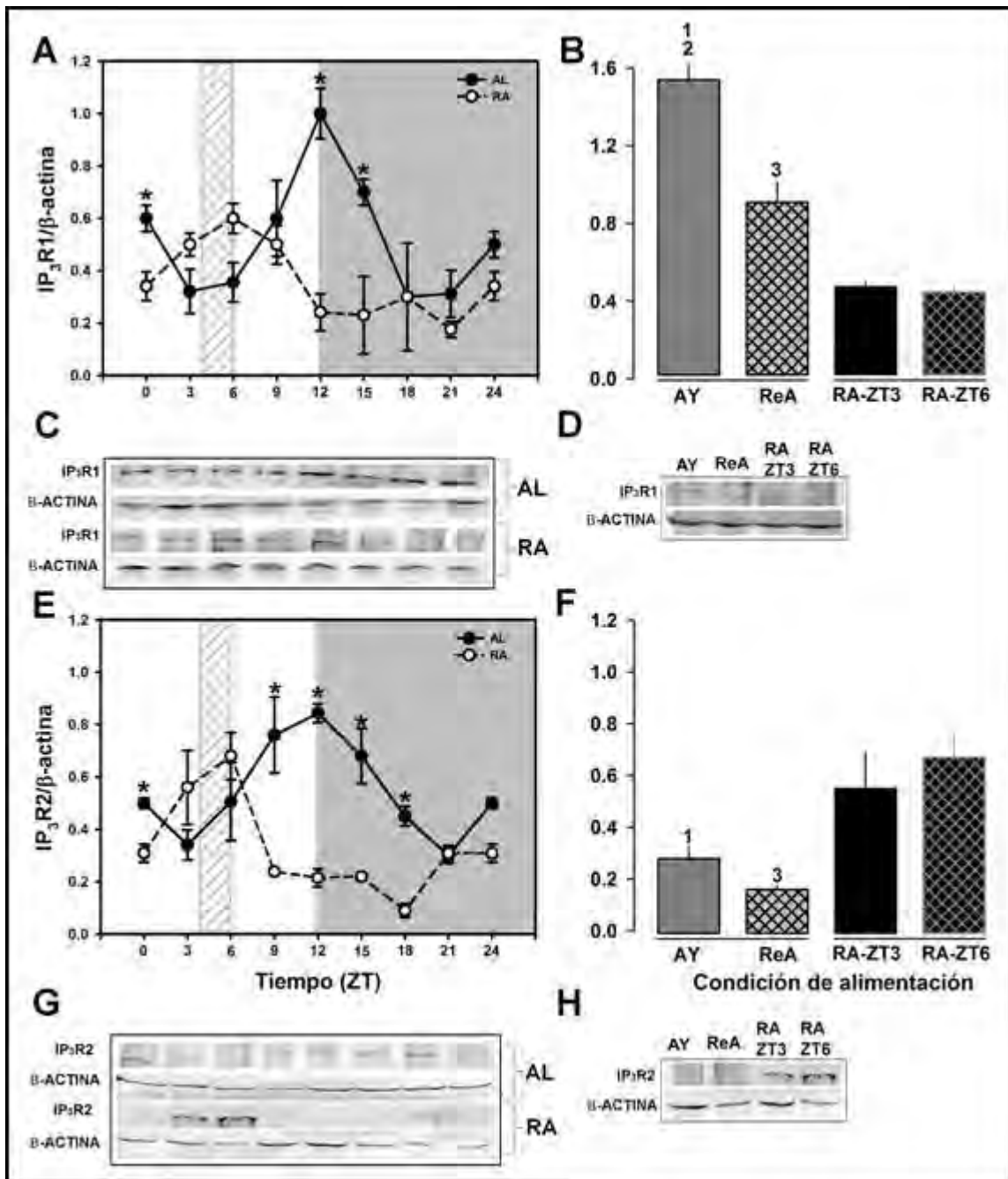


Figura 3. Cuantificación por Western blot de IP₃R1 e IP₃R2 hepáticos bajo diferentes condiciones de alimentación. En A y E se muestran los ciclos diurnos presentados por el contenido de proteína de IP₃R1 e IP₃R2 tanto en animales AL como RA. En B y F los respectivos experimentos para comparar los grupos controles de condición de alimentación vs los horarios ZT3 y ZT6 del grupo experimental RA. Los paneles C, D, G y H son inmunoblots representativos para cada tipo de experimento y su respectivo control de β-actina. Los valores son promedios ± E.S. de una n de 5 animales. Cada experimento se

repitió 2 veces. Las diferencias significativas se representaron como * ($P < 0.05$) vs el grupo AL; ¹ ($P < 0.05$) vs ReA; ² ($P < 0.05$) vs RA-ZT3 y ³ ($P < 0.05$) vs RA-ZT6. Para otros detalles véase Figura 2.

7.1.2.3 Determinación de proteína RyR hepática

Un problema con el que me enfrenté al tratar de cuantificar esta proteína, fue el hecho de que por lo menos se probaron 4 tipos distintos de anticuerpos dirigidos contra RyR para hacer el Western blot. Sin embargo, ninguno dio resultados positivos para el tejido hepático. Ya previamente mencioné que esta proteína en el hígado tiene sus peculiaridades, pero que funcionalmente está intacta (Figura 2E y 2F). En este caso, se utilizaron muestras de músculo esquelético como control positivo, para descartar que dichos anticuerpos no funcionaran adecuadamente (Figura 4E)

Una estrategia que se siguió para poder darle la vuelta a esta situación, fue utilizar muestras de RE y transferirlas tal y como se haría para un Western blot convencional, sólo que en esta etapa, se utilizó una técnica de tinción reversible conocida como de Ponceau. De esta manera fue posible detectar esta proteína de acuerdo a la coincidencia que tiene en peso molecular con el RyR presente en músculo esquelético (Figura 4C).

En la Figura 4A se muestra el perfil rítmico de esta proteína, y el cual es similar al observado en la actividad (Figura 2E). Sin embargo, es notorio que la forma de los ritmos diurnos de RyR, tanto para AL como RA, son un tanto distintos del observado para la actividad. La acrofase es ligeramente más

atrasada que la vista en la actividad, y hay una mayor diferencia en el grupo RA-ZT6 con respecto al AL-ZT6. Además, aquí si se observan diferencias entre los grupos AY y ReA (Figura 4B), lo cual sugiere que la realimentación incrementa la síntesis de esta proteína. Aunque no fue significativa, hay una tendencia similar cuando se comparan los horarios RA-ZT3 vs RA-ZT6 (antes y después de comer).

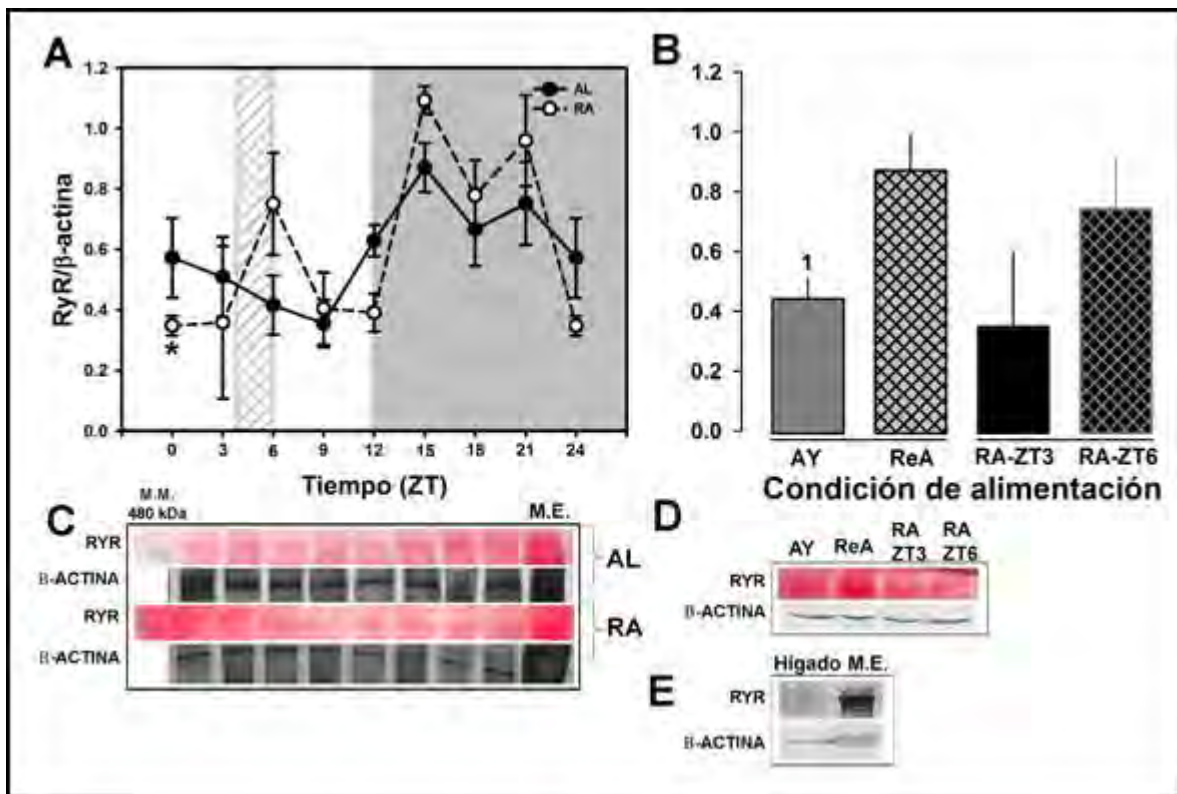


Figura 4. Determinación de proteína RyR hepática bajo diferentes condiciones de alimentación. En A se muestran los ciclos diurnos presentados por el contenido de proteína de RyR tanto en el grupo AL como RA. En B se muestra la cantidad de RyR en los grupos controles de condición de alimentación vs RA-ZT3 y RA-ZT6 respectivamente. Los paneles C y D son inmunoblots representativos para cada experimento y su respectivo control de β -actina. En E se observa un inmunoblot positivo para músculo esquelético. Los valores son promedios \pm E.S. de una n de 5 animales. Las diferencias significativas se representaron como * ($P < 0.05$) vs el grupo AL y ¹ ($P < 0.05$) vs ReA. Cada experimento se repitió 2 veces. Para otros detalles véase Figura 2.

7.1.2.4 Cuantificación de actividad enzimática de SERCA Y PMCA

Un ritmo diurno de baja amplitud fue observado en la actividad de SERCA para el grupo AL (Figura 5A). En contraste, una amplitud muy evidente se observó en el grupo RA. A este respecto, dicho patrón temporal presenta un ritmo bien definido cuya mayor actividad se presenta en la fase de luz (o reposo) de los animales. Este evento claramente asociado a la sincronización por alimento es todavía más remarcable porque no se observaron diferencias significativas entre los grupos AY vs ReA, y los puntos temporales ZT3 y ZT6 del grupo RA si son significativamente mayores que los observados en AY y ReA respectivamente (Figura 5B).

Para el caso de la actividad de PMCA, ésta muestra un difuso patrón diurno en el grupo AL, mientras que la del grupo RA resultó bifásica (Figura 5C). Además, se observa que el patrón rítmico de AL tiene una prolongada acrofase en la transición oscuridad-luz, mientras que el grupo RA presenta un segundo pico de actividad distinguible un poco antes de terminar el periodo de reposo. Por otro lado, también es resaltable que un ciclo agudo de ayuno-realimentación (AY-ReA) no modifica la actividad de la PMCA, pero esto si ocurre cuando se comparan los horarios RA-ZT3 vs RA-ZT6 (Figura 5D).

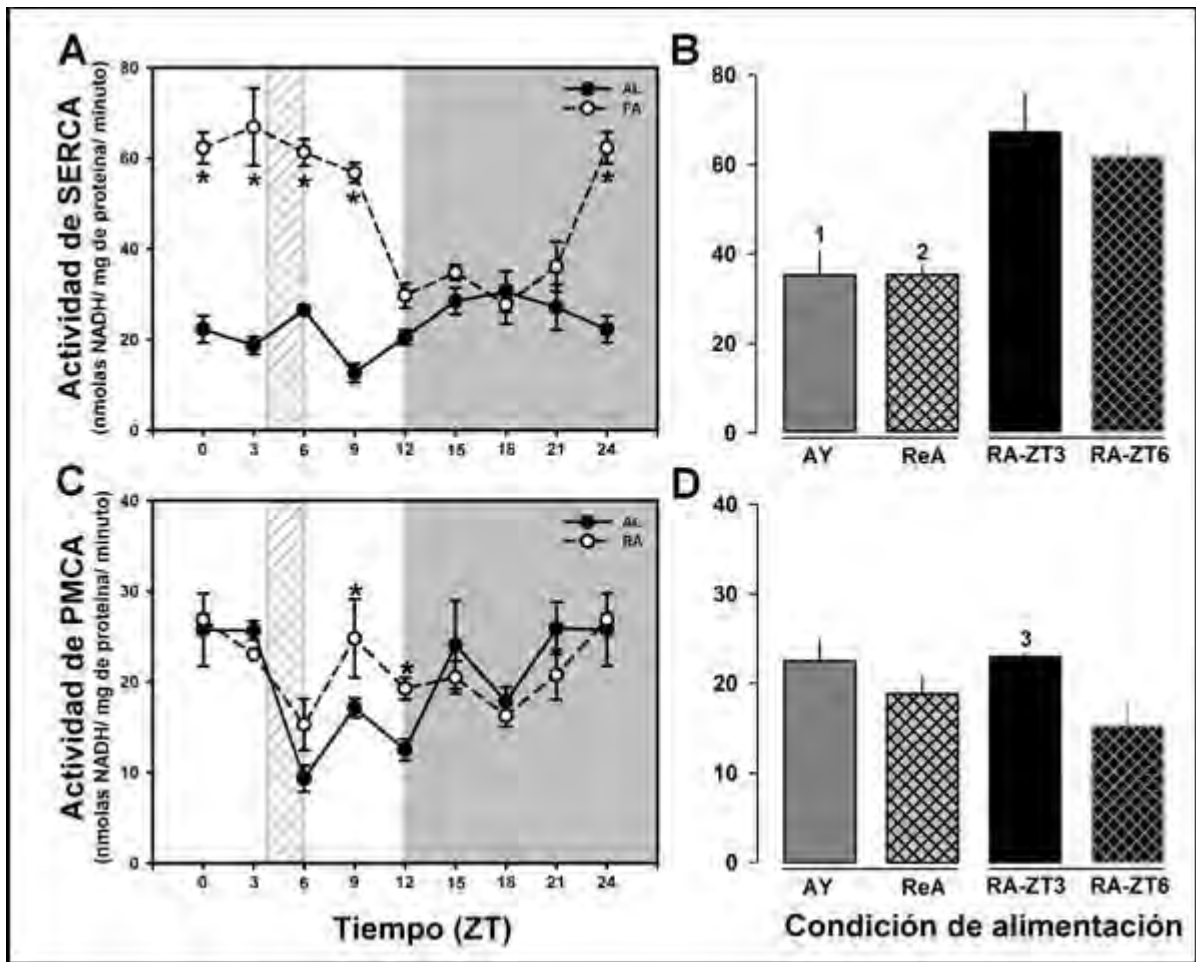


Figura 5. Actividad enzimática de SERCA y PMCA hepáticas bajo diferentes condiciones de alimentación. Actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de RE y MP cuantificada como se describió en el apartado de métodos. Los ciclos de actividad diurna de actividad de SERCA se representan en el panel A y los de PMCA en el panel B para los grupos AL y RA. En B y D se muestra la actividad enzimática de SERCA y PMCA de los grupos controles de condición de alimentación AY y ReA vs RA-ZT3 y RA-ZT6 respectivamente. Los valores son promedios \pm E.S. de una n de 5 animales. Cada experimento se repitió 2 veces. Las diferencias significativas se representaron como * ($P < 0.05$) vs el grupo AL; ¹ ($P < 0.05$) vs ReA; ² ($P < 0.05$) vs RA-ZT3 y ³ ($P < 0.05$) vs RA-ZT6. Para otros detalles véase Figura 2.

7.1.2.5 Cuantificación de SERCA2 por Western blot

Así como se llevó a cabo la confirmación de que las modificaciones debidas a lo largo del día o debidas por ciclos de ayuno-realimentación en el funcionamiento de los canales liberadores de Ca^{2+} se debían a modificaciones en la cantidad de proteína, ésta misma estrategia se siguió para las ATPasas de Ca^{2+} SERCA y PMCA.

Como se esperaba, hay una fuerte correspondencia entre el perfil diurno observado en la actividad de SERCA y la cantidad de proteína de ésta (Figura 6A). El Western blot se dirigió para la forma predominante hepática de SERCA (tipo 2), dando como resultado que tanto los perfiles temporales como también los incrementos en la actividad durante la fase de actividad de anticipación y alimentación (Figura 6B) del grupo RA se mostraran muy similares a los observados en la actividad. Esto confirma nuevamente que existen modificaciones en la presencia de estas proteínas cuando se promueve la expresión del OSA.

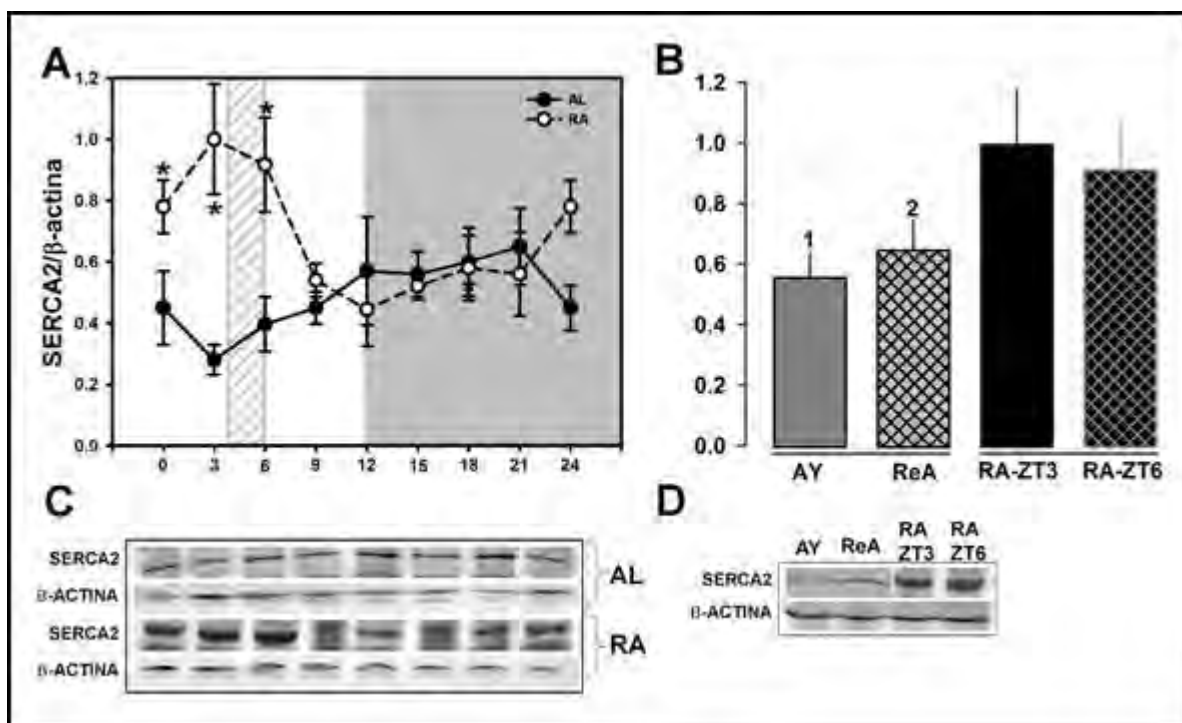


Figura 6. Cuantificación por Western blots de SERCA2 hepática bajo diferentes condiciones de alimentación. En A se muestra el patrón diurno de contenido proteico de SERCA2 presentado por los grupos AL y RA. En B se observa el contenido proteico de los grupos controles de condición de alimentación ayuno y de realimentación vs los horarios ZT3 y ZT6 del grupo experimental RA. Los paneles C y D son inmunoblots representativos de cada experimento y su respectivo control de β-actina. Los valores son promedios \pm E.S. de una n de 5 animales. Cada experimento se repitió 2 veces. Las diferencias significativas se representaron como * ($P < 0.05$) vs el grupo AL; ¹ ($P < 0.05$) vs ReA y ² ($P < 0.05$) vs RA-ZT3. Para otros detalles véase Figura 2.

7.1.2.6 Cuantificación de PMCA1 y PMCA4 por Western blot

La actividad de PMCA observada anteriormente, estaba conformada por la suma de actividades de las isoformas presentes en el hígado. A este respecto, se esperaba que entonces los irregulares patrones temporales observados en la actividad, pudieran ser explicados debido a una diferencia en los perfiles temporales de sus respectivas proteínas. No hubo un ritmo

diurno en el caso de PMCA1 en el grupo AL, pero si para el grupo RA, donde se observa que la mayor actividad está presente posteriormente a la ingesta de alimento (Figura 7A). Por otro lado, la isoforma 4 (Figura 7E) si mostró un claro ritmo en el grupo AL y también en RA. La mayor cantidad de PMCA4 en el grupo AL se presentó justo en la transición luz-oscuridad, o al término del periodo de reposo, mientras que el grupo RA lo mostro a la mitad del periodo de actividad locomotora habitual (fase de oscuridad). Ni PMCA1 ni PMCA4 coincidieron con la actividad de PMCA del grupo RA. Tampoco se presentaron diferencias entre y contra los grupos AY y ReA para ninguna de las dos proteínas (Figuras 7B y 7F).

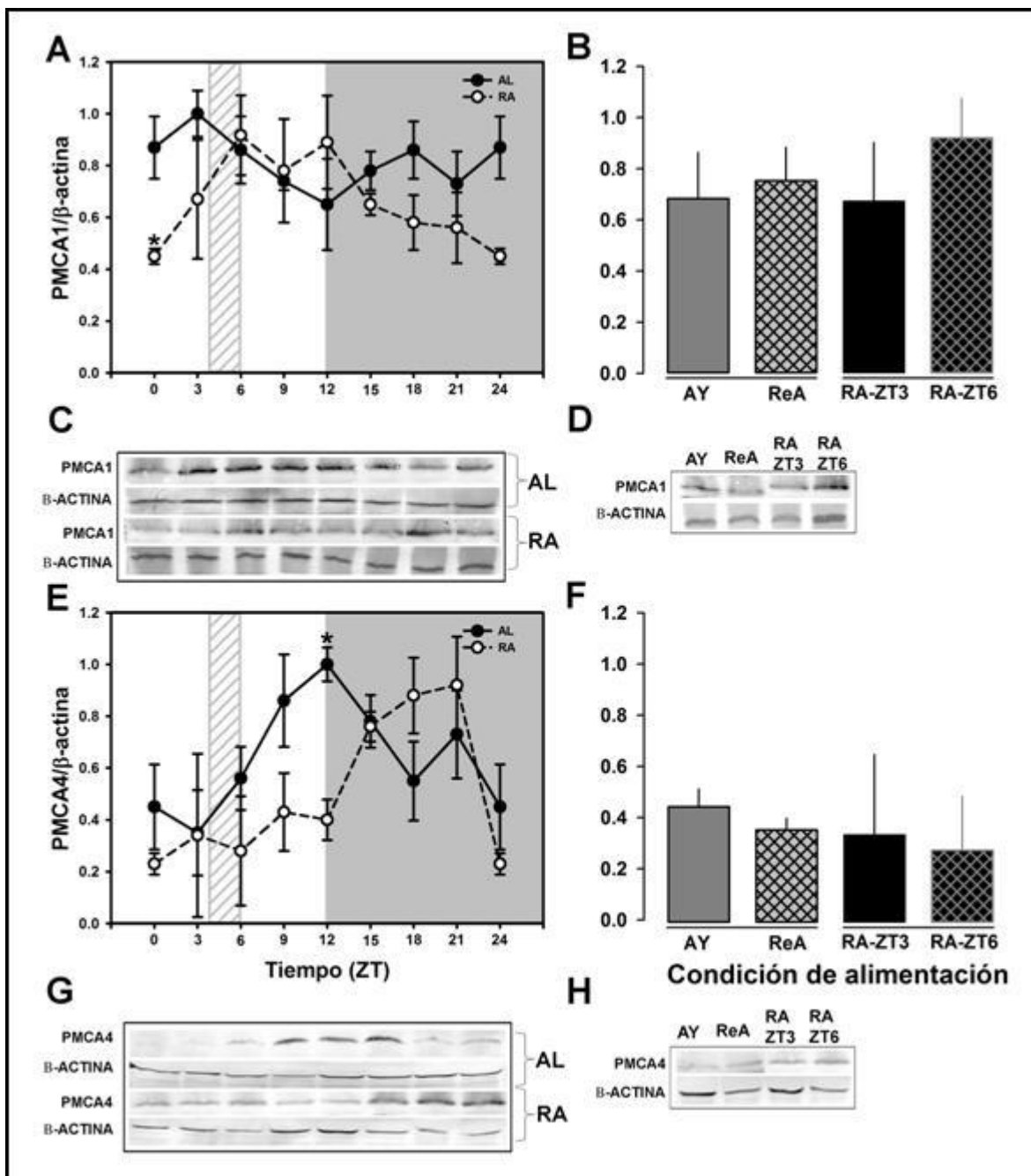


Figura 7. Cuantificación por Western blot de PMCA1 y PMCA4 hepáticas bajo diferentes condiciones de alimentación. En A y E se muestran los patrones diurnos del contenido proteico de PMCA1 y PMCA4 respectivamente presentados por los grupos AL y RA. En B y F se observa el contenido proteico de los grupos controles de condición de alimentación ayuno y de realimentación vs los horarios ZT3 y ZT6 del grupo experimental RA. Los paneles C, D, G y H son inmunoblots representativos de cada experimento y su respectivo control de β-actina. Los valores son promedios ± E.S. de una n de 5 animales. Cada experimento se repitió 2 veces. Las diferencias significativas se representaron como * ($P < 0.05$) vs el grupo AL. Para otros detalles véase Figura 2.

7.1.2.7 Análisis de COSINOR de actividad y presencia de proteína de IP₃R, RyR, SERCA y PMCA

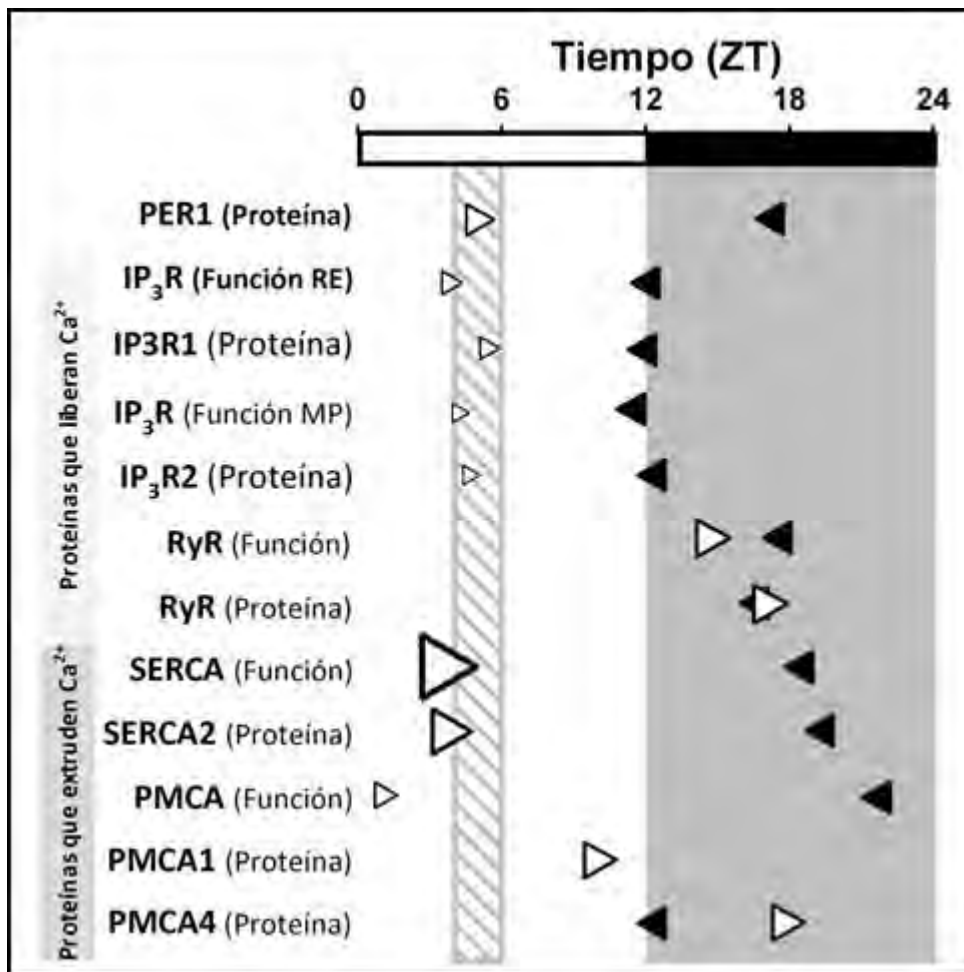
Los posibles ritmos de cada proteína estudiada en este proyecto fueron analizados de acuerdo al método de Cosinor (Tabla III). Ritmos de 24h se determinaron para prácticamente todas las proteínas estudiadas (excepto en el caso del western blot de PMCA1 del grupo AL). Como se fue describiendo previamente para cada caso, fue notorio que la sincronización por alimento impactó en la acrofase de casi todas estas proteínas (a excepción de RyR). Sin embargo, para poder ahondar más en estas diferencias, parámetros como la amplitud y el MESOR son complementarios para describir estas modificaciones causadas por el horario de restricción de alimento o RA. Resultó interesante que las acrofases de casi todos los parámetros sufrieran cambios en el grupo RA, pero aunque RyR no mostró respuesta en su acrofase, si lo hizo en su amplitud y MESOR. Además, tomemos en cuenta el efecto dramático que tuvo la sincronización por alimento en el caso de SERCA (el MESOR presentado por el grupo RA duplica al observado en el grupo AL), lo cual sugiere una mayor necesidad de la actividad de esta enzima a lo largo del día en el grupo RA. En el caso de la forma 1 de IP₃R, su MESOR sufrió un decremento de aproximadamente 50%. Tampoco se detectó un ritmo de 24 h en la actividad de PMCA en el grupo RA, lo cual orilló a intentar probar con un periodo distinto (12 h), el cual como consecuencia mostró dos acrofases (al inicio y el final de la fase de reposo).

Tabla III. Características de los ritmos diurnos en parámetros afectados por la sincronización por alimento y proteínas reguladoras de Ca²⁺ intracelular

		Acrofase ZT (h)		Amplitud		MESOR	
		AL	RA	AL	RA	AL	RA
Proteínas que liberan Ca ²⁺	IP ₃ R (Ensayo de unión RE)	12:20	04:02	1.24	0.65	2.60	1.50
	IP ₃ R1 (Western blot)	12:05	05:37	0.28	0.16	0.56	0.37
	IP ₃ R (Ensayo de unión MP)	11:40	04:22	34.6	27.5	73.6	58.0
	IP ₃ R2 (Western blot)	12:25	04:53	0.27	0.21	0.54	0.42
	RyR (Ensayo de unión)	17:43	15:01	3.23	4.45	9.71	21.7
	RyR (Proteína)	16:45	17:13	0.26	0.37	0.55	0.65
Proteínas que extruden Ca ²⁺	SERCA (Actividad)	18:35	03:51	5.36	20.9	23.2	47.4
	SERCA2 (Western blot)	19:28	04:03	0.19	0.34	0.45	0.70
	PMCA (Actividad)	21:48	01:21/11:14	6.31	2.59	19.8	21.3
	PMCA1 (Western blot)	N.D.	10:09	N.D.	0.32	N.D.	0.63
	PMCA4 (Western blot)	12:28	18:03	0.28	0.36	0.57	0.72

Los parámetros acrofase, amplitud y MESOR fueron obtenidos según lo descrito en los métodos. Los datos se determinaron de los perfiles temporales de cada parámetro en donde cada punto temporal tuvo una n=5 animales. Las unidades para la amplitud como para el MESOR para cada parámetro fueron como a continuación se describe: fmolas/mg de proteína para ensayo de unión de IP₃R (RE y MP) y RyR; nmolas NADH/min/mg de proteína para la actividad de SERCA y PMCA y unidades normalizadas de proteína para los Western blot (IP₃R1 y 2, RyR, SERCA2 y PMCA1 y 4).

Consistente con los resultados observados para PER1 (Figura 1B), los animales bajo restricción de alimento o expresión del OSA (grupo RA), mostraron claras tendencias a ajustar la fase de actividad y cantidad de proteína de los elementos principales reguladores de Ca^{2+} intracelular hepático alrededor de la hora de sincronización por alimento (ZT4-6) en



comparación con los del grupo AL (Figura 8).

Figura 8. Mapa de fases de actividad y presencia de proteína de IP₃R, RyR, SERCA y PMCA. Acrofases de proteínas reguladoras de Ca²⁺ intracelular hepático de animales bajo condiciones de libre acceso al alimento (triángulos negros) y bajo horario restringido de alimentación (triángulos blancos). El tamaño de cada triángulo para el grupo RA fue modificado para representar el número de veces en que la amplitud se modificaba en función del grupo AL.

Los patrones de actividad y presencia resumidos en la Figura 8, permiten observar que en el caso del grupo AL, se podría dar un manejo de Ca²⁺ intenso preferencialmente en el periodo habitual de actividad y alimentación (fase de oscuridad), mientras que en el caso del grupo RA, esto se invierte al horario de acceso restringido de alimentación (ZT4-6). Únicamente los IP₃R, SERCA y PMCA (su actividad) participarían durante este periodo pre y posprandial. Sin embargo, esta batería de resultados sugiere fuertemente un manejo diferencial de Ca²⁺ debido a la adaptación sufrida por

el hígado ante el fenómeno de sincronización por alimento y expresión del OSA.

7.1.2.8 Caracterización de distribución zonal hepática de IP₃R, RyR, SERCA y PMCA por inmunohistoquímica

Por último, para caracterizar mejor estas proteínas en el hígado, tanto en condiciones de libre acceso como de alimento restringido, exploramos la manera en que dichas proteínas se distribuían a lo largo del acino hepático. Dado la manera en que las diferentes proteínas reguladoras de Ca²⁺ intracelular se presentaban rítmicas a lo largo de un ciclo diurno, exploramos únicamente dos horarios (ZT3 y ZT15) para determinar la manera en que estas proteínas se presentan en las zonas periportales y pericentrales hepáticas.

Este análisis reveló que ninguna proteína tiene una distribución homogénea a lo largo del acino hepático. IP₃R1 se presentó preferencialmente en la zona pericentral en el grupo AL, mientras que en el RA todo el tiempo predominó en la zona periportal. Contrario a esto, IP₃R2 se distribuyó preferencialmente periportalmente en el grupo AL y pericentralmente en RA. RyR resultó inesperadamente con una distribución pericentral en ambas condiciones. En el caso de SERCA, ésta mostró también un incremento de su presencia en la zona periportal en ZT3 y pericentral en ZT15 en el grupo AL. La distribución fue pericentral en ambos horarios para el grupo RA. Y como era de esperarse, los complejos patrones rítmicos de actividad y proteína de PMCA también se observan en su distribución zonal:

1) PMCA1 es abundante en la zona pericentral en ZT3 y periportal en ZT15 en AL, mientras que solo aparece como periportal en ZT15 del grupo RA y 2) PMCA4 es preferencialmente abundante en la zona pericentral en ambas condiciones.

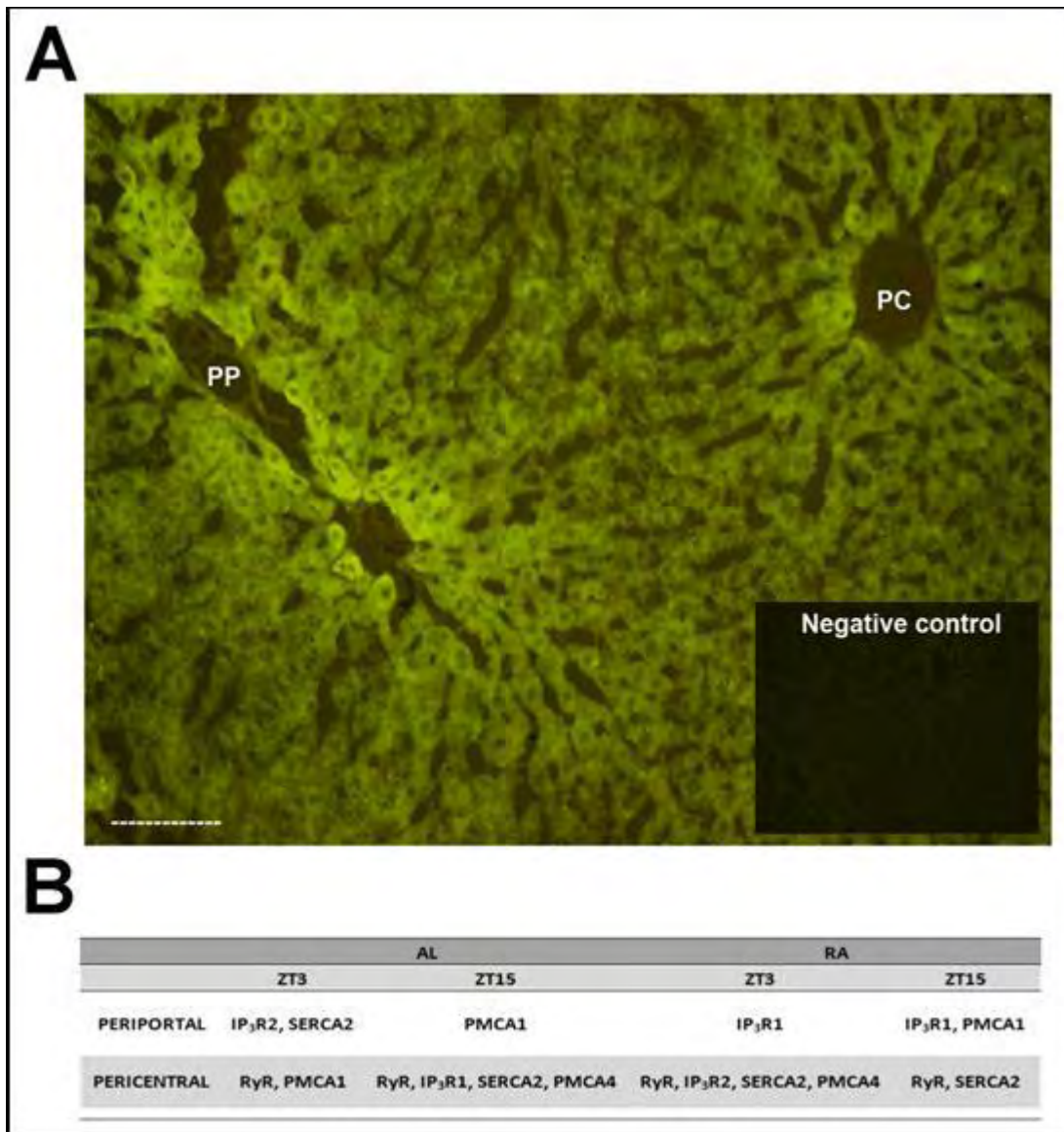


Figura 9. Distribución zonal hepática de proteínas reguladoras de la dinámica de Ca^{2+} intracelular. En A se ejemplifica la distribución intralobular de IP₃R1 (tiempo ZT3 grupo RA) utilizado como imagen representativa de la zonación hepática de esta proteína. La imagen está a un aumento de 10x. Un control negativo (ausencia de anticuerpo primario) es mostrado como inserto en A. La barra de escala indica 100 μ m. En B se observa una

tabla con un análisis semi-cuantitativo de distribución zonal hepática (periportal/pericentral) en dos horarios representativos para cada condición de alimentación (libre acceso y restricción). Estos datos representan el análisis de 10 muestras de cada grupo y horario.

7.2 EXPERIMENTO 2. Chronic inhibition of endoplasmic reticulum calcium channels and calcium-ATPase lengthens the period of hepatic clock *Per1*

El **artículo 2** (Sección Anexos) contiene la segunda fase experimental del presente proyecto, cuyo objetivo fue determinar de qué manera la alteración en el funcionamiento de proteínas reguladoras de la homeostasis de Ca^{2+} también a su vez era capaz de perturbar la ritmicidad del gen reloj *Per1*: Báez-Ruiz A and Díaz-Muñoz M. 2011. **Chronic inhibition of endoplasmic reticulum calcium channels and calcium-ATPase lengthens the period of hepatic clock *Per1***. J Circadian Rhythms, 9:7.

8. DISCUSIÓN

Ha sido ampliamente reportado que la sincronización por alimento es capaz de promover modificaciones importantes en la ritmicidad de numerosos parámetros fisiológicos. Por ejemplo, Girotti et al, (2009) reporta una serie de cambios en la expresión tanto de genes reloj como de genes relacionados con el eje hormonal hipotálamo-hipófisis-adrenal debido a cambios en los horarios de alimentación. Sin ir más lejos, numerosas estructuras en el cerebro (diferentes núcleos hipotalámicos como el lateral, ventral y dorsomedial, zonas relacionadas con conductas motivadas como el núcleo accumbens, etc.) presentan cambios en sus patrones de actividad (determinado mediante el uso de *c-fos* como indicador de actividad neuronal) debido a modificaciones en los horarios de alimentación (Ángeles-Castellanos et al, 2004). Como era de esperarse, el hígado, siendo un tejido importante en la integración de los nutrientes que son asimilados por el organismo debió a la alimentación, también presenta una serie de modificaciones en su fisiología, y que acorde con lo antes mencionado, éstas son debidas al fenómeno de sincronización por alimento. El trabajo publicado por Stokkan y colaboradores (2000), es sin duda una de las pruebas más contundentes para demostrar la manera cómo responde el tejido hepático ante los cambios en el tiempo de alimentación. En este trabajo, dándole seguimiento al patrón de expresión de la proteína reloj PER1 de animales transgénicos para la proteína reportera luciferasa, es clara la ritmicidad de dicha proteína en varios tejidos (NSQ, pulmón, músculo esquelético e hígado), pero solamente este último tejido fue capaz de responder ante un

cambio en el horario de alimentación de una manera rápida (3 días). Pero dado lo larga que pudiera ser la lista de ejemplos que hay de ritmos biológicos hepáticos que son susceptibles a ser modificados en respuesta a cambios en los horarios de alimentación, quisiera hacer la invitación a recordar los datos mencionados en el artículo 1 que les presenté anteriormente en los antecedentes.

Para validar que nuestros animales previamente sometidos a horarios de restricción de alimentación (RA) presentaron evidencias de sincronización por alimento, fueron cuantificados los niveles de corticosterona circulante y la proteína reloj PER1 en hígado por Western blot, como parámetros que confirman que nuestro protocolo experimental fue exitoso. Dichos resultados previamente fueron reportados por otros grupos de trabajo (Le Minh et al, 2001 y Lambert et al, 2006). Como se observó en la figura 1, es evidente la manera en que el perfil de ritmicidad diurna se presenta tanto para la corticosterona circulante como para PER1 hepático en animales con libre acceso al alimento (AL). Dichos animales de manera natural tienen hábitos nocturnos de alimentación, por lo cual era de esperarse que los niveles máximos de corticosterona se presentaran antes de la hora de inicio de actividad (ZT12) y que la acrofase de PER1 en hígado estuviera relacionada directamente a la hora de alimentación (ZT18). Sin embargo, como consecuencia de la sincronización por alimento, fueron evidentes los cambios presentados en la acrofase tanto de corticosterona como de PER1 hepático (véase Tabla I), lo cual confirmó que nuestras condiciones experimentales con los animales fueran las adecuadas.

Información original fue derivada de este trabajo. Primero, es importante mencionar que no hay hasta la fecha ningún reporte sobre la caracterización de los ritmos biológicos de todas estas proteínas que manejan Ca^{2+} , ni bajo condiciones de libre acceso al alimento, y menos bajo horarios de restricción de alimento. Se sabe que en NSQ oscilan de manera rítmica las proteínas RyR2, IP₃R1 e IP₃R3 (42, Hamada et al, 1998). RyR2 presenta oscilaciones circadianas y se sugiere que tiene un papel importante en la salida de este reloj (43). Algunos trabajos publicados en los últimos años demuestran el papel fisiológico que juega RyR en el tejido hepático. Pierobon et al (44), sugiere que RyR puede estar relacionado con la dotación de Ca^{2+} en la mitocondria para modular su metabolismo. López-Neblina et al (45) demostró que utilizando Dantroleno (un antagonista de RyR) se regula a la baja la expresión de TNF α , lo cual resulta en un incremento en la presencia del factor proinflamatorio interleucina 10, y subsecuentemente un evento de protección ante eventos de isquemia. También se ha reportado en un animal doble knockout para RyR1-RyR3, que el hígado presenta una acumulación excesiva de glucógeno, aún en condiciones de ayuno (Lae et al, 1998), lo cual indica que el Ca^{2+} manejado específicamente por RyR es importante para activar la vía de señalización de catabolismo de glucógeno. Ya se ha reportado sobre el papel regulador del Ca^{2+} sobre el metabolismo de esta reserva energética (Waddell et al, 1990).

Por su parte, en el NSQ, se sugiere que IP₃R tiene un papel principalmente en el proceso de sincronización (Hamada et al, 1998). En el

hígado, IP₃R tiene un papel esencial en la regulación de oscilaciones de Ca²⁺. Dado la complejidad con que las isoformas de IP₃R despliegan contrastantes propiedades en su funcionamiento, cinética y distribución espacial (intracelularmente y a lo largo del acino hepático), se sugiere que éstos tienen numerosas funciones celulares. Por ejemplo, silenciando la expresión diferencialmente de IP₃R1 y 2 mediante el uso de adenovirus con secuencias anti-sentido para cada una, resulta en una cinética de Ca²⁺ totalmente distinta: silenciar IP₃R1 disminuye la respuesta (amplitud) con que hepatocitos responden ante un estímulo como Vasopresina; por su lado, el silenciamiento de IP₃R2 causa severos efectos en la cinética de movilización de Ca²⁺ (un retraso importante en respuesta a Vasopresina) (Hernández et al, 2007). Lo anterior señala que dada la distribución apical y alta afinidad por IP₃, la isoforma 2 es importante para iniciar oscilaciones de Ca²⁺ inducidas por hormonas, mientras que la isoforma 1 estaría más involucrada en la dispersión de estos estímulos. También se ha visto con un modelo de cirrosis inducida incrementos en la expresión de IP₃R1, pero un ligero decremento de IP₃R2, lo cual también fue paralelo con el efecto de presión periportal que se usó como marcador de la severidad de la cirrosis (Dufour et al, 1999). Adicionalmente, el modelo de regeneración hepática inducida por hepatectomía señala que de toda la combinación de elementos que actúan durante la proliferación celular, los niveles de IP₃R2 disminuyen drásticamente (Magnino et al, 2000 y Nicou et al, 2007) pero RyR aumenta significativamente su presencia y función (Díaz-Muñoz et al, 1998).

En el caso de las proteínas SERCA y PMCA, éstas tienen un papel

importante en el mantenimiento de la homeostasis de Ca^{2+} intracelular. Modulan la frecuencia con que ocurren las oscilaciones de Ca^{2+} inducidas por diferentes estímulos endocrinos, y de manera importante, contribuyen a inducir patrones de liberación de Ca^{2+} por parte de IP_3R de una manera finamente regulada a lo largo del acino hepático (Delgado-Coello et al, 2006). Ambas proteínas trabajan de manera coordinada para mantener niveles basales de Ca^{2+} intracelular. No se ha identificado si contribuyen de manera distinta en la extrusión de Ca^{2+} del citosol, pero si se ha visto que cuando se induce una sobreexpresión de alguna de estas proteínas, la otra de manera recíproca disminuye su expresión, sugiriendo una comunicación entre ambos tipos de ATPasas a nivel de expresión genético (Kuo et al, 1996).

En conjunto, como se observó en la Figura 8, la actividad y presencia de estas proteínas se modifica en función de la hora de alimentación, lo cual en el hígado implica dos cosas: respuestas de adaptación preprandiales o catabólicas, y una correspondiente respuesta posprandial o de distribución de nutrientes. Esto en términos generales sería sustentado por ciclos de ayuno-alimentación, los cuales a lo largo del día generan elementos que modulan el metabolismo hacia un lado u otro. Pero a este respecto, la parte cronobiológica de estos eventos estaría detrás de la optimización de estos procesos. Por ejemplo, se sabe que los animales bajo restricción de alimento presentan un patrón de hiperfagia (en solo 2 horas consumen lo que los animales AL consumen durante toda la noche), y esto se ve reflejado en el patrón de respuesta diferencial de las proteínas que manejan Ca^{2+} en el hígado: la acrofase de IP_3R , RyR, SERCA y PMCA se presentó esencialmente

durante el periodo de actividad habitual y por ende de alimentación en el grupo AL, mientras que cambios en fase y amplitud de los ritmos de actividad y presencia de IP₃R y SERCA y de actividad de PMCA se presentaron en el grupo RA. Estas diferencias en los perfiles temporales de actividad y presencia de dichas proteínas por parte del grupo RA sugieren que durante los procesos reostáticos adoptados por el hígado durante la sincronización por alimento, hay un claro efecto sobre la regulación de estas proteínas. La otra cara de la moneda se ve reflejada en la fase experimental 2 de mi proyecto, donde la perturbación farmacológica de estas proteínas, era capaz de afectar el periodo de ritmicidad circadiana de la maquinaria molecular hepática (véase Artículo 2).

Aunado a esto, dado que las proteínas estudiadas en este trabajo no en todos los casos presentaron los mismos efectos en su actividad o presencia debido a ayunos agudos o realimentación (IP₃R, RyR y SERCA), pero si durante la RA (condición de ayuno en ZT3 y de realimentación en ZT6), entonces explicamos esto en un contexto en el que la sincronización por alimento no solo promueve cambios en la fase de actividad y presencia de estas proteínas, sino también en la manera en que estas responden a condiciones de ausencia de alimento o presencia de éste de manera distinta a los grupos AY y ReA. Por ejemplo, esto se confirma utilizando como referencia la manera en que el catabolismo de glucógeno hepático se lleva a cabo bajo todas estas condiciones de alimentación: un ayuno agudo es capaz de reducir la cantidad de glucógeno en un 80%, mientras que bajo las mismas condiciones metabólicas, pero con ayunos periódicos (grupo RA), se observa

que solo un 40% del glucógeno disponible es utilizado por el hígado, y se observa una clara preferencia por los lípidos como fuente de energía (Díaz-Muñoz et al, 2000).

Aunque previamente se había reportado que IP₃R2 presentaba una distribución heterogénea a lo largo del acino hepático (Nicou et al, ----), la distribución de RyR, SERCA y PMCA aún no estaba definidas, así como también los efectos que tenían diferentes tiempos de alimentación. En el caso de la distribución zonal de canales intracelulares y ATPasas durante acceso libre al alimento, una distribución heterogénea fue observada (Figura 9B). Una distribución heterogénea de IP₃R2 así como de receptores a hormonas tales como los de vasopresina en la zona periportal o los adrenérgicos en la zona pericentral, sugieren que dependiendo de donde éstos se localizan, es el sitio donde se da inicio las oscilaciones de Ca²⁺ y también un mayor flujo de este catión (Nicou et al, ---- 19 24 38). Otras metodologías similares en cuanto al estudio de la distribución zonal de procesos metabólicos ha sido ampliamente documentado (Jungermann y Kietzmann, 1996). Por ejemplo, regresando al ejemplo del manejo de glucógeno, se ha visto que hay diferencias importantes en el manejo de esta reserva si se habla en términos de hepatocitos periportales o pericentrales, presentando en los primeros un ritmo diurno mucho más evidente en el catabolismo de glucógeno.

Aún cuando en esta primera fase experimental no demostramos un vínculo directo entre las modificaciones observadas en actividad y función de

IP3R, RyR, SERCA y PMCA con las adaptaciones sufridas en el hígado durante ciclos habituales de alimentación o incluso durante la expresión del OSA, nuestros datos sugieren claramente que estas proteínas están bajo una regulación cronostática (termino que se describe en Aguilar-Roblero y Díaz-Muñoz, 2009), la cual es una forma de regulación en donde el tiempo es un factor determinante en la manera en que estas proteínas se presentan a lo largo del día. Estudios posteriores con el fin de explorar cómo la dinámica de Ca^{2+} se desempeña bajo condiciones de expresión del OSA en el hígado son necesarios para poder confirmar que nuestros resultados actuales impactan sobre la dinámica del manejo de este segundo mensajero.

En conjunto, nuestros resultados revelan una fina regulación en la maquinaria que regula la señalización de Ca^{2+} bajo condiciones de sincronización por alimento a diferentes niveles: función, cantidad de proteína y distribución de éstas a lo largo del acino hepático. Dada la manera en que se presentaron los cambios en la fase de actividad y presencia de estas proteínas durante la expresión del OSA, entonces esto resulta en un indicativo de que la cinética de señalización de Ca^{2+} en el hígado es profundamente afectada dependiendo de la hora de alimentación, y lo cual impacta de manera importante en la fisiología y cronobiología de este tejido integrador metabólico.

9. CONCLUSIONES

1. Modificaciones en la actividad de los principales elementos que modulan Ca^{2+} intracelular sugieren cambios en la dinámica de calcio intracelular.
2. Tanto la condición alimentaria como el factor tiempo juegan un papel importante en la manera en que dichas proteínas ejercen su trabajo.
3. Cabe destacarse que la proteína que respondió de manera más evidente a la sincronización por alimento fue SERCA (acrofase, MESOR y amplitud). Sin embargo, los cambios observados en las otras proteínas, aunque más discretos, sugieren profundos cambios en el manejo de calcio intracelular.
4. Interesante resultó la heterogeneidad que muestra la distribución acinar de estas proteínas independientemente del tratamiento o condición. Pero aún más importante fue que debido a estas dos condiciones, la distribución de estas proteínas resultó más compleja de lo esperado.
5. Sin duda la cuantificación y seguimiento de Ca^{2+} intracelular es fundamental para entender de manera más clara la participación de éste en las adaptaciones fisiológicas hepáticas adoptadas durante la expresión del OSA.
6. Los efectos observados en la periodicidad de PER1::LUC indican que el Ca^{2+} intracelular es un factor de señalización que tiene un papel

importante en la manera en que el hígado regula la ritmicidad de dicho gen reloj.

7. Se encontraron diferencias en la manera en que los fármacos afectaron a PER1::LUC dependiendo de si el hígado provenía de animales alimentados ad libitum o bajo restricción de alimento, lo cual sugiere que durante la expresión del OSA, también se presenten modificaciones en la manera en que se maneja la señalización de Ca^{2+} intracelular.
8. Los datos obtenidos en esta segunda etapa del proyecto se correlacionan bien con lo obtenido en la fase bioquímica, y concuerdan en la hipótesis en que durante la expresión del OSA en el hígado, éste tejido sufre adaptaciones a varios niveles, incluida la homeostasis de Ca^{2+} intracelular en respuesta a la manera en que se combinan tanto los procesos bioquímico como los cronobiológicos.
9. Estos datos en conjunto proveen evidencia de la importancia que tiene la regulación diaria en el manejo de este segundo mensajero y que a su vez puede sustentar la adaptación necesaria para que las variaciones circadianas en procesos fisiológicos en el hígado como el metabolismo ocurran de manera organizada en función del tiempo y la disponibilidad del alimento.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ⌚ Aguilar-Roblero R, García Hernández F, Aguilar R, Arankowsky-Sandoval G & Drucker-Colín R. 1986. Suprachiasmatic nucleus transplant function as an endogenous oscillator only in constant darkness. *Neurosci Lett*, 69: 47-52.
- ⌚ Aguilar-Roblero R, Mercado C, Alamilla J, Laville A, Díaz-Muñoz M. Ryanodine receptor Ca²⁺ release channels are an output pathway for the circadian clock in the rat suprachiasmatic nuclei. *Eur J Neurosci* 2007; 26:575-582.
- ⌚ Aguilar-Roblero R y Díaz-Muñoz M. 2010. Chronostatic adaptations in the liver to restricted feeding: The FEO as an emergent oscillator *Sleep Biol Rhythms* 2010; 8: 9–17
- ⌚ Ángeles-Castellanos M, Aguilar-Roblero & Escobar C. 2004. c-Fos expression in hypothalamic nuclei of food-entrained rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286: R158-R165.
- ⌚ Ángeles-Castellanos M, Mendoza J, Díaz-Muñoz M & Escobar C. 2005. Food entrainment modifies the c-Fos expression pattern in brain stem nuclei. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R678-R684.
- ⌚ Badiu C. 2003. Genetic clock of biological rhythms. *J Cel Mol Med*. 7:408-416.
- ⌚ Balsalobre A, Maecacci L, Schibler U: Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured rat-1 fibroblast. *Curr Biol* 2000, 10:1291-1294.
- ⌚ Barrit GJ, Chen J, Rychkov GY: Ca²⁺-permeable channels in the hepatocyte plasma membrane and their roles in hepatocyte physiology. *Biochem Biophys Acta* 2008, 1783:651-672.
- ⌚ ¹Baéz–Ruiz, A, Luna-Moreno, D, Vázquez-Martínez, O, Ramírez-Salcedo, J, & Díaz-Muñoz, M. 2005. The food entrainable oscillator studied by DNA

microarrays: What is the liver doing during the food anticipatory activity? *Biological Rhythm Research*. 36: 83-97.

⌚ ²Baéz–Ruiz, 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-G1023.

⌚ Bergner A, Huber RM: Regulation of the endoplasmic reticulum Ca²⁺-store in cancer. *Anticancer Agents Med Chem* 2008, 8:705-709.

⌚ Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL: Calcium signalings: dynamics, homeostasis and remodeling. *Nature Mol Cell Biol* 2003, 4:517-529.

⌚ Berthoud HR. 2004. Anatomy and function of sensory hepatic nerves. *Anat Record Part A*. 280A:827-835.

⌚ Blum ID, Lamont EW y Abizaid A. 2011. Competing clocks: metabolic status moderates signals from the master circadian pacemaker. *Neurosci Biobehav Rev*. Jun 12.

⌚ Brewer M, Lange D, Baler R & Anzulovich A 2005. SREBP-1 as a transcriptional integrator of circadian and nutritional cues in the liver. *J Biol Rhythms* 20:195-205.

⌚ Chen J, Tao R, Sun H, Tse H, Lau C, Li G: Multiple Ca²⁺ signaling pathways regulate intracellular Ca²⁺ activity in human cardiac fibroblasts. *J Cell Physiol* 2010, 223:68-75.

⌚ Choi JH, Jo H, Hong JH, Lee S y Shin DM. 2008. Alteration of expression of Ca²⁺ signaling proteins and adaptation of Ca²⁺ signaling in SERCA2^{+/-} mouse parotid acini. *Yonsei Med J*. 49(2): 311-321.

⌚ Chu A, Díaz-Muñoz M, Hawkes MJ, Brush K, Hamilton SL: Ryanodine as a probe for the functional state of the skeletal muscle sarcoplasmic reticulum calcium release channel. *Mol Pharmacol* 1990, 37:735-741.

⌚ Clair C, Tran D, Boucherie S, Claret M, Tordlmann T, Combettes L. Hormone receptor gradients supporting directional Ca^{2+} signals: direct evidence in rat hepatocytes. *J Hepatol* 2003; 39:489-495.

⌚ Colwell CS: Circadian modulation of calcium levels in cells in the suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* 2000, 12:571-576.

⌚ Damiani E, Tobaldin G, Volpe P, Margreth A. Quantitation of ryanodine receptor of rabbit skeletal muscle, heart and brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1991; 175:858-865.

⌚ Davidson A & Stephan FK. 1999. Feeding-entrained circadian rhythms in hypophysectomized rats with suprachiasmatic nucleus lesions *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 277:R1376-R1384.

⌚ Davidson A, Cappendijk SLT & Stephan FK. 2000. Feeding-entrained circadian rhythms are attenuated by lesions of the parabrachial region in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278:R1296-R1304.

⌚ ¹Davidson A, Aragona BJ, Werner RM, Schroeder E, Smith JC & Stephan FK. 2001. Food anticipatory activity persists after olfactory bulb ablation in the rat. *Physiol Behav* 72:231-235.

⌚ ²Davidson A, Aragona BJ, Houpt TA & Stephan FK. 2001. Persistence of meal-entrained circadian rhythms following area postrema lesions in the rat. *Physiol Behav* 74:349-354.

⌚ Davidson AJ, Poole AS, Yamazaki S, Menaker M: Is the food-entrainable oscillator in the digestive system? *Genes Brain Behav* 2003, 2:32-39.

⌚ Davidson A, Castañón-Cervantes O & Stephan FK. 2004. Daily oscillations in liver function: diurnal vs circadian rhythmicity. *Liver Int* 24: 179-186.

⌚ Davidson A. 2009. Lesion studies targeting food-anticipatory activity. *Eur J Neurosci*, 30:1658–1664.

⌚ Delalande JM, Milla PJ & Burns AJ. 2004. Hepatic nervous system development. *Anat Record Part A*. 280A:848-853.

⌚ Delgado-Coello B, Trejo R y Mas-Oliva J. 2006. Is there a specific role for the plasma membrana Ca^{2+} -ATPase in the hepatocytes? *Mol Cell Biochem.* 30:1-15.

⌚ Díaz-Muñoz M, Cañedo-Merino R, Gutiérrez-Salinas J, Hernández-Muñoz R. Modifications of intracellular calcium release channels and calcium mobilization following 70% hepatectomy. *Arch Biochem Biophys* 1998; 349:105-112.

⌚ Díaz-Muñoz M, Dent M, Granados-Fuentes D, Hall AC, Hernández-Cruz A, Harrington M, Aguilar-Roblero R. Circadian modulation of the Ryanodine receptor type 2 in the SCN of rodents. *Neuroreport* 1999; 10:481-486.

⌚ Díaz-Muñoz M, Vázquez-Martínez O, Aguilar-Roblero R y Escobar, C. 2000. Anticipatory changes of liver metabolism and entrainment of insulin, glucagon and corticosterone in food-restricted rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 279:R48-R56.

⌚ Díaz-Muñoz M, Vázquez-Martínez O, Báez-Ruiz A, Martínez-Cabrera G, Soto-Abraham MV, Avila-Casado MC y Larriva-Sahd J. 2010. Daytime food restriction alters liver glycogen, triacylglycerols, and cell size. A histochemical, morphometric, and ultrastructural study. *Comp Hepatol.* 23;9:5.

⌚ Ding JM, Buchanan GF, Chen D, Kuriashkina L, Faiman LE, Alster JM, McPherson PS, Campbell KP, Gillette MU: A neural ryanodine receptor mediates light-induced phase delays of the circadian clock. *Nature* 1998, 394:381-384.

⌚ Duguay D, Cermakian N: The crosstalk between physiology and circadian clock proteins. *Chronobiol Int* 2009, 26:1479-1513.

⌚ Eckel-Mahan K, Sassone-Corsi P: Metabolism control by the circadian clock and vice versa. *Nature Struct Mol Biol* 2009, 16:462-467.

⌚ Escobar C, Díaz-Muñoz M, Encinas F y Aguilar-Roblero R. 1998. Persistence of metabolic rhythmicity during fasting and its entrainment by restricted

feeding schedules in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1998; 274:R1309-R1316.

⌘ Escobar C, Mendoza J, Salazar-Juárez A, Ávila J, Hernández-Muñoz R, Díaz-Muñoz M y Aguilar-Roblero R. 2002. Rats made cirrhotic by chronic.CCl4 treatment still exhibit anticipatory activity to a restricted feeding schedule. *Chronobiology Int.* 19:1073-1086.

⌘ Fricke U. Tritosol: a new scintillation cocktail based on triton X-100. *Anal Biochem* 1975; 63:555-558.

⌘ Friedman MI, Horn CC & Ji H. 2005. Peripheral signal in the control of feeding behavior. *Chem Senses.* 30:i182-i183.

⌘ Fuller PM, Lu J, Saper CB: Differential rescue of light – and food-entrainable circadian rhythms. *Science* 2008, 320:1074-1077.

⌘ Furiuchi T, Simon.Chazottes, Fujino I, Yamada N, Hagesawa M, Miyawaki A, Yoshikawa S, Guenét JL, Mikoshiba K. Widespread expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 gene (Insp₃R1) in the mouse central nervous system. *Receptors Channels* 1993; 1:11-24.

⌘ Gasbarrini A, Borle AB, Caraceni P, Colantoni A, Farghali H, Trevisani F, Bernardi M, van Thiel DH. Effect of ethanol on adenosine trisphosphate, cytosolic free calcium, and cell injury in rat hepatocytes. Time course and effect of nutritional status. *Dig Dis Sci* 1996; 41:2204-2212.

⌘ Gaspers LD y Thomas AP. 2005. Calcium signaling in the liver. *Cell Calcium.* 38:329-342.

⌘ Golombek DA. 2002. Introducción: la máquina del tiempo. En *Cronobiología humana. Ritmos y relojes biológicos en la salud y la enfermedad principios.* Comp. Golombek DA. Universidad Nacional de Quilmes Ediciones. Argentina. 19-31.

⌘ Golombek DA & Yannielli PC. 2005. Organización del sistema circadiano en mamíferos. En *Manual de Cronobiología: principios y aplicaciones.* Eds.

Madrid JA, Sánchez-Vázquez M & Rol de Lama MA. Universidad de Murcia. España. 45-66.

⌚ Goto K, Laval-Martin DL, Edmunds LN: Biochemical modeling of an autonomously oscillatory circadian clock in *Euglena*. *Science* 1985, 228:1284-1288.

⌚ Gou H, Brewer JM, Champhekar A, Harris R & Bittman EL. 2004. Differential control of peripheral circadian rhythms by suprachiasmatic-dependent neural signals. *PNAS* 102: 3111-3116.

⌚ Guido ME & de la Iglesia H. 2002. Bases moleculares de la cronobiología. En *Cronobiología humana. Ritmos y relojes biológicos en la salud y la enfermedad principios*. Comp. Golombek DA. Universidad Nacional de Quilmes Ediciones. 43-66.

⌚ Hamada T, Liou SY, Fukushima T, Maruyama T, Watanabe S, Mikoshiba K, Ishida N: The role of Inositol trisphosphate-induced Ca^{2+} release from IP_3 receptor in the rat suprachiasmatic nucleus on circadian entrainment mechanism. *Neurosci Lett* 1999, 263(2-3):125-128.

⌚ Hamada T, Niki T, Ziging P, Sugiyama T, Watanabe S, Mikoshiba K, Ishida N: Differential expression patterns of Inositol trisphosphate receptor types 1 and 3 in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 1999, 838(1-2):131-135.

⌚ Hamilton SL, Mejía-Alvarez R, Fill M, Haweyes MJ, Brush KL, Schilling WP, Stefani E. [3H]PN200-110 and [3H]ryanodine binding and reconstitution of ion channel activity with skeletal muscle membranes. *Anal Biochem* 1989; 183:31-41.

⌚ Harms E, Kivimäe, Young MW, Saez L: Posttranscriptional and posttranslational regulation of clock genes. *J Biol Rhythms* 2004, 19:361-373.

⌚ Harper AE. Glucose-6-phosphate activity measurement. In: Bergmeyer H, ed. *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press, 1965: 788-792.

⌚ Harrisingh MC, Wu Y, Lnenicka GA, Nitabach MN: Intracellular Ca²⁺ regulates free-running circadian clock oscillations *In Vivo*. J Neurosci 2007, 27:12489-12499.

⌚ Harrisingh MC, Nitabach MN. Integrating circadian timekeeping with cellular physiology. Cell 2008; 320:879-880.

⌚ Hasegawa K, Kikuchi H, Ishizaki S, Tamura A, Tsukahara Y, Nakaoka Y, Iwai E, Sato T: Simple fluctuation of Ca²⁺ elicits the complex circadian dynamics of cyclic AMP and cyclic GMP in *Paramecium*. J Cell Sci 1999, 112(Pte 2):201-207.

⌚ Hirata K., Dufour JF., Shibao K., Knickelbein R., O'Neill AF., Bode HP., Cassio D., St-Pierre MV., LaRusso NF., Leite MF., y Nathanson MH. 2002. Regulation of Ca²⁺ signaling in rat bile duct epithelia by Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms. Hepatology. 36:284-296.

⌚ Hirata K, Puhl T, O'Neill AF, Dranoff y Nathanson MH. 2002. The type II Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor can trigger Ca²⁺ waves in rat hepatocytes. Gastroenterology. 122:1088-1100.

⌚ Honma K y Honma S. 2009. The SCN-independent clocks, methamphetamine and food restriction. Euro J Neurosci, 30: 1707–1717.

⌚ Iijama M, Yamaguchi S, van der Horst GTJ, Bonnefont X, Okamiura H & Shibata S. 2005. Altered food-anticipatory activity in *Cryptochrome*-deficient mice. Neuroscience Res. 52:166-173.

⌚ Ikeda M, Sugiyama T, Wallace CS, Gompf HS, Yoshioka T, Miyawaki A, Allen C. Circadian dynamics of cytosolic and nuclear Ca²⁺ in single suprachiasmatic nucleus neurons. Neuron 2003; 38:253-263.

⌚ Ji H, Friedman MI. 1999. Compensatory hyperphagia after fasting tracks recovery of liver energy status. Physiol Behav. 68:181-186.

⌚ Janicki PK, Wise PE, Belous AE, Pinson CW. Interspecies differences in hepatic Ca²⁺-ATPase activity and the effect of cold preservation on porcine liver Ca²⁺-ATPase function. Liver Transpl 2001; 7:132-139.

- ⌚ Jungermann K, Kietzmann T. 1996. Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annu Rev Nutr.* 16:179-203.
- ⌚ Kalsbeek A, La Fleur S, Van Heijningen C & Buijs RM. 2004. Suprachiasmatic GABAergic inputs to the paraventricular nucleus control plasma glucose concentrations in the rat via sympathetic innervation of the liver. *J Neurosci* 24:7604-7613.
- ⌚ Khalsa SB, Ralph MR, Block GD: The role of extracellular calcium in generating and in phase-shifting the *Bufo* ocular circadian rhythm. *J Biol Rhythms* 1993, 8:125-139.
- ⌚ Ko CH, Takahashi JS: Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet* 2006, 15:R271-R277.
- ⌚ Kupfermann I. 1991. Hypothalamus and limbic system: peptidergic neurons, homeostasis, and emotional behavior. En *Principles of neural science*. Ed. Kandel E, Schwartz JH y Jessell TM. Appleton & Lange. E.U. 456-467.
- ⌚ Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680–685.
- ⌚ Lahm A, Uhl M, Lehr HA, Ihling C, Kreuz PC, Haberstroch J. Photoshop-based image analysis of canine articular cartilage after subchondral damage. *Arch Orthop Trauma Surg* 2004; 124:431-436.
- ⌚ Lambert CM, Weaver DR. Peripheral gene expression rhythms in a diurnal rodent. *J Biol Rhythms* 2006; 21: 77-79.
- ⌚ Lamia KA, Sachdeva UM, DiTacchio L, Williams EC, Alvarez JG, Egan DF, Vasquez DS, Juguilon H, Panda S, Shaw RJ, Thompson CB, Evans RM: AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. *Science* 2009, 326:437-440.

⌚ Lamont EW, Renteria Díaz L, Barry-Shaw, Stewart J & Amir S. 2005. Daily expression feeding rescues a rhythm of *period2* expression in the arrhythmic suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 132:245-248.

⌚ Landry GJ, Yamakawa GR, Webb IC, Mear RJ, Mistleberger RE: The dorsomedial hypothalamic nucleus is not necessary for the expression of the circadian food-anticipatory activity in rats. *J Biol Rhythms* 2007, 22:467-478.

⌚ Langhans W. 1996. Role of the liver in the control of eating: what we know – and what we do not know. *Neurosci Biobehav Rev.* 20:145-153.

⌚ Le Minh N, Damiols F, Tronche F, Shütz G, Schibler U. Glucocorticoid hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral circadian oscillators. *EMBO J* 2001; 20:7128-7136.

⌚ Leite MF., Dranoff JA., Gao L., y Nathanson MH. 1999. Expression and subcellular localization of the ryanodine receptor in rat pancreatic acinar cells. *Biochem J.* 337:305-309.

⌚ López-Neblina F, Toledo-Pereyra LH, Toledo AH, Walsh J. Ryanodine receptor antagonism protects the ischemic liver and modulates TNF- α and IL-10. *J Surg Res* 2007; 140:121-128.

⌚ Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275.

⌚ Luna-Moreno D, Vázquez-Martínez O, Báez-Ruiz A, Ramírez J y Díaz-Muñoz M. 2007. Food restricted schedules promote differential lipoperoxidative activity in rat hepatic subcellular fractions. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 146(4):632-43.

⌚ Lundkvist GB, Kwak Y, Hajime T, Block G. A calcium flux is required for circadian rhythm generation in mammalian pacemaker neurons. *J Neurosci* 2005; 25:7682-7686.

⌚ Lynch R. 2004. Brain and behavior. En <http://www.colorado.edu/intphys/intphys3730rlynch/>. University of Colorado. E.U.

- ⌚ Martínez-Merlos MT, Ángeles-Castellanos M, Díaz-Muñoz M, Aguilar-Roblero R & Escobar C. 2003. Dissociation between adipose tissue signals, behavior and the food-entrained oscillator. *J Endocrinol* 181:53-63.
- ⌚ Martínez-Merlos MT, Ángeles-Castellanos M, Díaz-Muñoz M, Aguilar-Roblero R, Mendoza J y Escobar C. 2004. Dissociation between adipose tissue signals, behavior and the food-entrained oscillator. *J Endocrinol*.181:53-63.
- ⌚ Mendoza J, Ángeles-Castellanos & Escobar C. 2005. Differential role of the accumbens shell and core subterritories in food-entrained rhythms of rats. *Behav Brain Res* 158:133-142.
- ⌚ Menaker M, Takahashi JS, Eskin A: The physiology of circadian pacemakers. *Ann Rev Physiol* 1978, 40:501-526.
- ⌚ Mistlberger RE. 1994. Circadian food anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev*. 18:171-195.
- ⌚ Mistlberger RE. 2009. Food-anticipatory circadian rhythms: concepts and methods. *Eur J Neurosci*. 30:1718–1729.
- ⌚ Mistlberger RE. 2011. Neurobiology of food anticipatory circadian rhythms. *Physiol Behav*. 26:104(4):535-45.
- ⌚ Nagata J, Guerra MT, Shugrue CA, Gomes DA, Nagata N y Nathanson MH. 2007. Lipid rafts establish calcium waves in hepatocytes. *Gastroenterology*. 133:256-267.
- ⌚ Nakahara K, Fukui K & Murakami N. 2004. Involvement of thalamic paraventricular nucleus in the anticipatory reaction under food restriction in the rat. *J Vet Med Sci* 66:1297-1300.
- ⌚ Nicou A, Serriere V, Hilly M, Prigent S, Combettes L, Guillon G, Tordjmann T. Remodelling of calcium signaling during liver regeneration in the rat. *J Hepatol* 2007; 46:247-256.

⌚ Nomura K, Takeuchi Y, Yamaguchi S, Okamura H, Fukunaga K: Involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the induction of mPer1. *J Neurosci Res* 2003, 72:384-392.

⌚ Ogawa H & Ansai Y. 1995. Diurnal rhythms of rat liver serine dehydratase, D-site binding protein, and 3-hydroxy-3-methylglutryl coenzyme A reductase mRNA levels are altered by destruction of the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus. *Arch Biochem Biophys* 321:115-122.

⌚ Oh-hashii K, Naruse Y, Tanaka M: Intracellular calcium mobilization induces *period* genes via MAP kinase pathways in NIH3T3 cells. *FEBS Lett* 2002, 516(1-3):101-105.

⌚ Oishi K, Kasamatsu M H & Ishida N. 2004. Gene-and tissue-specific alterations of circadian clock gene expression in streptozotocin-induced diabetic mice under restricted feeding. *Biochem Biophys es Com* 317:330-334.

⌚ Pezuk P, Mohawk JA, Yoshikawa T, Sellix MT, Menaker M: Circadian organization is governed by extra-SCN pacemakers. *J Biol Rhythms* 2010, 25:432-442.

⌚ Pierobon N, Renard-Rooney DC, Gaspers LD y Thomas AP. 2006. Ryanodine receptor in the liver. *J Biol Chem*. 10:34086-34095.

⌚ Pittendrigh C, Daan S: A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. *J Comp Physiol* 1976, 106:223-252.

⌚ Precabarren MP, Váldez JL, Farías P, Serón Ferré M & Torrealba F. 2005. Differential effects of infralimbic cortical lesions on temperature and locomotor activity response to feeding in rats. *Neuroscience* 134:1413-1422.

⌚ Poon AMS, Choy EHY & Pang SF. 2001. Modulation of blood glucose by melatonin: a direct action on mechanism receptors in mouse hepatocytes. *Biol Signals and Receptors* 10:367-379.

⌚ Püschel GH. 2004. Control of hepatocyte metabolism by sympathetic and parasympathetic hepatic nerves. *Anat Record Part A*. 280A:854-867.

- ⌚ Ralph MR, Foster RG, Davis FC GH & Menaker M. 1990. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247: 975-978.
- ⌚ Rawson NE, Ji H, Friedman MI. 2003. 2,5-D-mannitol increases hepatocyte calcium: implications for a hepatic hunger stimulus. *Biochem Biophys Acta*. 1642:59-66.
- ⌚ Richter HG, Torres-Fárfan C, Rojas-García PP, Campino C, Torrealba F & Serón-Ferré M. 2004. The circadian timing system: making sense of day/night gene expression. *Biol Res* 37:11-28.
- ⌚ Rutter J, Reick M & McKnight S. 2002. Metabolism and the control of circadian rhythms. *Ann Rev Biochem* 71:307-331.
- ⌚ Rutter J, Reick M Wu LC & McNight SJ. 2001. Regulation of *Clock* and *NPAS2* DNA binding by the redox state of NAD cofactors. *Science* 293:510-514.
- ⌚ Saborido A, Salgado J, Megías A. Measurement of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase activity and E-type Mg^{2+} -ATPase activity in rat heart-homogenates. *Anal Biochem* 1999; 268:79-88.
- ⌚ Sakamoto K, Nagase T, Fukui H, Horikawa K, Okada T, Tanaka H, Sato K, Miyake Y, Ohara O, Kako K & Ishida N. 1998. Multitissue circadian expression of rat *period* homolog (*rPer2*) mRNA is governed by the mammalian circadian clock, the suprachiasmatic nucleus in the brain *J Biol Chem* 273:27030-27042.
- ⌚ Schibler U, Ripperger JA & Brown SA. 2001. Chronobiology-reducing time. *Science* 293:437-438.
- ⌚ Silver R, Lesauter J, Tresco P & Lehman MN. 1996. A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature* 382: 810-813.
- ⌚ SiNae P, Perone E, & Silver R. 2003. Food-entrainment circadian rhythms are sustained in arrhythmic *Clk/Clk* mutant mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285: R57-R67.

- ⌚ Sosniyenko S, Parkanová D, Illnerová H, Sládek M, Sumová A: Different mechanisms of adjustment to a change of the photoperiod in the suprachiasmatic and liver circadian clocks. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010, 298: R959-R971.
- ⌚ Stokkan KA, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y & Menaker M. 2001. Entrainment of the liver circadian clock in the liver by feeding. *Science* 291: 490-493.
- ⌚ Treiman M, Caspersen C, Christensen SB: A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Trends Pharmacol Sci* 1998, 19:131-135.
- ⌚ Turek FW & Allada R. 2002. Liver has rhythm. *Hepatology* 35:743-745.
- ⌚ Uhlén P, Fritz N: Biochemistry of calcium oscillations. *Biochem Biophys Res Commun* 2010, 396:28-32.
- ⌚ Um JH, Yang S, Yamazaki S, Kang H, Viollet B, Foretz M, Chung JH: Activation of 5'-AMP-activated kinase with diabetes drug metformin induces casein kinase I epsilon (CKIepsilon)-dependent degradation of clock protein mPer2. *J Biol Chem* 2007, 282:20794–20798.
- ⌚ Uyama N, Geerts A, & Reynaert H. 2004. Neural connections between the hypothalamus and the liver. *Anat Record Part A*. 280A:808-820.
- ⌚ Xu X, Hotta CT, Dodd AN, Love J, Sharrock R, Lee YW, Xie Q, Johnson CH, Webb AA: Distinct light and clock modulation of cytosolic free Ca^{2+} and rhythmic Chlorophyll A/B binding protein 2 promoter activity in Arabidopsis. *Plant Cell* 2007, 19:3474-3490.
- ⌚ Yagita K, Yamaguchi S, Tamanini F, van der Horst GT, Hoeijmakers JH, Yasui A, Loros JJ, Dunlap JC, Okamura H: Dimerization and nuclear entry of mPer proteins in mammalian cells. *Genes Develop* 2000, 14:1353-1363.
- ⌚ Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block GD, Sakaki Y, Menaker M, Tei H: Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 2000, 28:682-685.

⌚ Widnell CC, Unkeless JC. Partial purification of a lipoprotein with 5' nucleotidase activity from membranes of rat liver cells. Proc Natl Acad Sci USA 1968; 61:1050-1057.

⌚ Wojcikiewicz RJ. 1995. Type I, II, and III Inositol ,4,5-trisphosphate receptors are unequally susceptible to down-regulation and are expressed in markedly different proportions in different cell types. J Biol Chem. 270(19): 11678-11683.

⌚ Wu T, Jin Y, Ni Y, Zhang D, Kato H, Fu Z: Effects of light cues on re-entrainment of the food-dominated peripheral clocks in mammals. Gene 2008, 419(1-2):27-34.

11. ANEXOS

ARTÍCULO 1

Báez-Ruiz A, Luna-Moreno AD, Vázquez-Martínez O, and Díaz-Muñoz M. 2009. ***Feeding as a regulator of biochemical circadian rhythms in the liver***, publicado en “Comparative aspects in circadian rhythms” y editado por Dra. María L. Fanjul y Dr. Raúl Aguilar R, Ed. Transworld Research Network, India.

ARTÍCULO 2

Báez-Ruiz A and Díaz-Muñoz M. 2011. **Chronic inhibition of endoplasmic reticulum calcium channels and calcium-ATPase lengthens the period of hepatic clock *Per1***. J Circadian Rhythms, 9:7.

Transworld Research Network
37/661 (2), Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India



Comparative Aspects of Circadian Rhythms, 2008: 000-000 ISBN: 978-81-7895-329-8
Editors: María Luisa Fanjul-Moles and Raúl Aguilar Roblero

9

Feeding as a regulator of biochemical circadian rhythms in the liver

**Germán Adrián Báez-Ruiz, Alma Dalia Luna-Moreno
Olivia Vázquez-Martínez and Mauricio Díaz-Muñoz**

Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, UNAM, Querétaro, QRO., México

Abstract

For most species, meal conditions in natural habitats usually represent a serious challenge for survival. To clarify the factors involved in the regulation of hunger and satiation, it is necessary to understand the underlying processes that are responsible for food intake behavior and feeding physiology. In this context the liver plays a relevant role since it integrates nutrient metabolism and xenobiotic detoxification and is also associated with initiating a primary immune reaction known as the acute phase response. associated with initiating a

Correspondence/Reprint request: Dr. Mauricio Díaz-Muñoz, Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, UNAM-Juriquilla, Apartado Postal 1-1141, Querétaro, QRO. 76001 México. E-mail: mdiaz@inb.unam.mx

primary immune reaction known as the acute phase response. Indeed, the hepatic organ is a recognized modulator of the hunger-satiety cycle. Liver physiology also displays circadian rhythms which are driven by the so-called clock genes. Moreover, it has been reported that circadian rhythmicity in the liver is entrained by food. The aim of the present chapter is to review basic concepts related with the role of the liver in the physiology of food intake, the hepatic circadian rhythmicity, and its modulation by food ingestion, as well as to discuss examples of metabolic disorders that can originate with alterations in the timing system.

Introduction

A general property present in all organisms is to seek an optimal adaptation of their physiological parameters to the prevalent environmental conditions. By natural selection, populations that are successful in this adaptative quest are the ones able to transmit their genetic pools to future generations. To accomplish this process, it is essential to find and assimilate enough nutrients to fulfill reproductive demands. Many of the main behaviors displayed by organisms are directed to obtaining food. Hence, appropriate feeding habits and an efficient feeding physiology are parameters subject to tight evolutionary constraints.

In natural ecosystems, finding food or overcoming fasting periods means the difference between living or dying. Predators and prey show diverse strategies to get food and to avoid being eaten. A tactic that is frequently used by the prey, such as rodents, birds, and fishes, is to remain in large groups to confuse their hunters (1-3). Some animals have switched to nocturnal feeding, apparently to reduce the risk of being caught by diurnal predators (3).

Food availability is another constraint, since environmental conditions such as time of day serve to indicate the best occasion to look for food. For example, honeybees (*Apis mellifera*) exhibit high foraging activity during the peak of daily floral nectar rhythms (4). Also, filter-feeders such as bivalves follow daily rhythms in their valve opening. This pattern seems to be related to the tidal periodicity, which correlates with food availability (5). In this context, precise anticipation of food availability is a determinant for survival in all organisms, from bacteria to mammals.

Most of the time, food availability is uncertain and stressful. Hence, organisms have developed diverse strategies to optimize handling of metabolic energy stores during prolonged periods of starvation (from days to months). Bears, mustelids, woodchucks, squirrels, bats, penguins, or even frogs and snakes, can resist long fasting episodes by adopting diverse physiological responses such as a decreased metabolic rate, selective mobilization of lipid stores, reduced gastrointestinal activity or hibernation (6-13). Hibernation is

characterized by decreased metabolic activity and body temperature. This state is an excellent alternative for animals that live in habitats where food is seasonally scarce, since it is more convenient to save energy by keeping metabolism at a minimum than to expend energetic resources searching for food in unfavorable conditions (14).

The ultimate goal of food intake is to obtain energy to maintain ongoing metabolic and physiological processes. The metabolic rate depends on body mass; for example, hummingbirds and shrews have high energy demands due to their accelerated metabolism and small size, and they cannot survive for more than a few hours without food (15, 16). Those animals need to search constantly for nourishment. Hence, metabolic homeostasis involves at least two levels of integration: The first has to do with the nutritional requirements needed for an organism to accomplish optimally its growth and development (long-term regulation); the second is function of the adaptive mechanism of fasting-feeding cycles to maintain the levels of circulating glucose needed by the brain and other glucose-dependent tissues (short-term regulation) (17).

It is in this context that rhythmical patterns in metabolic activity, physiological processes, and behavioral have arisen to fulfill optimally the nutritional requirements by allowing the organisms to foresee the availability of food, and to be metabolically prepared for an effective digestive process. This anticipation helps to coordinate the timing system and the digestive system, both of which are essential for survival.

Usually, the timing system relies on a principal biological clock localized in the hypothalamic suprachiasmatic nuclei (SCN) (18). This pacemaker is synchronized by light, and the timing of a variety of peripheral clocks is subordinated to the SCN (19). Sleep/activity, reproduction, and feeding are some of the behaviors regulated by the SCN (20). However, when food availability is restricted to a specific and shorter-than-usual time of the day, a different clock is expressed (21, 22). This oscillator responds to meal access and is named the Food-Entrainable Oscillator (FEO). In this case, the food serves to entrain the circadian rhythms of the peripheral oscillators, including that of the liver (23-25). The expression of the FEO is independent of the SCN and light synchronization (26), and its anatomical localization as well as underlying physiological processes are still not well understood.

The present manuscript reviews the key role played by the liver, a principal component in the coordination between the digestive and timing systems, and contains four main sections: 1) Hepatic contribution to the physiology and behavior associated with food intake; 2) Molecular events in the liver that synchronize the correct handling of nutrients under different physiological conditions; 3) Representative biochemical and physiological hepatic adaptations during the expression of the FEO, and 4) Liver metabolic abnormalities which have impact on chronobiological organization.

Feeding physiology

Feeding involves the consumption of the necessary nutrients to allow the synthesis of the major biomolecules such as proteins, carbohydrates, lipids, and nucleic acids. The processing of nutrients is carried out by two types of metabolic reactions:

1. Catabolism represents a set of oxidative reactions that simplify complex molecules, simultaneously producing metabolic energy. As a consequence of this oxidative process, electrons are transferred to the redox couple NAD^+/NADH (nicotine adenine dinucleotide). NADH feeds the mitochondrial electron transport chain to promote the synthesis of ATP, the main energetic molecule of the cell.
2. Anabolism is the set of metabolic reactions that allow the formation of biomolecules and their polymers. The biosynthetic reactions take place by consuming ATP, and the flow of electrons is used to reduce a variety of metabolites, with NADPH as the main electron-donor molecule. Depending on the tissue, the principal metabolic reactions that produce NADPH are the pentose phosphate pathway (PPP) and the malic enzyme.

Interestingly, these two redox reactions proceed simultaneously. Their proportion depends on the energetic demands and is regulated by endocrine and neural signals. Furthermore, anabolism and catabolism occur in different cellular compartments to avoid biochemical interference. For example, fatty acid degradation is localized mainly in mitochondria and peroxisomes, whereas fatty acid biosynthesis takes place in the cytosol.

Metabolic reactions in all organs are in a steady-state equilibrium when the nutrient supply is maintained. This condition involves the cycle between two physiological states: fasting and feeding. The first is present prior to the food intake and induces physiological adaptations that mobilize energetic stores and activate the search for food. The second entails the metabolic adaptations after food intake that replenish the energy deposits and sustain the behaviors associated with growth or reproduction.

Fasting state

Before feeding, animals experience a sensation known as hunger. During this condition, they are in a state of elevated arousal, explained in terms of food-seeking behavior (27). This state is also characterized by a catabolic tendency that mobilizes fuel storage molecules. If fasting persists several hours, for example during sleep, two mechanisms are activated by the lack of glucose, which is required to support metabolism in vital tissues such as the brain and the heart (28).

The first process activated consists of glycogen cleavage (glycogenolysis) into glucose. Glucose-6-phosphatase (G6Pase) is a key enzyme for maintaining constant levels of blood glucose, since it hydrolyzes glucose-6-phosphate (from glycogen degradation) into glucose and inorganic phosphate (29). Glucose is then released into the blood mainly by the liver and muscular tissue, but also by the kidney and the gut. Glycogen breakdown is stimulated by glucagon and catecholamines, which are hormones synthesized in the pancreatic α -cells and the medulla of the adrenal glands, respectively. Glucagon secretion is stimulated by glucose-sensitive sympathetic fibers that sense a decrease in blood glucose concentration (30), whereas catecholamines are secreted probably in response to a stressful stimulus associated with the fasting condition (31).

The other glucose-producing process, gluconeogenesis, uses lactate and amino acids as the main substrates to maintain circulating glucose levels during fasting or vigorous exercise. Gluconeogenesis occurs predominantly in the liver under normal conditions and ensures a continuous supply of glucose for red blood cells and the central nervous tissues, systems that cannot metabolize fatty acids. The last step of glycolysis is the conversion of phosphoenolpyruvate (PEP) to pyruvate, a reaction catalyzed by pyruvate kinase (PK). Under normal conditions, the liver PK reaction is irreversible, so an alternate pathway for converting pyruvate back into PEP is required for continual glucose production. This is accomplished by two enzymatic steps: conversion of pyruvate to oxaloacetate (OAA) catalyzed by pyruvate carboxylase (PC), followed by conversion of OAA to PEP catalyzed by phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK). This latter reaction is commonly considered the control point for liver gluconeogenesis, which is regulated by circulating hormones to match systemic glucose demand (32). Levels of glucagon and glucocorticoids increase during fasting, stimulating the up-regulation of C/EBP $_{\alpha}$ (CAAT-Enhancer Binding Protein) as well as C/EBP $_{\beta}$, which are transcription factors that induce expression of gluconeogenic enzymes in liver (17).

Because they are limited, glycogen deposits may be depleted by prolonged fasting or a few hours of intense physical activity. In this case, lipid reserves are mobilized to supply energy for the organism. Lipids are concentrated mainly in adipose tissue in the abdominal cavity and subcutaneous sites in the form of triacylglycerides. Adipocytes take up glucose and fatty acids and transform them into triacylglycerides (17). When there is no food and the glycogen has been completely consumed, sympathetic stimulation promotes the metabolism of triacylglycerides into fatty acids and glycerol (33). Both metabolites are transformed in the liver, fatty acids into ketone bodies by ketogenesis, and glycerol into glucose by gluconeogenesis. Especially ketone

bodies are used by the central nervous system during prolonged fasting conditions (34).

Feeding state

When the organisms are fed, some nutrients are converted into stored material, which can be used both short and long term. The main storage molecules to be used quickly are carbohydrates. During the absorptive state, glucose is produced mainly in the liver by glycogenolysis and gluconeogenesis. This action is enhanced by sympathetic nerves and requires substrates such as glycerol, provided by lipolysis in the white adipose tissue (WAT), gluconeogenic amino acids such as alanine, and lactate produced by glycolysis, the latter two both from skeletal muscle (17). These processes occur because eating does not immediately resolve the problem of nutrient shortage. The meal needs to be chewed, swallowed, processed in the stomach, and absorbed by the intestine. These events require some time to be completed, especially in the case of lipids, which are not absorbed directly by the portal system but must first be packaged into chylomicrons by intestinal cells to circulate in the lymphatic system (35). After the postprandial state, glucose is removed from the circulation by the liver, where it is stored as glycogen or turned into pyruvate by glycolysis (36). In a coordinated manner, the pancreas secretes the hormone insulin, which is produced and released by the β -cells. Initially, insulin is released in the cephalic phase of the digestive process, when the food is just presented, by stimulation of the peripheral nervous system. Later, when the food is absorbed, increased levels of blood glucose directly stimulate additional insulin secretion (37).

Hunger signals

What are the mechanisms that motivate the ingestion of food? Basically, food intake is regulated by hunger and satiety signals that are generated in peripheral organs (such as the gastrointestinal tract, adipose tissue, and liver). These signals are interpreted by the brain, which in turn controls the animal's behavior and energetic homeostasis. For many years, researchers have recognized the important role played by the brain in food intake behavior. Lesions in different hypothalamic structures such as ventromedial and lateral nuclei cause hyperphagia and aphagia, respectively. For this reason, they are known as appetite and satiety centers (38). But these observations do not answer the question of where the hunger-satiety signals originate.

Many theories of hunger discuss the possible role of peripheral organs. Mayer's glucostatic theory postulated that food intake is triggered by sensing the drop in blood glucose levels. He proposed the existence of glucoreceptors that were concentrated in the brain and were responsive to insulin effects (39).

This idea was corroborated by administering to the brain the non-metabolizable glucose analogue, 2-deoxyglucose (2DG), which increased food intake and suggested that acute glucoprivation provides the signal to start eating. Russek's hepatostatic theory considers the liver to be the sensor of glucose changes and the origin of hunger signals (40). Other theories have been postulated based on different stimuli: gastric emptying, lipostatic and aminostatic models, and a thermostatic theory. The ischymetric theory proposes that the energetic charge is a driving force to elicit food intake (41).

Another interesting theory suggests that hunger is based on the capacity of the liver to oxidize lipids. According to this theory, when blood glucose is low, a sympathetic stimulus is sent to the adipose tissue to release fatty acids. The fatty acids reach the liver and are converted into ketone bodies, which are used by the brain as energy molecules. Drugs that inhibit fatty acid oxidation (methyl palmoxirate, etomoxir, or mercaptoacetate) administered into the hepatic portal vein promote significant fatty acid catabolism, which is interpreted as a hunger signal (42).

The techniques of molecular biology techniques have improved our understanding of feeding physiology. The molecular characterization of dozens of neuropeptides involved in food intake has allowed to establish their anatomical locations and their roles in the hunger-satiety cycle. Mutants and knockout animals have been used as models to enhance the effects of the absence of these chemical signals. In addition, the pharmacological administration of hormones and neuropeptides to distinct brain areas provides valuable information about the physiology of feeding.

The sensation of hunger, which involves the search for food to replenish depleted fuel stores, has been associated with the action of certain peptides. Among these peptides, only one is present in the gastrointestinal tract (ghrelin), while Neuropeptide Y, orexins, galanin, agouti-related peptide, and melanin-concentrating hormone are produced post-translationally from proopiomelanocortin (POMC), mainly in hypothalamic structures such as the arcuate and lateral hypothalamic nuclei (43-48).

Satiety signals

The mechanisms of hunger and satiety are not necessarily the same. There are two main mechanisms for satiety: In the brain, it depends on the ventromedial nuclei, and in the gastrointestinal tract it involves gastric distention and release of gut signals. The sensation of satiety reflects the suppression of hunger signals that coincide with the replenishment of the body's energy reserves. Many of these signals arise from the pancreas and other organs of the gastrointestinal tract. The signals reach the brain through the vagus nerve or by the blood circulation. Examples of these messengers are

the gut cholecystokinin, the glucagon-like peptide 1, the peptide YY, the stomach enterostatin peptide, the pancreatic hormones insulin and amylin, the leptin (peptide) secreted by adipose tissue, and some neuropeptides such as melanin stimulating hormone alpha (MSH- α) and bombesin family members (gastrin-releasing peptide and neuromedin B) synthesized in the hypothalamic nucleus (43-48).

Vagal afferents seem to be critical for visceral reports of hunger and satiety directed to the brain, since the majority of the peptides and hormones released by peripheral tissues do not cross the blood brain barrier. On the other hand, many of the neuropeptides involved in satiety signals have an effect on liver and gastrointestinal tissues that express the appropriate receptors (49). In this complex context, the important role played by the liver as a hunger-satiety regulator and in the physiology of food intake is beyond doubt (50-53).

Liver and feeding

It is also well established that the liver is a vital organ for the processing and metabolic handling of nutrients. Synthesis and mobilization of glycogen (glycogenesis and glycolysis), formation and degradation of fatty acids (beta reduction and oxidation), synthesis of glucose from non-glycosidic sources (gluconeogenesis), processing of fatty acids to form acetoacetate and β -hydroxybutyrate (ketogenesis), maintenance of glucose concentration in blood (glucemia), formation of cholesterol, synthesis and delivery of purines and pyrimidines, handling of nitrogen-containing compounds (urea cycle), and the assembly and delivery of lipoproteins are some of the most important biochemical and physiological activities that take place in the liver in preparation for and in response to feeding (54). In this section we will focus on new molecules and events that modulate metabolic activity, energy balance, the feeding and fasting responses, and the connection between circadian rhythms and nutrient handling in the liver.

AMP-dependent protein kinase (AMPK)

In the liver and other organs, AMPK is activated by feeding, and it promotes utilization of nutrients. This enzyme regulates key metabolic pathways in response to the energy status of the cell. The main task of AMPK is to switch cells between antagonistic processes: from a state of active ATP utilization (anabolic biosynthetic reactions) to a state of active ATP production. Moreover, it is exquisitely regulated by energy charge, as well as by hormones and nutrients. Regulatory activity by AMPK is divided in two types: one that is rapidly installed and affects the equilibrium of metabolic pathways by selective phosphorylation of rate-limiting enzymes is known as short-term regulation; the other, which alters the activity of transcriptional

factors thereby modulating both gene expression and protein synthesis, is known as long-term regulation (55).

AMPK is a heterotrimeric protein composed of one catalytic (with a typical serine/threonine kinase domain) and two regulatory subunits. Several isoforms have been reported for each subunit, and the liver has equal amounts of the catalytic subunits $\alpha 1$ and $\alpha 2$. The regulatory β subunits contain a myristoylation site that allows reversible attachment to membranes, as well as a glycogen-binding domain, which is closely related to the isoamylase N-domain subfamily. The proximity of AMPK to glycogen stores permits a rapid adaptation of its activity to changes in metabolic demands. The γ subunits contain a 60-amino-acid nucleotide-binding region similar to the one reported for cystathionine β -synthase. This CBS domain, also known as the Bateman domain, occurs in tandem pairs that have been found in a variety of proteins from bacteria, archaea, and eukaryotes. By way of this domain, AMP activates AMPK. Mutations in the $\gamma 2$ subunit have been linked to Wolff-Parkinson-White syndrome, a disorder of glycogen storage accompanied by cardiac hypertrophy and arrhythmia (56).

To be active, AMPK needs to be phosphorylated at threonine 172 of the α subunit. Calcium-calmodulin kinase phosphorylates AMPK in response to increased calcium, whereas the threonine kinase LKB1 activates AMPK during stressful conditions. AMP can activate AMPK in two ways: it interacts directly at a stimulatory allosteric site of the γ subunit, and it blocks dephosphorylation of AMPK by phosphatases. This means that a modest increase in AMP can induce a dramatic activation of AMPK. Receptors coupled to phospholipase C γ and to adipose tissue cytokines also activate AMPK. Phosphocreatine acts as a negative allosteric regulator of AMPK, as does a high glycogen content (57).

The main organs in which AMPK activity regulates glucose and lipid metabolism are liver, skeletal and cardiac muscles, adipose tissue, and pancreas. The targets of AMPK phosphorylation include: acetyl-CoA carboxylase, hydroxy-methyl glutaryl CoA reductase, hormone-sensitive lipase, glycerophosphate acyltransferase, malonyl-CoA decarboxylase, glycogen synthase, and creatine kinase. Therefore, the effects of AMPK are exerted over all aspects of energy homeostasis including glycogen, cholesterol, and phosphocreatine metabolism. AMPK also influences the activation of some genes, affecting the expression of a number of glycolytic and lipogenic enzymes in the liver and adipose tissue, such as the hepatic isoform of pyruvate kinase, fatty acid synthase, and acetyl-CoA carboxylase. In addition, AMPK reduces the amount of the transcription factor SREBP, which is a key regulator of the expression of numerous lipogenic enzymes. Another transcription factor that is down-regulated by AMPK is the hepatocyte nuclear

factor 4a (HNF4a), which regulates the expression of hepatic genes such as GLUT2 and pyruvate kinase (58).

Sirtuins

Sirtuins are a family of proteins (from silent information regulator) regulated by dietary habits and first known by their ability to influence lifespan in multiple model organisms (59). Recently, sirtuins have been also associated with regulation of energy balance and control of intermediary metabolism. Two principal enzymatic activities, both dependent on the redox coenzyme NAD⁺, have been described for sirtuins: Histone deacetylation and ADP-ribosyltransferase. Both activities are similar, in that they involve the cleavage of NAD⁺ in their catalytic cycle. Sirtuins have also been implicated in the cellular mechanism by which calorie restriction (CR) can extend the lifespan of every organism tested to date.

So far, seven isoforms of sirtuins have been identified in mammals. They are present at diverse cellular locations, target multiple substrates, and affect a broad range of cellular functions such as cell survival, cell cycle, thermogenesis, insulin secretion, DNA repair, etc. Sirtuin 1 is the most extensively studied; it is located in the nucleus and plays a significant role in the oxidative stress response in tissues with high metabolic activity, including the liver. In this organ, sirtuin 1 regulates the activities of the nuclear factors peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) and its co-activator (PGC α), promoting the expression of gluconeogenic enzymes and the repression of glycolytic genes in the liver during fasting. This action is important in the control of blood glucose (glucemia) in response to nutrient availability. Interestingly, in sirtuin 1 KO mice CR does not cause any increase in physical activity, which is a very characteristic behavior of wild mice subjected to food insufficiency (60).

Sirtuin 6 is a nuclear protein widely expressed in rodent tissues, including liver. Although it shows a very weak deacetylase activity, it has a robust ADP-ribosyltransferase activity. Sirtuin 6 KO animals show premature aging due to a deficiency in one specific form of DNA repair. In addition, mice without sirtuin 6 expression present low levels of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and a marked hypoglycemia, which is more pronounced with age (61).

Another sirtuin of nuclear localization and very abundant in the liver is sirtuin 7. This sirtuin localizes in the nucleolus, and it controls the synthesis of ribosomal RNA and, therefore, the generation of ribosomes. Recent work has shown that sirtuin 7 regulates cellular growth and responds to changing metabolic conditions (61).

Sirtuin 2 is present in both the cytoplasm and nucleus, but it is mainly associated with α -tubulin and other cytoskeletal proteins. It has been suggested

that sirtuin 2 is important in several tissues, including hepatocytes, where it blocks entry into the cell cycle (62).

Sirtuins 3, 4, and 5 are localized within mitochondria. Since these organelles are essential to provide the cell with energy, to mediate apoptosis in response to oxidative stress and DNA damage, and to generate reactive oxygen species (ROS), the mitochondrial localization of these sirtuins is intriguing, because mitochondrial dysfunction has been associated with aging and several degenerative diseases (62).

Sirtuin 3 is present in the mitochondrial matrix, and shows deacetylase activity upon cleavage of its signal sequence. Sirtuin 3 is induced by cold exposure, and its overexpression increases mitochondrial respiration while decreasing ROS production. Sirtuin 3 deacetylates acetyl-CoA synthetase, thereby activating this enzyme, which converts ATP, acetate, and CoA into acetyl-CoA; acetyl-CoA, in turn, feeds into the tricarboxylic acid cycle and is also required for fatty acid and cholesterol synthesis. Therefore, the role played by sirtuin 3 under conditions of energy limitations, such as fasting and calorie restriction, is to facilitate incorporation of dietary or ketone-derived acetate into intermediary metabolism (63).

Sirtuin 4 is another mitochondrial protein that regulates energy usage. This sirtuin does not show deacetylase activity, but it can catalyze ADP-ribosylation of different substrates. Sirtuin 4 has been shown to inhibit the activity of the mitochondrial enzyme glutamate dehydrogenase (GDH), the enzyme that allows amino acid-related metabolites to enter the tricarboxylic acid cycle, which is the main, energy-producing oxidative pathway in the mitochondria. Mice without sirtuin 4 display higher GDH activity and higher levels of circulating insulin. It has been shown that CR down-regulates the expression of sirtuin 4 in both liver and endocrine pancreas. In the liver, CR would favor the flow of carbon skeletons from amino acids to gluconeogenic intermediates (63).

In summary, sirtuins are cellular regulators that are tightly linked to metabolic control by the redox state because of their NAD^+ dependency. The requirement for NAD^+ to accomplish their enzymatic activities make them participants in stress resistance and in numerous metabolic pathways, including adipogenesis, gluconeogenesis, insulin secretion, and glucose homeostasis.

Redox state

Every living cell relies on oxidative processes to maintain a steady metabolic activity. One of the principal foundations in the definition of life is the ability to sequentially transfer electrons from reduced compounds (nutrients) to acceptor molecules (mainly O_2). During this progression, chemical energy is generated (mainly in the form of ATP) to drive synthetic

reactions that make possible the preservation of cellular structures. A consequence of this flow of electrons is the formation of redox couples, which can be linked to each other or can be independent. The ratio of the reduced to the oxidized forms functions as an index of the redox state of a given cellular environment or compartment. Along with the energy charge and cellular compartmentalization, the redox state is one of the principal parameters that controls metabolic pathways.

There are a number of cellular redox couples, but three are primarily responsible for dictating the thiol oxidative balance and the metabolic transformations of the cell: 1) NAD^+/NADH , 2) $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, and 3) GSSG/GSH . The first two are mainly coenzymes for dehydrogenases: NAD^+/NADH participates in redox reactions in the catabolic degradation of biomolecules and serves as the principal contributor of electrons to the mitochondrial phosphorylating system to generate ATP; $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ supplies the reductive power for the anabolic reactions that synthesize fatty acids, cholesterol, and other biomolecules. In cells and tissues the $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ratio tends to be approximately 100:1, while the NAD^+/NADH tends to be around 1:800. Glutathione is considered to be the major thiol-disulfide redox buffer of the cell. On average, the GSH concentration within the cell is very high (in mM range), and hence GSSG/GSH constitutes the principal couple to control the cellular redox environment. In addition, the ratio GSSG/GSH influences the conformational state and the activity of numerous proteins and enzymes with reactive thiol residues. In most cells, 1% of the GSH is oxidized to GSSG (64).

The redox state plays a dual role in the liver and in other organs that present circadian fluctuations: It serves as a link between the metabolic activity and the timing system. This relation is based in two main aspects of hepatic physiology that characterize the liver as the most important nutrient-processing organ and, at the same time, as one of the peripheral clocks with an enhanced response to the feeding-starvation condition (65).

I. The principal synthetic and degradative metabolic pathways usually include one or several $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ -dependent dehydrogenation reactions. As a consequence, they are susceptible to regulation by the redox state. For example, the following biochemical events are modulated by the ratio $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ in the liver: the progression of glycolysis and the entry of pyruvate into mitochondrial oxidation, the cytoplasmic synthesis of fatty acids and their degradation in peroxisomes and mitochondria, the formation of cholesterol, the metabolic balance between gluconeogenesis and ureogenesis, the incorporation of glutamate into and its exit from the Krebs cycle, the activity of mitochondrial α -ketoglutarate dehydrogenase, the equilibrium between dihydroxyacetone phosphate and glycerol, etc.

At the same time, the activation of a given biochemical transformation can shift the ratio of redox couples, and hence, influence other metabolic pathways sensitive to redox regulation. For example, the intake and subsequent hepatic metabolism of ethanol by alcohol dehydrogenase shifts the ratio NAD^+/NADH by increasing NADH. The resulting reductive conditions have a significant impact on multiple metabolic pathways that are redox-dependent. Because of these redox alterations, in conditions of ethanol intoxication the liver shows increased lactate and accumulation of lipidic material, which are characteristic of the pathology known as fatty liver or steatosis.

II. Recent findings suggest that the activities of the transcription factors Clock and NPAS2 are modulated according to the redox state of the cell, and may provide insight into the molecular mechanism of entrainment. Both clock proteins contain PAS (**P**er: period circadian protein, **A**rnt: Ah receptor nuclear translocator protein, and **S**im: single-minded protein) domains, which generally confer sensitivity to a variety of environmental signals such as changes in redox potential, light, oxygen, small ligands, and overall cellular energy level. It has been proposed that fluctuations in cellular redox can entrain the molecular clock, by the following mechanism: The reduced cofactors NADH and NADPH enhance the binding of Clock-BMAL1 and NPAS2-BMAL1 heterodimers to DNA, whereas the oxidized forms, NAD^+ and NADP^+ , inhibit the DNA binding of these dimers.

In summary, because of the strategic role played by the redox state in the liver linking the processing of nutrients and the modulation of clock genes, the redox state is one parameter that could underlie the entrainment of the organism's circadian feeding activity.

Nuclear receptors

The nuclear receptor (NR) superfamily consists of nearly 50 different proteins identified in experimental rodents. Some of the better-characterized NRs are: glucocorticoid receptor (GR), peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) α , γ , and δ , retinoic acid receptors (RAR) α and γ , estrogen-related receptor (ERR) β , vitamin D receptor, farnesoid X receptor (FXR) β , Rev-erb α and β , etc. They participate in development and reproduction, but recently NRs have also been found to be involved in diverse aspects of organ physiology, mainly in liver, brain, and adipose tissue. NRs direct an extensive variety of genetic programs that regulate lipid and carbohydrate metabolism by sensing fat-soluble hormones, vitamins, and especially dietary lipids. Among the best characterized NR ligands are: fatty acids (arachidonic and linoic acids), peroxidized fatty acids, prostaglandins, prostacyclanes, vitamin D, retinoic acid, thyroid hormones (TR), steroidal hormones, etc. (66).

NRs in the liver are involved in the switch from carbohydrate to lipid-based metabolism after a period of fasting. In the absence of food, the hepatic glycogen deposits are rapidly depleted inducing activation of gluconeogenic enzymes. At the same time, fatty acids are released from adipose tissue and eventually arrive at the liver to serve as substrates for ketone body production. Fatty acids and metabolites derived from them also act as ligands for NRs, orchestrating the metabolic response of the liver during fasting. Recent evidence indicates that EER α may also play a role in regulating fatty acid metabolism and energy balance (67).

PPAR α is a member of the steroid/nuclear receptor superfamily that participates in various ways to control lipid and carbohydrate metabolism, and it is abundantly expressed in the liver. PPAR α is activated by natural fatty acids such as arachidonate derivatives (68). This nuclear receptor is also known to dimerize in the presence of some other factors like Retinoic X Receptor (RXR) or Rev-erb α , and to enhance the expression of enzymes for mitochondrial and peroxisomal β -oxidation as well as microsomal ω -oxidation. PPAR α levels increase as a response to the starving state, remain highly expressed in liver during the postabsorptive phase when food intake is low (69), and are also affected by glucocorticosteroid hormones (70). PPAR α -knockout mice show an apparently normal phenotype during *ad libitum* feeding, but hypercholesterolemia, hypoketonemia, and steatotic liver (excessive lipid accumulation) occur under fasting conditions as a result of decreased levels of lipid transport and metabolism, demonstrating the importance of this nuclear factor for adaptation to fasting (71, 72).

It has been suggested that NR expression links the circadian clock to metabolic activity in several organs, including the liver. Besides the fact that Rev-erb α and β themselves are considered clock genes, all members of the ROR, PPAR, FXR, TR, ERR, NGFI-B, and TR2/TR4 subfamilies show circadian expression in the liver, white and brown adipose tissues, and muscle.

The fluctuations in NR expression could be part of the timing system that allows a coordinated response of the peripheral circadian clock in the liver to diverse metabolic inputs, especially those related to nutrient handling.

Liver as an oscillator

The master oscillator resides in the SNC; this center orchestrates circadian oscillations in different organs in order to produce day-night changes in behavior and physiology that allow adaptation to the daily environmental changes.

Other oscillators exist in peripheral organs that are also dependent on the environmental conditions, for example food availability, temperature, social interactions, etc. With adequate food, the central clock in the SNC is the most

important regulator of the organism's rhythmicity, and peripheral oscillators act as subordinate biological clocks. In contrast, during food restriction, the oscillator synchronized by light is no longer the main pacemaker, and a new oscillator, such as the one synchronized by food, takes over command of the circadian activity (73).

Hepatic circadian rhythms

The metabolism of the liver is exceptionally rhythmic; nearly 20% of the proteins show circadian fluctuations, and most of the biochemical and physiological events in this organ present some type of variation during a 24-h period.

The rhythmicity of the liver is mainly synchronized with the access and processing of food. The principal hepatic functions such as the control and/or synthesis of critical blood metabolites including glucose, lipoproteins, free fatty acids, ketone bodies, amino acids, hormones, clotting factors, and acute-phase response mediators, show circadian variations.

The daily variations of the hepatic transcriptome in feeding and fasting conditions have been reported. The fluctuating genes detected in these studies have been grouped according to functional characteristics.

Circadian variations in carbohydrates metabolism

Cyclic changes in the activities of the glycolytic enzymes 6-phosphofruktokinase-2 (Pfk-2), aldolase (two isoforms, Aldo1 and Aldo3), and glucose phosphate isomerase (Gpi) have been observed. The expression of these enzymes peaks at the subjective day/night transition, which corresponds to the beginning of the food intake phase (74, 75).

The enzymes involved in the metabolism of glycogen and fatty acids show daily variations according to the feeding time of the organism. Fed animals show high hepatic glycogen synthesis, whereas fasting promotes active glycogen breakdown. For example, glycogen phosphorylase, which is the enzyme that releases glucose units from glycogen, differs markedly between the fasted and non-fasted groups. The liver glycogen depletion in fasted groups causes down-regulation of pyruvate kinase, pyruvate dehydrogenase, and glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase. In the early phases of fasting, no evidence of increased gluconeogenesis is observed.

Circadian variation in lipid metabolism

As we briefly reviewed above, liver is an important organ in lipid metabolism and is a site of lipid synthesis, modification, degradation, and storage. All these processes are coordinated by transcription factors such as PPAR, SREBP, and C/EBP, and of course by endocrinological and nervous

signals. It is very important to consider lipids as potential molecular regulators of the liver circadian system, due to the existence of a link between these transcriptional factors and the expression of clock genes such as *Clock*, *Bmal*, and *Rev-erba*.

Fasting animals up-regulate the genes responsible for fatty acid uptake and oxidation, some of which correspond to the enzymes that catalyze mitochondrial and peroxisomal β -oxidation (acetyl-CoA acyltransferase 3-oxo acyl-CoA thiolase). At the same time, the synthesis of fatty acids is down-regulated during fasting, also triggering ketogenesis (74, 75).

Circadian variation in urea cycle

The liver is the major site of gluconeogenesis, the major organ of amino acid catabolism, and the only organ with a complete urea cycle. Amino acids can be oxidized in the liver, but most of these substrates are oxidized only partially in this organ, with the bulk of their carbon skeleton being converted into glucose. The nitrogen is converted to urea and, to a lesser extent, to glutamine. The integration of the urea cycle with gluconeogenesis ensures that the bulk of the reducing power (NADH) required in the cytosol for gluconeogenesis can be provided by the auxiliary reactions of the urea cycle. Ammonia produced by amino acid metabolism is detoxified through conversion into urea by the ornithine cycle in the liver. There are reports that the activity of some urea cycle-related enzymes (arginino-succinate synthetase, ornithine decarboxylase and glutamate dehydrogenase) show a circadian rhythmicity that correlates with food intake and the daily fluctuations in urea concentration in the liver and serum (76, 77).

Circadian variations of structural elements and transporters

Cytoskeletal proteins involved in cell proliferation and apoptosis such as tubulin subunits, *Tuba4*, *Tubb3*, *Tubb4*, and *Tubb5*, present circadian variations. The adaptor molecule Disabled-2 (*Dab2*), whose gene product is thought to participate in vesicle endocytosis and is linked to membrane receptors involved in signal transduction, decreases during the middle of the day. The actin-interacting proteins, *LIM* and *Lasp1*, are important for cytoskeletal integrity and cell motility, and they also show daily fluctuations.

Several genes that participate in vesicle transport and endocytosis, such as the subunits *Ap1b1*, *Ap1m1*, and *Ap1s1* of the AP-1, increase during the night. These adaptor proteins are found at the cytoplasmic face of coated vesicles in the Golgi complex. A peak in the expression of Synaptojanin 2 (*Synj2*), which is an Inositol 5-phosphatase involved in membrane trafficking, is detected at the beginning of the night.

Circadian fluctuations have also been described for transporters and carriers such as: Slc12a2, a transporter for Na⁺, K⁺, and Cl⁻; Slc16a1, a monocarboxylate transporter; Slc19a1, a carrier for reduced folate; and Slc25a11, a mitochondrial carrier for oxoglutarate (75).

Circadian variations in transcription factors

The timely expression in the liver of certain transcription factors is necessary for the progression of cell cycle, cellular differentiation, carcinogenesis, liver regeneration, and apoptosis.

Factors that display the most conspicuous circadian rhythmicity in the liver belong to the family of bZIP transcription factors known as C/EBPs. The main members of this group are C/EBP- α , C/EBP- β , C/EBP- γ , C/EBP- δ , C/EBP- ϵ , and C/EBP- ξ .

C/EBP- α plays a central regulatory role in oscillatory patterns observed in many components of energy metabolism. In addition, it participates in the circadian control of enzymes involved in bilirubin detoxification and gluconeogenesis. Glucocorticoids and glucagons, endocrine factors that are very important in nutrient processing, induce the transcription of the C/EBP- β gene (78).

Cell proliferation and differentiation in the liver are coordinated by C/EBP- α and C/EBP- β . Experimental evidence suggests that these factors can activate liver stem cells proliferation and liver regeneration (79, 80).

Apoptosis is a cellular process under circadian control, including the liver. Mitochondrial manganese superoxide dismutase (MnSOD), a TNF- α -inducible, reactive oxygen-scavenging enzyme, protects cells from TNF- α -mediated apoptosis. Curiously, TNF- α -induced apoptotic injury was dramatically reduced in mutant mice that did not express C/EBP- β , suggesting that C/EBP- β has antiapoptotic properties associated with enhanced Mn-SOD expression after TNF- α stimulation (81).

Liver regeneration is a coordinated process in which the timely course of DNA synthesis represents a clear circadian behavior. After two-thirds hepatectomy, the liver can compensate for the acute loss of mass; it maintains serum glucose levels and many of its differentiated functions. The interplay between differentiation and cell growth has been studied during liver regeneration. Both C/EBP- α and C/EBP- β expression increase in this condition: 1 h after partial hepatectomy C/EBP- α mRNA increased by 30%, followed by a transient increase in nuclear levels of C/EBP- α protein 3 h later. Interestingly, increases in C/EBP- β mRNA and protein are more sustained. Levels of C/EBP- β mRNA increased 4- to 5-fold within 1 h of partial hepatectomy and remained high throughout most of the replicative period, which lasted for x days? (82, 83).

Microarray data showed that the expression levels of two core components of the circadian network, *Per2* and *Rev-Erb α* , were significantly altered by C/EBPs. *Per2* expression is up-regulated by C/EBP α and C/EBP ϵ . *Rev-Erb α* is a nuclear hormone receptor-related transcriptional activator that is encoded on the noncoding strand of the alpha-thyroid hormone receptor (TR) gene adjacent to PPAR γ and C/EBP elements? and is associated with adipocyte differentiation (84).?

Circadian variations in xenobiotics processing

It is well established that levels of xenobiotic processing enzymes in the liver change as a function of feeding and under circadian control. These enzymes recognize endogenous chemicals such as steroid hormones and human-made xenobiotics, including drugs and environmental pollutants. The metabolism and elimination of xenobiotics is mediated by the cytochrome P-450 enzymes as well as other families of conjugative enzymes and transport proteins. It has been shown that C/EBP- β , together with other factors, is implicated in governing the transcription of P-450 genes.

The cytochrome P-450 enzymes can be evaluated by their mono-oxygenase activities: 7-alkoxycoumarin *O*-dealkylase (ACD), 7-methoxycoumarin *O*-dealkylase (MCD), 7-ethoxycoumarin *O*-dealkylase (ECD), and 7-propoxycoumarin *O*-dealkylase (PCD) activities. The ACD activity in the liver shows clear daily fluctuations in male rats, with high values during the dark period and low values during the light period. Animals whose central oscillator is injured lose the hepatic ACD fluctuations, indicating that they are controlled by the SCN (85).

Diseases associated with irregular rhythmic activity of the liver

The liver is one of the organs with the most pronounced rhythmic activity. In fact, 20% of the hepatic proteins show circadian fluctuations, and most of the metabolic and physiological events in the liver exhibit some type of variation during the 24-h period. This intensive and fluctuating activity implies a tight coordination among the metabolic pathways that take place in the hepatic tissue. Altered patterns of feeding and sleep can perturb the hepatic rhythms including their phase, amplitude, or precision. Usually, these chronobiological alterations reflect miscommunication between circadian oscillators within the organism, or lack of synchrony between environmental signals and circadian systems (86). If the temporal pattern of the liver physiology is altered or disrupted, a set of ailments eventually develops, including steatosis, diabetes, obesity, cancer, and hepatitis C (87).

Steatosis

Steatosis is a pathological condition characterized by abnormal lipid accumulation. Because the liver is one of the organs that processes and delivers the lipids obtained from the diet, several circumstances known to disturb lipid metabolism cause fatty liver or hepatic steatosis. Oishi et al. (88) demonstrated that mutant mice lacking the gene *Clock*, a component of the circadian oscillator system, presented fatty liver. This condition was associated with the abolished expression of PPAR α in the mutant mice. The absence of PPAR α affects the capacity of the liver to handle lipids such that fat accumulates within the hepatocytes that lack clock expression. In addition, *Clock*-mutant mice showed reduced absorption of dietary fat, which might be due to a decrease in the expression of pancreatic cholecystokinin (CCK-A) receptors as well as to a diminution in lipase activity.

Another transcriptional factor that links the circadian clock to lipid metabolism in the liver is the sterol response element binding protein (SREBP). The SREBP family consists of the SREBP-1a, -1c, and -2 factors, known to regulate a large pool of target genes in the liver involved in lipogenesis and cholesterol homeostasis. The SREBPs are activated by a post-translational mechanism linked to food-dependent variables. For example, SREBP-1 can induce transcription of genes in fatty acid synthesis pathways, while over expression of SREBP-2 leads to the accumulation of triacylglycerides and cholesterol, producing hepatic steatosis. SREBP-2 is crucial for establishing the circadian pattern regulating cholesterogenic genes, and SREBP-1 activation might play a central role in controlling the circadian variations in the transcription of its target genes. It has been proposed that SREBP factors could act as transcriptional activators of circadian and nutritional cues in the liver (89).

Diabetes

An example of imbalance between lipid metabolism and the timing system is present in non-insulin-dependent diabetes mellitus patients. In this malady, there is a constant hyperglycemia and an impaired suppression of fatty acid release from adipose tissue in the postprandial state. In consequence, the flux of free fatty acids to the liver increases and promotes an overproduction of very low-density lipoproteins (VLDL) and a decrease of high-density lipoprotein (HDL), associated with a marked hypertriacylglyceridemia (90). The hyperglycemia stimulates the transcription of the plasminogen activator inhibitor type 1 (Pai-1) gene in vascular endothelial and smooth muscle cells. Pai-1 is a primary regulator of the fibrinolytic cascade; it contains two functional E-box motifs in its promoter, and therefore, its expression is regulated by the circadian clock genes. The *db/db* mouse (which lacks the

leptin receptor) is an accepted animal model for Type 2 diabetes. Kudo et al., (91) demonstrated in the liver of these mutant mice that the mRNA of *Per2* was severely diminished, whereas there was a phase-shift in *Bmal1* synthesis. At the same time, *Pai-1* was constitutively expressed at high levels. Unexpectedly, night-time restricted feeding reverted all the alterations observed in the timing system genes as well as the rhythmic activity of *Pai-1*.

Obesity

One of the most urgent problems to resolve in modern societies is the high incidence of people who are overweight and obese. Among many health problems linked with obesity, this condition is also associated with a spectrum of hepatic abnormalities. Obesity is intimately related to the metabolic syndrome (MS), which is a pathological state characterized by accumulation of visceral fat, dyslipidemia, and insulin resistance. Insulin resistance results in impaired glucose uptake in insulin-sensitive tissues such as muscle, adipose tissue, and liver. The disturbance in glucose availability in the liver leads to an increased manufacture of triacylglycerides, even in the fasting state. Over the long term, other abnormalities develop during MS, such as ectopic fat deposition, oxidative stress, a pro-inflammatory state and a maladaptive innate immune response. In this context Turek et al., (92) reported that *Clock* protein is involved in this pathology, since *Clock* mutant mice develop a condition very similar to MS. The mutant mice present hyperphagia and subsequent obesity. In addition, they have increased levels of glucose, cholesterol, and triacylglycerides in blood. These data have been interpreted to indicate that *Clock* mutant mice are unable to control the energy homeostasis and then they develop insensitivity to leptin and become hyperphagic. Eventually, the mutant mice lose the signaling that enables communication between fat deposits in adipose tissue and cerebral centers controlling the hunger-satiety state. They overfeed, become obese, and develop the rest of the characteristics of the MS (93).

Cancer

The circadian timing system negatively controls malignant processes by regulating the physiology of the cell cycle. This action occurs by the down-regulation of genes involved in the cell cycle progression and the apoptotic process. Overall, this situation suggests that environmental or genetic conditions that disrupt the circadian clock coordination could have an impact on cancer progression. Temporal expression of genes involved in cell cycle regulation and tumor suppression, such as *c-myc*, *Cyclin D1*, *Cyclin A*, *Mdm-2*, and *Gadd45 α* , is deregulated in *mPer2* mutant mice. These studies suggest that the *mPer2* gene functions as a tumor suppressor by regulating DNA damage-responsive pathways (94). Furthermore, some reports indicate that

tumor development is slower in mice with caloric restriction than in mice fed ad libitum. Moreover, disturbed circadian rhythmicity in SCN-injured animals or chronic exposure to jet lag exposure leads to accelerated tumor growth (95).

The relationship between circadian timing and the cell cycle can be relevant for chemotherapy, since the efficiency of the applied drugs varies according to the time of the day. Applying drugs at the optimal time of day helps to minimize the doses of these very aggressive pharmaceutical agents, thus avoiding damage to healthy tissues.

Hepatitis C

Because the morbidity and mortality of hepatitis C is high, it is important to emphasize its relationship with biological rhythms. Hepatitis C virus (HCV) infection is related to down-regulation of carnitine palmitoyl transferase-1 (CPT-1)

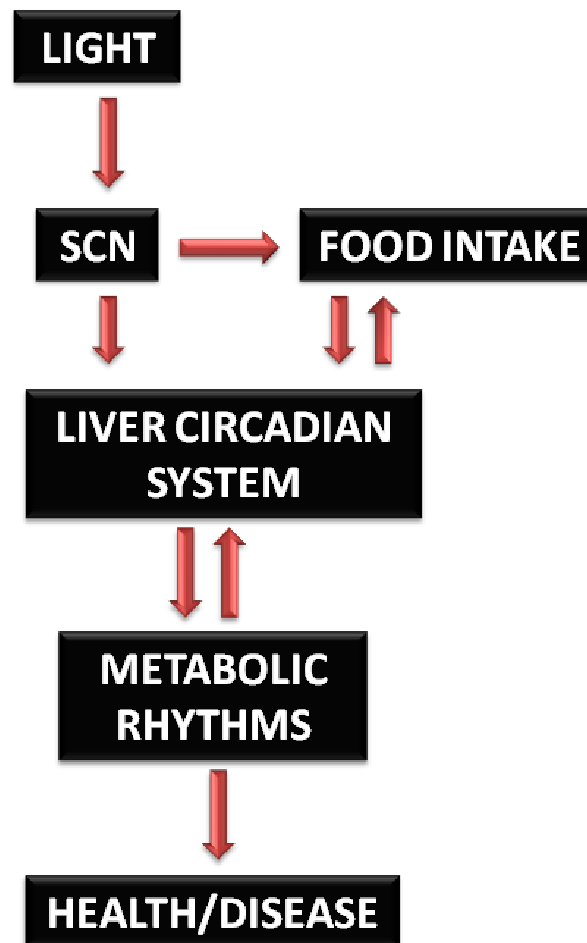


Figure 1. Liver circadian physiology and consequently, the health status of the organism are regulated by two different timing systems: a light-sensitive clock and a delocalized food-responsive timer.

and acyl CoA oxidase (AOX), the rate-limiting enzymes of mitochondrial and peroxisomal β -oxidation, respectively. Both enzymes are transcriptionally controlled by PPAR α (96). It has been reported that this transcriptional factor is altered during HCV infection. Hence, based on the relation between PPAR α and the clock genes, it is very probable that the circadian system could be modified during HCV infection.

Concluding remarks

The dramatic influence of circadian clocks on numerous physiological activities is demonstrated by the survival advantages of rhythmic processes such as the sleep-wake cycle, feeding-fasting behavior, metabolic and endocrine activities, and immune responses. The liver is recognized as an organ important for nutrient handling and metabolic integration, and also as being tightly associated with the alternation of hunger and satiety. All these processes are under the circadian control of the suprachiasmatic nucleus. But if food access is restricted by few hours during the day, the biochemical and physiological circadian activities of the liver shift to the meal time. Interference with liver biological rhythms leads to attenuated circadian feeding rhythms, hyperphagia, obesity, and a predisposition to cancer. As food components and feeding times have the ability to reset the hepatic circadian rhythms, it is of extreme importance to understand the relationship between food, feeding, and the liver timing system at the molecular level. It has been reported that resetting the biological clock by a restricted feeding schedule may lead to better function of physiological systems, preventing obesity, controlling cell proliferation, promoting a state of well-being, and extending the life span. A more complete understanding of liver circadian activity and how the timing of meals influences the synchronization of the timing system will suggest new therapies to treat pathologies linked to metabolic malfunction or feeding disorders.

References

1. Menaker, M. 2006, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 28, 3393.
2. Orpwood, J.E., Griffiths, S.W., and Armstrong, J.D. 2006, *J. Anim Ecol.*, 75, 677.
3. Sirot, E. 2006, *Anim. Behav.*, 72, 373.
4. Moore, D., Siegfried, D., Wilson, R., and Rankin, M.A. 1989, *J. Biol. Rhythms*, 4, 305.
5. Williams, B., and Pilditch, C.A. 1997, *J. Biol. Rhythms*, 12, 173.
6. Carey, H.V., Andrews, M.T., and Martin, S.L. 2003, *Physiol. Rev.*, 83, 1153.
7. Mustonen, A.M., Puukka, M., Saarela, S., Paakkonen, T., Aho, J., and Nieminen, P. 2006, *Comp. Biophem. Phys. A.*, 144, 444.
8. Nieminen, P., Käkälä, R., Pyykönen, T., and Mustonen, A.M. 2006, *Comp. Biophem. Phys. B.*, 145 81.

9. Reidy, S.O., and Weber, J.M. 2004, *J. Exp. Biol.*, 207, 4525.
10. Pinheiro, E.C., Taddei, V.A., Migliorini, R.H., and Kettelhut, I.C. 2006, *Comp. Biochem. Phys. B.*, 143, 279.
11. Groscolas, R., and Robin, J.R. 2001, *Comp. Biochem. Phys. A.*, 128, 645.
12. Secor, S.M. 2005, *J. Exp. Biol.*, 208, 2595.
13. Ott, B.D., and Secor, S.M. 2007, *J. Exp. Biol.*, 210, 340.
14. Ruby, N.F. 2003, *J. Biol. Rhythms*, 18, 275.
15. Hargrove, J.L. 2005, *Nutr. J.*, 4, 36.
16. Guszak, R.W., MacArthur, R.A., and Campbell, K.L. 2005, *J. Comp. Physiol. B.*, 175, 87.
17. Desvergne, B., Michalik, L., and Wahli, W. 2006, *Physiol. Rev.*, 86, 465.
18. Moore, R.Y., and Eichler, V.B. 1972, *Brain. Res.*, 42, 201.
19. Guo, H., Brewer, J.M., Lehman, M.N., and Bittman, E.L. 2006, *J. Neurosci.*, 26, 6404.
20. Satinoff, E., and Prosser, R.A. 1988, *J. Biol. Rhythms*, 3, 1.
21. Mistlberger, R.E. 1994, *Neurosci. Behav. Rev.*, 18, 171.
22. Stephan, F.K. 2002, *J. Biol. Rhythms*, 17, 284.
23. Damiola, F., Minh, N.L., Preitner, N., Kornmann, B., Fleury-Olela, F., and Schibler, U. 2000, *Genes Dev.*, 14, 2950.
24. Stokkan, K.A., Yamazaki, S., Tei, H., Sakaki, Y., and Menaker, M. 2001, *Science*, 291, 490.
25. Davidosn, A.J., Poole, A.S., Yamazaki, S., and Menaker, M. 2003, *Genes Brain Behav.*, 2, 32.
26. Stephan, F.K. 1992, *Physiol. Behav.*, 52, 985.
27. Balleine, B.W. 2005, *Physiol. Behav.*, 86, 717.
28. Schaftingen, E.V., and Gerin, I. 2002, *Biochem. J.*, 362, 513.
29. Minassian, C., Montano, S., and Mithieux, G. 1999, *Biochim. Biophys. Acta*, 1452, 172.
30. Lindfeldt, J., Holmin, T., and Ahron, B. 1987, *J. Autonomic. Nerv. Sys.*, 19, 211.
31. la Fleur, S.E. 2006, *Physiol. Behav.*, 89, 110.
32. Burgess, S.C., He, T.T., Yan, Z., Lindner, J., Sherry, A.D., Malloy, C.R., Browning, J.D., and Magnuson, M.A. 2007, *Cell Metabolism*, 5, 313.
33. Scharrer, E. 1999, *Nutrition*, 15, 704.
34. Rinaldo, P., and Matern, D. 2002, *Annu. Rev. Physiol.*, 64, 477.
35. Woods, S.C. 2004, *Neurobiology of food and fluid intake*. 2nd edition. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
36. Klover, P.J., and Mooney, R.A. 2004, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 36, 753.
37. Woods, S.C., Lutz, T.A., Geary, N., and Langhans, W. 2006, *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 10, 1.
38. Carey, H.V., Andrews, M.T., and Martin, S.L. 2003, *Physiol. Rev.*, 83, 1153.
39. Woods, S.C., Seeley, R.J., Porte, D., and Schwartz, M.W. 1998, *Science*, 280, 1378.
40. Racotta, R., Islas-Chaires, M., Vega, C., Soto-Mora, M., and Russek, M. 1984, *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.*, 15, R247.
41. Nicolaidis, S. 1987, *NIPS*, 2, 104.
42. Leonhardt, M., and Langhans, W. 2004, *Physiol. Behav.*, 83, 645.

43. Vergoni, A.V., and Bertolini, A. 2000, *Eur. J. Pharmacol.*, 405, 25.
44. Williams, G., Harrold, J.A., and Cutler, D.J. 2000, *Proc. Nutr. Soc.*, 59, 385.
45. Pritchard, L.E., Turnbull, A.V., and White, A. 2002, *J. Endocrinol.*, 172, 411.
46. Stanley, S., Wynne, K., McGowan, B., and Bloom, S. 2005, *Physiol. Rev.*, 85, 1131.
47. Strader, A.D., and Woods, S.C. 2005, *Gastroenterol.*, 128, 175.
48. Bray, G.A. 2000, *Proc. Nutr. Soc.*, 59, 373.
49. Erlanson-Albertsson, C. 2005, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 97, 61.
50. Novin, D., Robinson, K., Culbreth, L.A., and Tordoff M.G. 1985, *Am. J. Clin. Nutr.*, 42, 1050.
51. Tordof, M.G., Rawon, N., and Friedman, M.I. 1991, *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.*, 30, R283.
52. Scharrer, E., Rossi, R., Sutter, D.A., Seebacher, M.C., Boutelleir, S., and Lutz, T.A. 1997, *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.*, 41, R874.
53. Ji, H., and Friedman, M.I. 1999, *Physiol. Behav.*, 68, 181.
54. Jungermann, K., and Kietzmann, N. 1996, *Annu. Rev. Nutr.*, 16, 179.
55. Hargrove, J.L. 2005, *Nutr. J.*, 13, 36.
56. Suarez, R.K., and Gass, C.L. 2002, *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 133, 335.
57. Gusztak, R.W., MacArthur, R.A., and Campbell KL. 2005, *J. Comp. Physiol. B*, 175, 87.
58. Vidal-Vanaclocha, F. 1997, *Functional heterogeneity of liver tissue*, Van Nostrand Reinhold, USA.
59. Xue, B., and Kahn, B.B. 2006, *J. Physiol.*, 574, 73.
60. Rutter, G.A., Da Silva, X.G., and Leclerc, I. 2003, *Biochem. J.*, 375, 1.
61. Long, Y.C., and Zierath, J.R. 2006, *J. Clin. Invest.*, 116, 1776.
62. Carlin, D. 2005, *Biochimie.*, 87, 87.
63. Blander, G., and Guarente, L.P. 2004, *Annu. Rev. Biochem.*, 73, 417.
64. Haigis, M.C., and Guarente, L.P. 2007, *Genes Development*, 20, 2913.
65. Hallows, W.C., Lee, S., and Denu, J.M. 2006, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 103, 10230.
66. Schwer, B., Bunkenborg, J., Verdin, R.O., Andersen, J.S., and Verdin, E. 2006. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 103, 10224.
67. Escher, P., Braissant, O., Basu-Modak, S., Michalik, L., Wahli, W., and Desvergne, B. 2001, *Endocrinology*, 142, 4195.
68. Oishi, C., Shirai, H, and Ishida, N. 2005, *Biochem. J.*, 386, 575.
69. Lemberger, T., Saladini, R., Vázquez, M., Assmacopoulos, F., Staels, B., Desvergne, B., Wahli, W., and Auwerx, J. 1996, *J. Biol. Chem.*, 271, 1764.
70. Hashimoto, T., Cook, W.S., Qi, C., Yeldandi, A.V., Reddy, J.K., and Sambasiva, R.M. 2000, *J. Biol. Chem.*, 275, 28918.
71. Patel, D.D., Knight, B.L., Wiggins, D., Humphreys, S.M., and Gibbons, G.F. 2001, *J. Lipid Res.*, 42, 328.
72. Schafer, F.Q., and Buettner, G.R. 2001, *Free Rad. Biol. Med.*, 30, 1191.
73. Panda, S., Antoch, M.P., Miller, B.H., Su, A.I., Schook, A.B., Straume, M., Schultz, P.G., Kay, S.A., Takahashi, J.S., and Hogenesch, J.B. 2002, *Cell*, 109, 307.

74. Morgan, K.T., Jayyosi, Z., Hower, M.A., Pino, M.V., Connolly, T.M., Kotlenga, K., Lin, J., Wang, M., Schmidts, H.L., Bonnefoi, M.S., Elston, T.C., and Boorman, G.A. 2005, *Toxicol. Pathol.*, 33, 136.
75. Akhtar, R.A., Reddy, A.B., Maywood, S.A., Clayton, J.D., King, V.M., Smith, A.G., Gant, T.W., Hastings, M.H., and Kyriacou, C.P. 2002, *Curr. Biol.*, 12, 540.
76. Kato, H., Mizutani-Kunahashi, M., Shiosaka, S., and Nakagawa, H. 1978, *J. Nutr.*, 108, 1071.
77. Hoffmann, J., and Hardeland, R. 1981, *Arch. Int. Physiol. Biochim.*, 89, 323.
78. Schrem, H., Klempnauer, J., and Borlakj, J. 2004, *Pharmacol. Rev.*, 56, 291.
79. Birkenmeier, E.H., Gwynn, B., Howard, S., Jerry, J., Gordon, J.I., Landschulz, W.H., and McKnight, S.L. 1989, *Genes Dev.*, 3, 1146.
80. Umek, R.M., Friedman, A.D., and McKnight, S.L. 1991, *Science*, 251, 288.
81. Mukherjee, D., Kaestner, K.H., Kovalovich, K.K., and Greenbaum, L.E. 2001, *Hepatology*, 33, 1166.
82. Diehl, A.M., and Yang, S.Q. 1994, *Hepatology*, 19, 447.
83. Greenbaum, L.E., Cressman, D.E., Haber, B.A., and Taub, R. 1995, *J. Clin. Investig.*, 96, 1351.
84. Gery, S., Gombart, A.F., Yi, W.S., Koeffler, C., Hofmann, W.K., and Koeffler, H.P. 2005, *Blood*, 106, 2827.
85. Hirao, J., Arakawa, S., Watanabe, K., Ito, K., and Furukawa, T. 2006, *J. Biol. Chem.*, 281, 3165.
86. Mendoza, J. 2006, *J. Neuroendocrinol.*, 19, 127.
87. Oishi, K., Miyazaki, K., Kadota, K., Kikuno, R., Nagase, T., Atsumi, G., Ohkura, N., Azama, T., Mesaki, M., Yukimasa, S., Kobayashi, H., Iitaka, C., Umehara, T., Horikoshi, M., Kudo, T., Shimizu, Y., Yano, M., Monden, M., Machida, K., Matsuda, J., Horie, S., Todo, T., and Ishida, N. 2003, *J. Biol. Chem.* 278, 41519.
88. Oishi, K., Shirai, H., and Ishida, N. 2005, *Biochem. J.*, 386, 575.
89. Brewer, M., Lange, D., Baler, R., and Anzulovich, A. 2005, *J. Biol. Rhythms*, 20, 195.
90. Syvanne, M., and Taskinen, M. 1997, *The Lancet*, 350, 20.
91. Kudo, T. Akiyama, M., Kuriyama, K., Sudo, M., Moriya, T., and Shibata, S. 2004, *Diabetologia*, 47, 1425.
92. Turek, F., Joshu, C., Kohsaka, A., Lin, E., Ivanova, G., McDearmon, E., Laposky, A., Losee-Olsol, S., Easton, A., Jensen, D., Eckel, R., Takahashi, J., and Bass, J. 2005, *Science*. 308, 1043.
93. Williams, D., and Schwartz, M. 2005, *Cell metabolism*, 1, 355.
94. Fu, L., Pelicano, H., Liu, J., Huang, P., and Lee, C. 2002, *Cell*, 111, 41.
95. Filipinski, E., Mei Li, X., and Lévi, F. 2006, *Cancer Causes Cont.*, 17, 509.
96. Cheng, Y., Dharancy, S., Malapel, M., and Desreumaux, P. 2005, *World J. Gastroenterol.*, 11, 7591.

RESEARCH

Open Access

Chronic inhibition of endoplasmic reticulum calcium-release channels and calcium-ATPase lengthens the period of hepatic clock gene *Per1*

Adrián Báez-Ruiz and Mauricio Díaz-Muñoz*

Abstract

Background: The role played by calcium as a regulator of circadian rhythms is not well understood. The effect of the pharmacological inhibition of the ryanodine receptor (RyR), inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP₃R), and endoplasmic-reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA), as well as the intracellular Ca²⁺-chelator BAPTA-AM was explored on the 24-h rhythmicity of the liver-clock protein PER1 in an experimental model of circadian synchronization by light and restricted-feeding schedules.

Methods: Liver explants from *Period1-luciferase (Per1-luc)* transgenic rats with either free food access or with a restricted meal schedule were treated for several days with drugs to inhibit the activity of IP₃Rs (2-APB), RyRs (ryanodine), or SERCA (thapsigargin) as well as to suppress intracellular calcium fluctuations (BAPTA-AM). The period of *Per1-luc* expression was measured during and after drug administration.

Results: Liver explants from rats fed ad libitum showed a lengthened period in response to all the drugs tested. The pharmacological treatments of the explants from meal-entrained rats induced the same pattern, with the exception of the ryanodine treatment which, unexpectedly, did not modify the *Per1-luc* period. All effects associated with drug application were reversed after washout, indicating that none of the pharmacological treatments was toxic to the liver cultures.

Conclusions: Our data suggest that Ca²⁺ mobilized from internal deposits modulates the molecular circadian clock in the liver of rats entrained by light and by restricted meal access.

Keywords: Food-entrainable oscillator, liver explants, clock proteins, intracellular calcium, SERCA, IP₃R, RyR.

Background

In most species, numerous physiological processes are regulated by a timing system associated with the rotational movement (~24 h) of our planet. The circadian rhythms are anticipatory adjustments of metabolic and behavioral processes elicited by daily environmental fluctuations [1]. At the cellular level, circadian rhythms are maintained by a system of interlocking positive (CLOCK and BMAL) and negative (PER and CRY) feedback loops of transcription/translation driven by the core clock genes [2]. The circadian clock, in turn, communicates rhythmicity to a number of output pathways

by controlling E-box-associated gene expression and the metabolic status of the cell [3].

Environmental factors that provide entraining cues (zeitgebers) communicate the passage of time to cellular circadian clocks. Two well-recognized zeitgebers are the alternating light/dark cycle and food availability. Photic stimuli entrain the main mammalian pacemaker, the suprachiasmatic nucleus (SCN). It is now well established that restricted feeding also synchronizes rhythmic processes through activation of a food-entrainable oscillator (FEO). The anatomical substrate for the FEO and its dependence on canonical clock gene function remain topics of debate [4,5]. However, two aspects are accepted: 1) the FEO is not completely dependent on the SCN [6]; 2) it requires food restriction (FR) with circadian entraining limits (~22-26 h) [7]. Activation of the

* Correspondence: mdiaz@comunidad.unam.mx
Departament de Neurobiología Molecular Celular, Instituto de Neurobiología, UNAM-Juriquilla, Boulevard Juriquilla #3001, Apdo. Postal 1-1141, Querétaro, QRO. 76230, México

FEO influences specific brain areas related to feeding and metabolic control [8] and peripheral tissues such as the liver, which displays a particularly rapid and robust phase shift in response to food entrainment in many physiological and metabolic hepatic functions [9-12]. FR and the associated FEO expression modify not only the phase but also the amplitude of diverse circadian rhythms. For example, notable changes in 24-h variations in the amplitude of free fatty acid concentrations, stomach content, and hepatic triacylglyceride levels have been reported in FR protocols [13-15]. However, it has not been reported if meal entrainment causes modifications in the free-running period of rhythmic parameters.

Compelling evidence for a link between the molecular clock and metabolic networks has been reviewed during light and food entrainment [16-19]. We suggest that intracellular calcium is a strong candidate to coordinate the circadian timing system and biochemical reactions due to its ubiquitous role as a metabolic regulator [20]. Fluctuations of cytoplasmic calcium codify a message that is interpreted in a spatio-temporal manner by metabolic and transcriptional factors. The handling of intracellular calcium is the result of a coordinated activation of ion channels, ATPases, and exchangers in organelles such as the endoplasmic reticulum, mitochondria, and nucleus [21]. Important elements involved in intracellular calcium dynamics include the calcium-release channels inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP₃R) and ryanodine receptor (RyR), as well as the sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA). Although all of these proteins are expressed and widely studied in the liver [22], the precise regulatory role for calcium dynamics in the function of the molecular clock in the liver has not been described.

The aim of this study was to explore the rhythmic properties of *Per1-Luc* in liver explants (mainly the period) exposed for several days to drugs that specifically alter calcium dynamics in the endoplasmic reticulum. Experiments were conducted using rats fed ad libitum (AL) or under a restricted feeding (FR) schedule. Our data reveal that targeted disruption of calcium dynamics affects circadian rhythms of *Per1-luc* expression in a manner that does not depend on the entrainment cue (meal vs. light), except for the case of ryanodine treatment which, surprisingly, did not alter *Per1-luc* rhythmicity in the FR group.

Methods

Animals

Male transgenic rats bearing a *Period1* gene whose promoter region is linked to the coding sequence of the luciferase gene were used as experimental subjects

(*Per1-luc*) [23]. Transgenic *Per1-luc* rats were bred and raised in the vivarium of the Biology Department at the University of Virginia under standard conditions (12:12 h light/dark with lights on as Zeitgeber Time 0 or ZT0) with ad libitum access to food and water. At 5-6 weeks of age (~200 g), animals were transferred to a light- and temperature-controlled cabinet for 5 days prior to food restriction. On day 6, rats were separated into two groups: one group continued with ad libitum feeding (AL), whereas a second group was given a restricted meal (FR from ZT4 to ZT6) for 10 days. All animals were sacrificed on day 15, and liver tissue was recovered for explant culture as described below. All procedures were done according to the National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Animals, and the Guidelines of the Animal Care and Use Committee at the University of Virginia, USA.

Locomotor activity recording

Total locomotor activity was monitored with infra-red motion detectors (IR; Quorum RR-150) mounted ~13 cm above each cage. Each IR detector was modified such that a delay of 8-12 s occurred between detected events. Data were collected in 1-min bins (~5-7 detections/min) with ClockLab software (Actimetrics, USA), compressed into 5-min bins, and finally actograms were generated offline with the same software.

Tissue culture and bioluminescence recording

Rats were sacrificed on day 15, and hepatic tissues were isolated and cultured as previously described [23]. Briefly, a fraction of one hepatic lobe was quickly removed and chilled in Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) at ~4°C. Small explants of liver tissue (1-2 mm²) were dissected free from the larger fragment, placed on culture membranes (Millicell-CM; Millipore), and sealed in a glass-covered (Circle #0, Fisher Scientific), 3.5-ml petri dish (BD-Falcon) containing 1.2 ml of culture medium [serum-free, low sodium-bicarbonate, no phenol red, Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco) supplemented with 10 mM HEPES (pH 7.2), 2% B27 (Invitrogen), 0.1% Luciferin (Promega), and antibiotics (25 U/ml penicillin and 25 µg/ml streptomycin; Gibco). Tissue bioluminescence was measured at 1-min intervals with photomultiplier tubes (Hamamatsu Corporation, USA) housed in a light-tight chamber maintained at 36°C. Each explant was kept 1 day without any manipulation before the addition of drugs. Actions and final concentrations of drugs were as follows: BAPTA-AM (membrane-permeable Ca²⁺ chelator) 30 µM (Sigma, USA); thapsigargin (SERCA antagonist) 1 µM (Calbiochem, USA); aceto-methoxy 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB; IP₃R antagonist) 100 µM (Calbiochem, USA); ryanodine (RyR antagonist) 100 µM (Calbiochem,

USA), and dimethyl sulfoxide (DMSO) 0.1% as vehicle. Drugs were applied continuously from day 2 to 6 (in a chronic manner). On day 7, drugs were removed, fresh medium was added, and bioluminescence was recorded for an additional 3-4 days (washout). The doses of all these well-characterized drugs were consistent with those employed in *in vivo* and *ex vivo* experimental systems [24-26].

Data Analysis

Data analysis was performed using the Lumicycle Data Analysis Software (version 2.1, 2008) and OriginPro (version 7.0, 2002). Raw data were detrended and smoothed as described previously [27]. The period (τ) of *Per1-luc* expression was calculated using a χ -square periodogram analysis of 24-h cycles during drug treatments (days 3-6) and after washout (days 8-11) [28]. The periods during treatment and after washout were calculated separately, omitting the transient gap that resulted during the washout handling. These data have been excluded from the Figures to facilitate the analysis of representative traces.

Statistical Analysis

All results are presented as mean \pm SEM. The effects of feeding condition (AL vs. FR) and culture treatment (DMSO vs. drug treatments vs. washout) on the *Per1-luc* period (τ) were examined with a two-way ANOVA followed by a Bonferroni *post-hoc* test (significance at $p < 0.01$). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software (version 5.0, 2007).

Results

Food Anticipatory Activity during restricted meal

As expected, representative actograms of locomotor activity revealed the appearance of robust food anticipatory activity (FAA) when rats had access to a 2-h restricted meal for 10 days beginning on day 3 (Figure 1B). These data agree with previous reports and are accepted as evidence of FEO activation in *Per1-luc* transgenic rats [29].

The meal-entrained phase of *Per1-luc* expression is maintained in liver explant cultures

As expected [9,29], the liver cultures isolated from AL rats showed a *Per1-luc* peak phase during subjective night, whereas the explants from FR animals showed a *Per1-luc* peak phase close to the time of the former food access (peak phase: AL = ZT 15.7 \pm 0.8 h vs. FR = ZT 7.7 \pm 0.8 h; Bonferroni post-test $p < 0.001$; Figure 2A). The *Per 1-luc* period (τ) in all these conditions showed a constant value close to 24 h, indicating that DMSO is an appropriate reagent vehicle in this experimental protocol (Figure 2B).

Chelation of intracellular calcium with BAPTA-AM affected liver *Per1-luc* rhythmicity

To determine the role of variations of cytosolic calcium in *Per1-luc* circadian expression, liver cultures were treated with BAPTA-AM. In previous work, the use of this chelator promoted damping of *Per1-luc* rhythm in suprachiasmatic nucleus explants [26]. Representative rhythms of *Per1-luc* expression in liver explants from AL and FR groups treated with BAPTA-AM are shown in Figure 3A. A significant τ lengthening (BAPTA-AM: AL = 25.4 \pm 0.5 h and FR = 25.2 \pm 0.7 h vs. DMSO: AL = 23.8 \pm 0.3 h and FR = 23.9 \pm 0.2 h; Bonferroni post-test $p < 0.001$; Figure 3B) was observed when BAPTA treatment was applied to the liver explants in both groups. The BAPTA-AM action was reversed after the change of culture medium (washout: AL = 24.3 \pm 1.0 h and FR = 24.1 \pm 0.9 h; Figure 3B).

Thapsigargin altered the period of *Per1-luc* expression in AL and FR rats

Thapsigargin has been widely used as a potent SERCA inhibitor in many types of cells and experimental conditions [30]. Thapsigargin treatment promoted a large increase in the period of *Per1-luc* expression in liver cultures from both AL and FR animals (Figure 4A). Quantification of these actions revealed a significantly lengthened period of *Per1-luc* expression (AL = 31.4 \pm 1.0 h and FR = 29.9 \pm 1.7 h vs. DMSO; Bonferroni post-test $p < 0.001$; Figure 4B). This effect was eliminated by the washout of the drug in both groups (AL = 24.1 \pm 1.0 h and FR = 24.1 \pm 0.9 h vs. DMSO; $p = 0.58$; Figure 4B).

2-APB altered the period of *Per1-luc* expression in liver explants from AL and FR rats

2-APB is commonly used as an inhibitor of IP₃Rs [25,31]. As was the case with BAPTA-AM and thapsigargin, exposure of liver explants from both AL and FR rats to 2-APB significantly lengthened the period of *Per1-luc* expression (Figure 5A; AL = 27.7 \pm 0.6 h and FR = 27.9 \pm 0.3 h vs. DMSO; Bonferroni post-test $p < 0.001$; Figure 5B). As with BAPTA-AM and thapsigargin treatments, this effect was abolished when the drug was removed (AL = 25.2 \pm 0.8 h and FR = 24.6 \pm 0.7 h; $p = 0.65$; Figure 5B).

Ryanodine lengthened the period of *Per1-luc* expression in liver explants from AL but not FR rats

The open probability of the RyR increases in response to ryanodine in the nM range, a state of subconductance is adopted when ryanodine is between 1 and 10 μ M, and the channel is inhibited at higher concentration (80-100 μ M) [32]. Surprisingly, treatment of the liver cultures with an inhibitory concentration of ryanodine only affected the *Per1-luc* period of the AL group (ryanodine

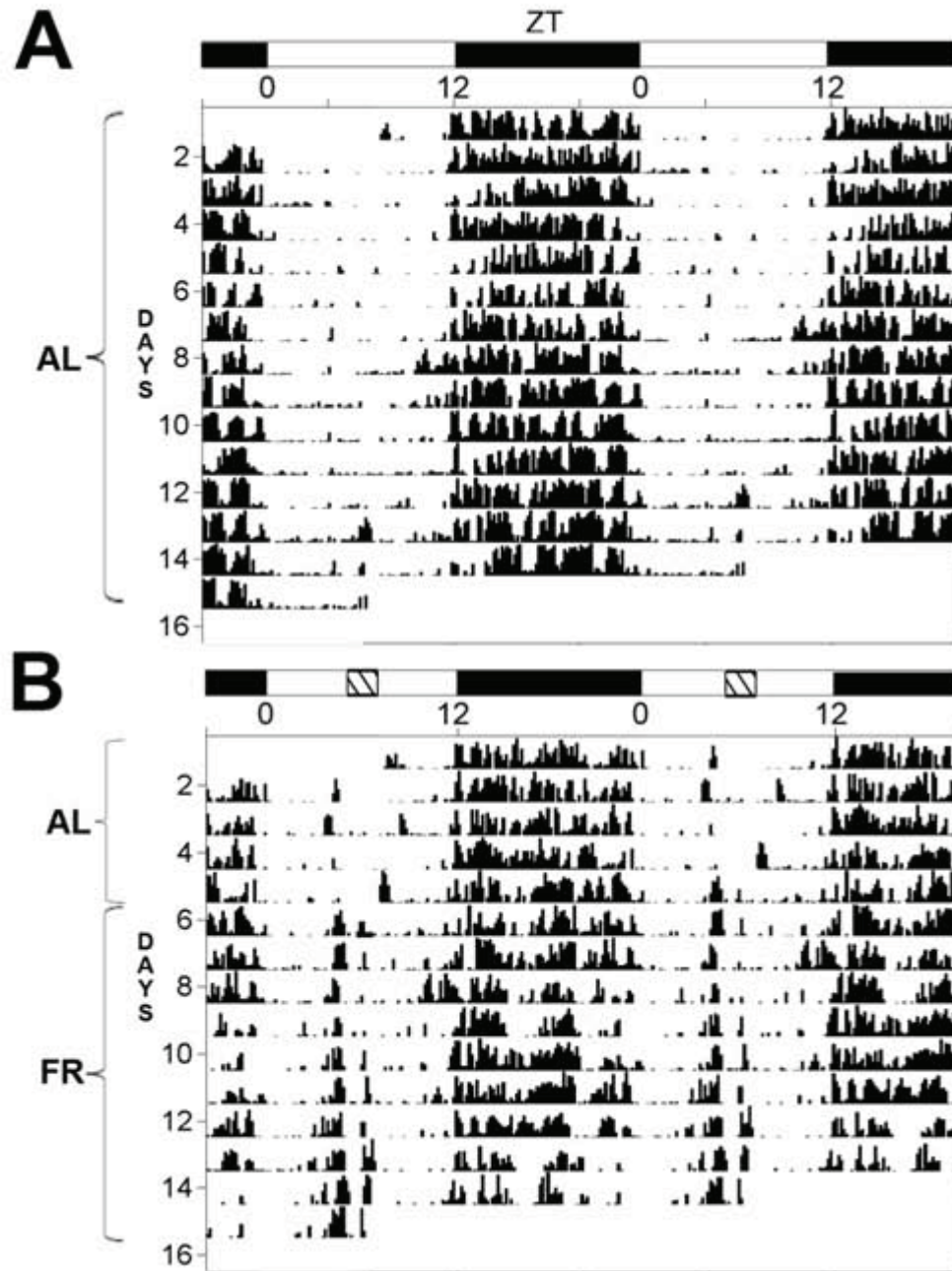
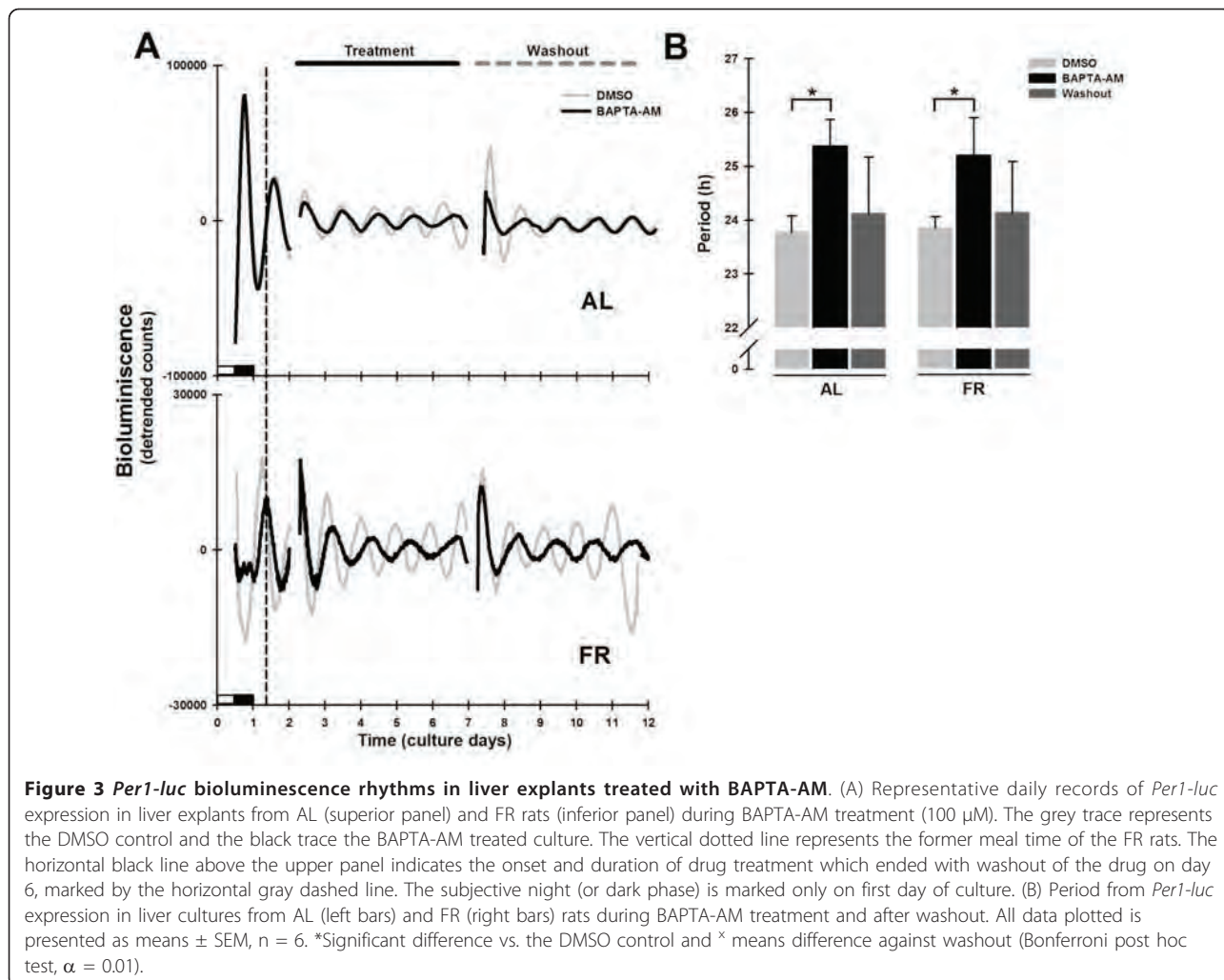
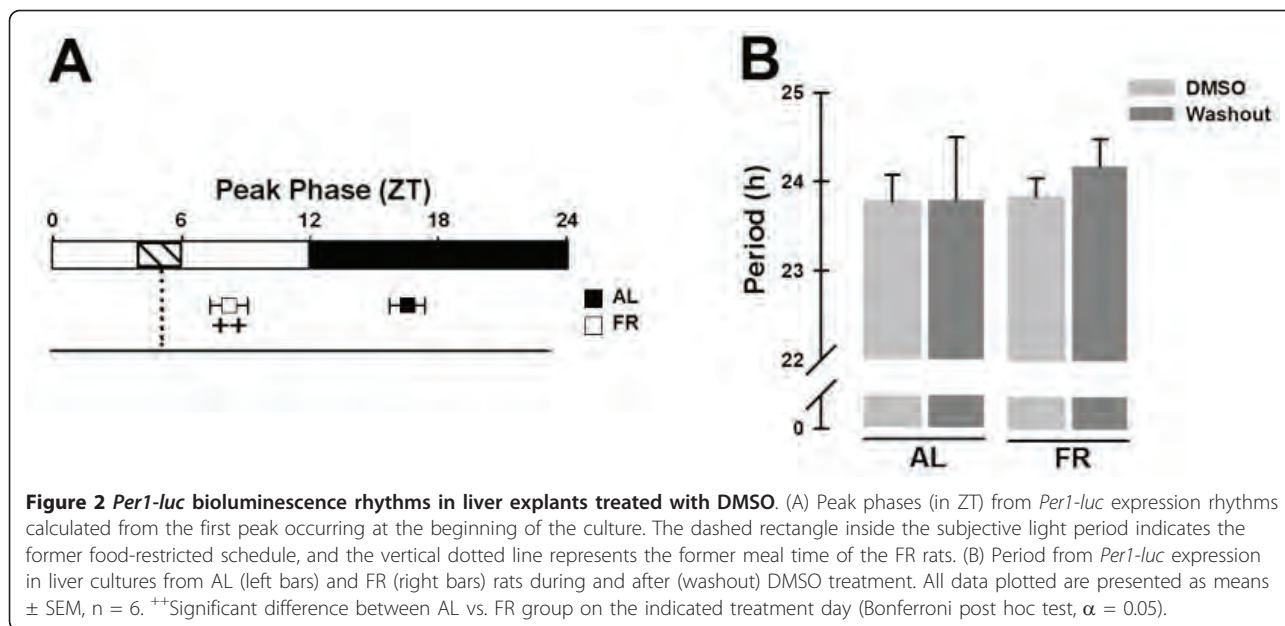


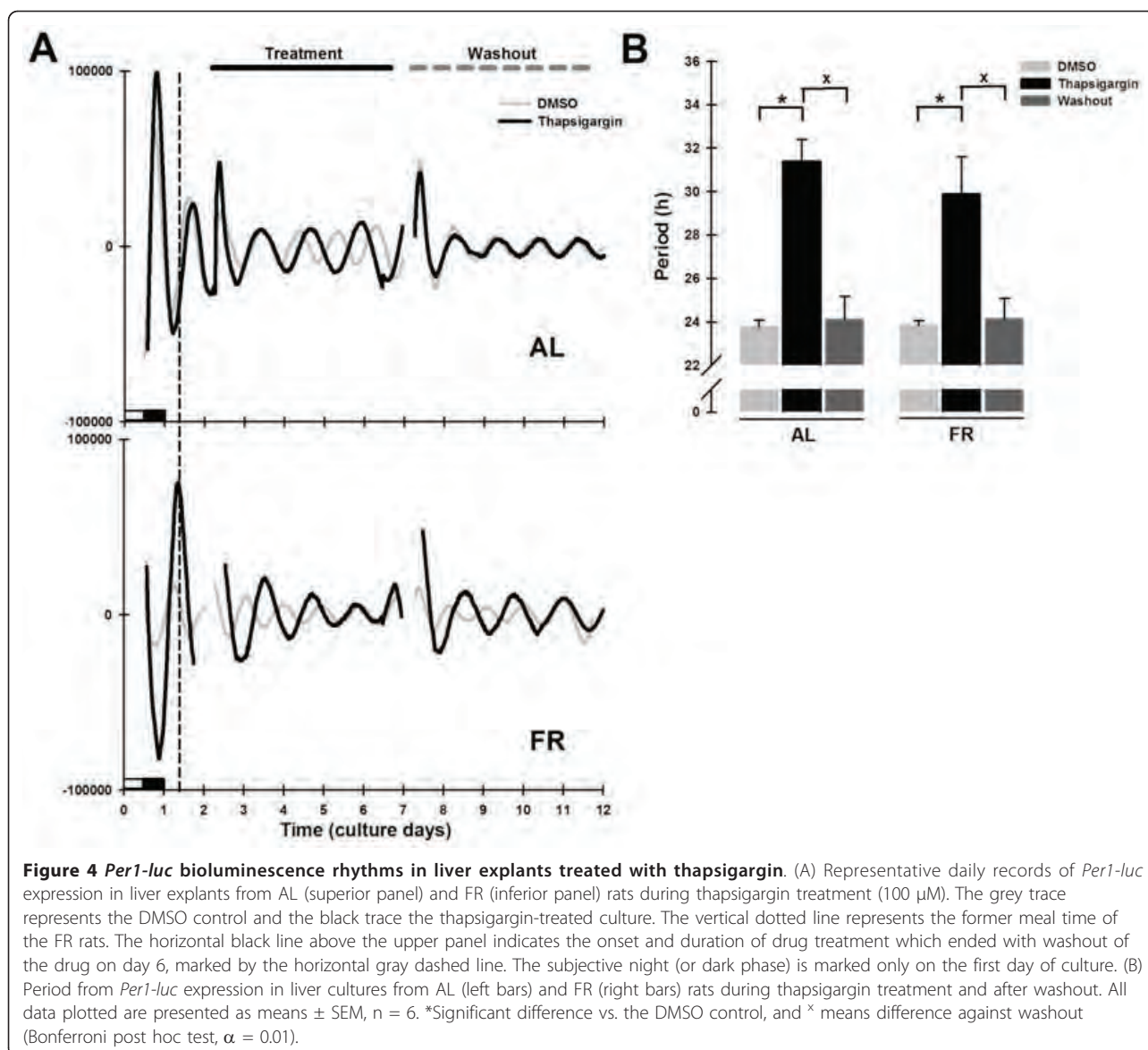
Figure 1 Representative double-plotted actograms of locomotor activity from *Per1-luc* transgenic rats fed ad-libitum or under restricted feeding in a 12:12 h light:dark cycle. In the first 5 days all rats were allowed free access to food; one group continued this condition from day 6 to day 15 (A) while another group (B) had a restricted feeding schedule with food available from ZT4 to ZT6 (indicated by the hatched box at the top of the figure inside the bar indicating the L:D cycle). These data are representative of 6 animals.

AL = 26.5 ± 1.6 h, AL = 23.8 ± 0.3 h vs. DMSO; Bonferroni post-test $p < 0.001$; Figure 6). The period was longer than that observed for DMSO during treatment, but returned to basal values after washout (washout AL = 23.7 ± 0.4 h, AL = 23.8 ± 0.3 h vs. DMSO; $p = 0.32$; Figure 6B).

Discussion

We tested the hypothesis that intracellular calcium plays a role in the regulation of the rhythmicity of hepatic *Per1-luc* under *ex vivo* conditions. Our data clearly show that the IP_3R , RyR, and SERCA inhibitors and intracellular calcium fluctuations altered the daily expression of *Per1-luc*

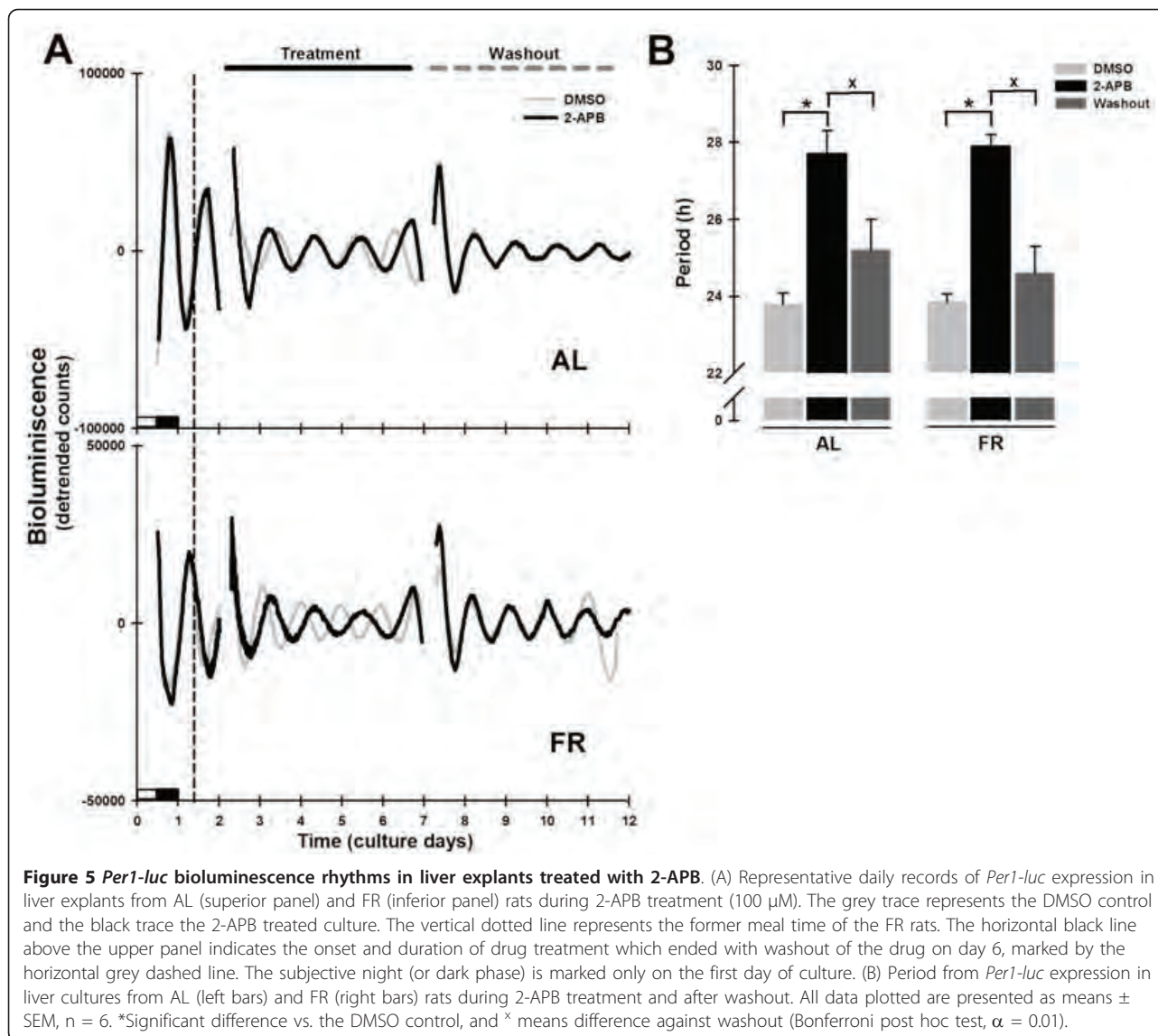




in liver explants. Furthermore, the pharmacological action of ryanodine was dependent upon feeding condition.

It has been reported that intracellular calcium plays diverse roles as a component of the timing system by regulating the entrainment process [25,33], clock gene expression [34,35], and output signaling [36]. Diurnal fluctuations of cytoplasmic calcium [37] as well of RyR and IP₃R have been observed in the SCN [38,39]. Supporting the importance of intracellular calcium dynamics in the rhythmicity of the SCN, calcium buffering (with concentrations over 40 μM of BAPTA-AM) or low calcium levels (Ca²⁺-free media) promoted damping of *Per1-luc* expression in a dose-dependent manner in SCN explants [26]. In NIH3T3 and rat1-fibroblast cell cultures, thapsigargin and calimycin (a calcium ionophore) increased *Per1* expression during the first hours of treatment [35,40].

Fluctuations of cytoplasmic calcium codify a message that is interpreted in a spatio-temporal manner by metabolic and transcription factors, thus regulating a variety of cellular processes associated with cell proliferation, apoptosis, biochemical control, and gene expression. This fine-tuned handling of intracellular calcium is the result of a coordinated activation of ion channels, metabolic pumps, and exchangers in organelles such as the endoplasmic reticulum, mitochondria, and nucleus [21]. A role for calcium in the regulation of circadian rhythms and activation of clock-gene proteins has already been reported in protozoa (*Euglena gracilis* and *Paramecium multimicronucleatum*), mollusks (*Bulla gouldiana*) [41-43], plants (*Arabidopsis thaliana*) [44], insects (*Drosophila melanogaster*) [45], and in the mammalian SCN [24,37]. However, the precise regulatory

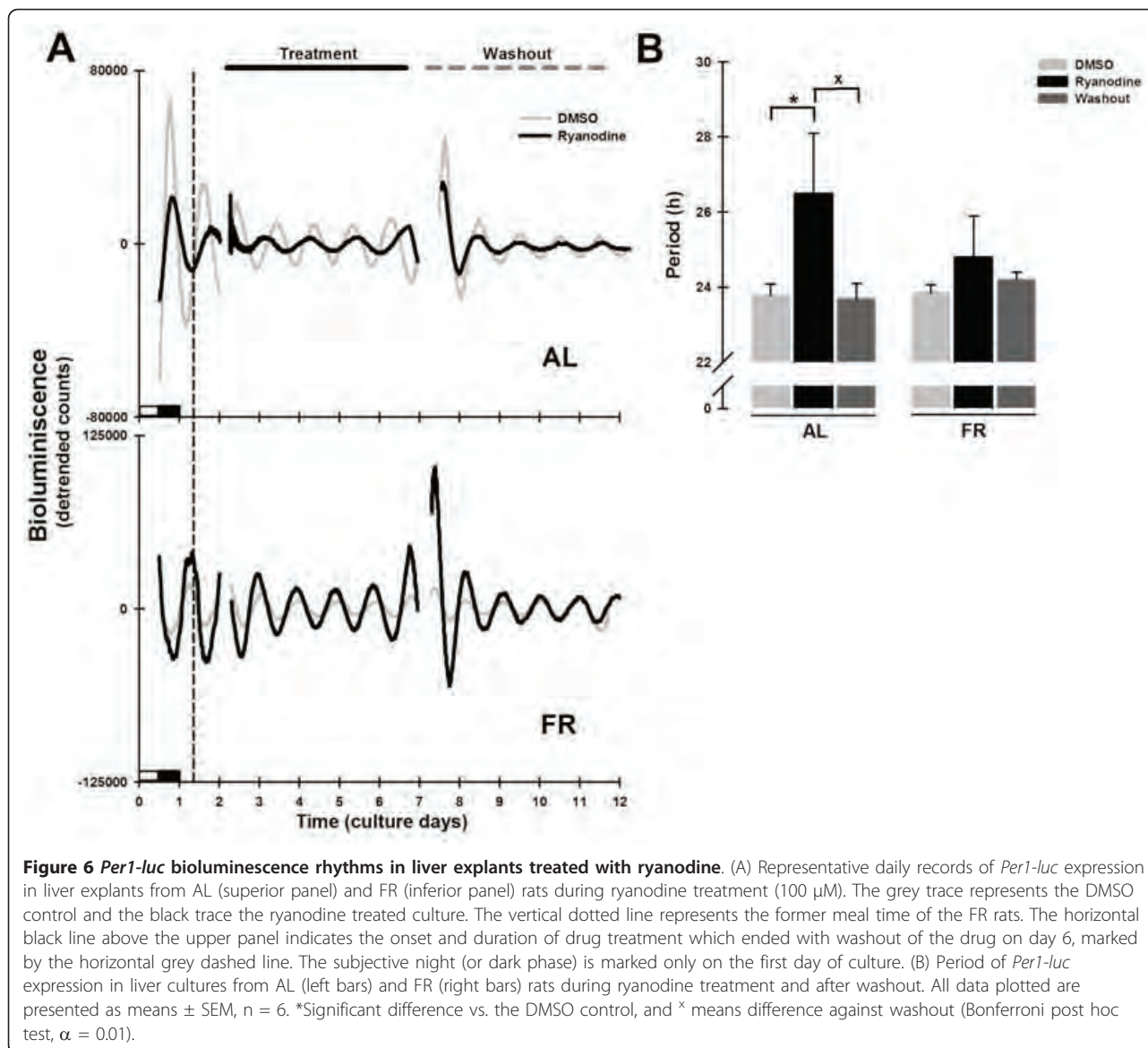


role for calcium dynamics in the function of the molecular clock in the liver has not been described.

The liver is a complex organ formed by several cellular types. Even the most prevalent population, that of hepatocytes, varies with anatomical localization and metabolic performance (periportal and pericentral cells). So far, it is not known if the molecular clock in the liver is equally distributed throughout the entire organ, though our preliminary data in experiments done *in vivo* suggest zone-specific expression of PER1 protein in the hepatic parenchyma (data not shown). The subcellular distribution of the endoplasmic reticulum also changes within the hepatocytes, and potentially the intracellular location of the IP₃R, RyR, and SERCA. Different isoforms of calcium-release channels are situated in regions of the endoplasmic reticulum next to the

plasma membrane (IP₃R type II), or around the nucleus (IP₃R type I and RyR) [22]. The heterogeneity of these calcium-handling proteins might underlie a complex interaction between the molecular clock, the intracellular calcium dynamics, and eventually the circadian control of liver metabolic activity. Also, the calcium content of the endoplasmic reticulum is important for the regulation of metabolic pathways, the cell cycle, and cancer progression [46].

The treatments of liver explants from AL and FR rats with BAPTA, 2-APB, and thapsigargin resulted in a lengthening in the *Per1-luc* period. However, the alteration in the period varied from ~1.5 h (with BAPTA-AM) to ~4 h (with 2-APB) and ~7 h (with thapsigargin). Our data strongly suggest that in the liver there exist different types of interactions between the intracellular



calcium dynamics and the molecular clock, ranging from mild (related to cytoplasmic calcium levels, with BAPTA-AM), to medium (related to the calcium pool released by IP₃R, as with 2-apb), and strong (related to the calcium content within the endoplasmic reticulum, as observed with thapsigargin treatment). Therefore, it is well known that these interactions between the handling of intracellular calcium and the molecular clock of the liver are independent of the type of circadian synchronization (by light or by meal) and the feeding protocol (AL or FR). In contrast, the period of *Per1-luc* expression was lengthened during RyR inhibition only in explants from AL animals. No effect was observed when ryanodine was added to explants from FR animals. This fact implies that during the restricted

feeding schedule, the period of *Per1-luc* expression is no longer dependent on the calcium released by the RyR. In a different set of experiments, we observed that the 24-h rhythmicity of [³H]-ryanodine binding to liver microsomal membranes in the daytime FR protocol showed an increase in amplitude, without change in phase (data not shown). This result suggests that the rhythmic properties of the RyR change as a consequence of FR schedule/FEO expression. In addition, the damping rate and the relative amplitude of the *Per1-luc* rhythm were not changed by the treatments (data not shown).

The changes in *Per1-luc* period rhythmicity associated with drug treatments could not be interpreted in terms of “after-effects”. An “after-effect” is a transient change

in the free-running period of an oscillator after a defined period of prior entrainment [47].

The influence of intracellular calcium on liver *Per1-luc* rhythmicity could be explained by transcriptional regulation of the mRNA for this clock gene or by modulation of the phosphorylation status of PER1 protein. For example, a hypo-phosphorylated state of PER1 delays its degradation and slows the rest of the circadian network [48]. As shown previously by Oh-hashi et al. [35], a significant increase in *Per1* and *Per2* transcription (also *Cry1* as discussed in this report) occurred 1 h after NIH3T3 cells were treated with 0.5 μ M thapsigargin. A reduction in cytoplasmic calcium availability is expected with all pharmacological treatments, since BAPTA-AM buffers transient elevations of free intracellular calcium concentration, thapsigargin promotes a depletion of the internal calcium deposits, and the inhibition of IP₃R and RyR hinders the release of calcium. The decrease in intracellular calcium could change *Per1-luc* rhythmicity by modifying the function of other clock genes/proteins such as *Cry1* or the casein kinase I epsilon (CKI ϵ), which acts as a negative transcriptional regulator of *Per1* expression or as a PER1-phosphorylating element that promotes proteosomal degradation [48]. Elevation of intracellular calcium concentration and the AMP/ATP ratio activate the 5'-AMP kinase (AMPK), which has been proposed as a metabolic sensor capable of coordinating the circadian clockwork of peripheral oscillators through phosphorylation of *Cry1* and CKI ϵ , allowing a rapid degradation of *Per1* expression and shortening of the period [33,49]. It has been suggested that CamKII (calcium/calmodulin-dependent protein kinase II) could mediate the coupling between intracellular calcium levels and the circadian clock, since it promotes the expression of *Per1* in the SCN in a calcium-dependent process [27,50]. For example, a role for this calcium-sensitive protein in regulating the circadian oscillations driven by CLOCK/CYCLE has been reported in reconstituted tissue cultures from *D. melanogaster* [51]. In addition, there is evidence that buffering intracellular calcium can lengthen the *in vivo* locomotor activity of the fruit fly [50]. These data correlate with our results showing that a decrease in intracellular calcium has a slowing effect on the period.

Conclusion

Our data support the notion that intracellular calcium dynamics can act as a link between the internal metabolic cues and the circadian clock in the liver. Several drugs that interfere with endoplasmic reticulum-calcium homeostasis slowed the period of the hepatic clock gene *Per1*. We conclude that intracellular calcium dynamics are a key element in the mechanisms that coordinate proper function of the hepatic clock, acting through

modification of the timing system in the liver, and in some cases, also according to the feeding condition.

Acknowledgements

We thank Dr. Michael Menaker for allowing us to develop the present work in his laboratory, for the supply of *Per1-luc* transgenic rats, and for helpful discussions. We also thank Dr. Michael Sellix for his support in writing this manuscript and for his technical expertise. The skilled technical assistance of Naomi Ihara and Denise T. Holmes is also acknowledged. We thank Dr. Chris Colwell (UCLA) and Dr. Raúl Aguilar-Roblero (UNAM) for critical comments and suggestions, as well as Dr. Dorothy Pless and Dr. Michael Jeziorski for their assistance with the manuscript.

This study was supported by CONACYT (México, U-49047). A.B-R is a Ph.D. student from the program in Biomedical Sciences of the Universidad Nacional Autónoma de México.

Authors' contributions

ABR and MDM designed and conducted the study, analyzed the data, and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 28 April 2011 Accepted: 8 July 2011 Published: 8 July 2011

References

1. Menaker M, Takahashi JS, Eskin A: **The physiology of circadian pacemakers.** *Ann Rev Physiol* 1978, **40**:501-526.
2. Ko CH, Takahashi JS: **Molecular components of the mammalian circadian clock.** *Hum Mol Genet* 2006, **15**:R271-R277.
3. Yagita K, Yamaguchi S, Tamanini F, van der Horst GT, Hoeijmakers JH, Yasui A, Loros JJ, Dunlap JC, Okamura H: **Dimerization and nuclear entry of mPer proteins in mammalian cells.** *Genes Develop* 2000, **14**:1353-1363.
4. Landry GJ, Yamakawa GR, Webb IC, Mear RJ, Mistleberger RE: **The dorsomedial hypothalamic nucleus is not necessary for the expression of the circadian food-anticipatory activity in rats.** *J Biol Rhythms* 2007, **22**:467-478.
5. Fuller PM, Lu J, Saper CB: **Differential rescue of light-and food-entrainable circadian rhythms.** *Science* 2008, **320**:1074-1077.
6. Pezuk P, Mohawk JA, Yoshikawa T, Sellix MT, Menaker M: **Circadian organization is governed by extra-SCN pacemakers.** *J Biol Rhythms* 2010, **25**:432-442.
7. Davidson AJ, Castañón C, Stephan FK: **Daily oscillations in liver function: diurnal vs circadian rhythmicity.** *Liver Int* 2004, **24**:179-186.
8. Angeles-Castellanos M, Mendoza J, Díaz-Muñoz M, Escobar C: **Food entrainment modifies the c-Fos expression pattern in brain stem nuclei of rats.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005, **288**:678-684.
9. Stokkan KA, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, Menaker M: **Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding.** *Science* 2001, **291**:490-493.
10. Escobar C, Díaz-Muñoz M, Encinas F, Aguilar-Roblero R: **Persistence of metabolic rhythmicity during fasting and its entrainment by restricted feeding schedules in rats.** *Am J Physiol* 1998, **274**:R1309-1316.
11. Díaz-Muñoz M, Vázquez-Martínez O, Aguilar-Roblero R, Escobar C: **Anticipatory changes of liver metabolism and entrainment of insulin, glucagon and corticosterone in food-restricted rats.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000, **279**:R48-R56.
12. Báez-Ruiz GA, Vázquez-Martínez O, Escobar C, Aguilar-Roblero R, Díaz-Muñoz M: **Metabolic adaptation or liver mitochondria during restricted feeding schedules.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005, **289**:G1015-G1023.
13. Martínez-Merlos MT, Angeles-Castellanos M, Díaz-Muñoz M, Aguilar-Roblero R, Mendoza J, Escobar C: **Dissociation between adipose tissue signals, behavior and the food-entrained oscillator.** *J Endocrinol* 2004, **181**:53-63.
14. Díaz-Muñoz M, Vázquez-Martínez O, Báez-Ruiz A, Martínez-Cabrera G, Soto-Abraham MV, Avila-Casado MC, Larriva-Sahd J: **Daytime food restrictions alters liver glycogen, triacylglycerols, and cell size. A histochemical, morphometric, and ultrastructural study.** *Comp Hepatol* 2010, **9**:5.

15. Rivera-Zavala JB, Báez-Ruiz A, Díaz-Muñoz M: **Changes in the 24 h rhythmicity of liver PPARs and peroxisomal markers when feeding is restricted to two daytime hours.** *PPAR Res* 2011.
16. Bass J, Takahashi JS: **Circadian integration of metabolism and energetics.** *Science* 2010, **330**:1349-1354.
17. Froy O: **The circadian clock and metabolism.** *Clin Sci* 2011, **120**:65-72.
18. Asher G, Schibler U: **Crosstalk between components of circadian and metabolic cycles in mammals.** *Cell Metab* 2011, **13**:125-37.
19. Eckel-Mahan K, Sassone-Corsi P: **Metabolism control by the circadian clock and vice versa.** *Nature Struct Mol Biol* 2009, **16**:462-467.
20. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL: **Calcium signalings: dynamics, homeostasis and remodeling.** *Nature Mol Cell Biol* 2003, **4**:517-529.
21. Uhlén P, Fritz N: **Biochemistry of calcium oscillations.** *Biochem Biophys Res Commun* 2010, **396**:28-32.
22. Barrit GJ, Chen J, Rychkov GY: **Ca²⁺-permeable channels in the hepatocyte plasma membrane and their roles in hepatocyte physiology.** *Biochem Biophys Acta* 2008, **1783**:651-672.
23. Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block GD, Sakaki Y, Menaker M, Tei H: **Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats.** *Science* 2000, **28**:682-685.
24. Ikeda M, Sugiyama T, Wallace CS, Gompf HS, Yoshioka T, Miyawaki A, Allen C: **Circadian dynamics of cytosolic and nuclear Ca²⁺ in single suprachiasmatic nucleus neurons.** *Neuron* 2003, **38**:253-263.
25. Hamada T, Liou SY, Fukushima T, Maruyama T, Watanabe S, Mikoshiba K, Ishida N: **The role of Inositol trisphosphate-induced Ca²⁺ release from IP₃ receptor in the rat suprachiasmatic nucleus on circadian entrainment mechanism.** *Neurosci Lett* 1999, **263**:125-128.
26. Lundkvist GB, Kwak Y, Hajime T, Block GD: **A calcium flux is required for circadian rhythm generation in mammalian pacemaker neurons.** *J Neurosci* 2005, **25**:7682-7686.
27. Nomura K, Takeuchi Y, Yamaguchi S, Okamura H, Fukunaga K: **Involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the induction of mPer1.** *J Neurosci Res* 2003, **72**:384-392.
28. Refinetti R, Cornélissen G, Halberg F: **Procedures for numerical analysis of circadian rhythms.** *Biol Rhythm Res* 2007, **38**:275-325.
29. Davidson AJ, Poole AS, Yamazaki S, Menaker M: **Is the food-entrainable oscillator in the digestive system?** *Genes Brain Behav* 2003, **2**:32-39.
30. Treiman M, Caspersen C, Christensen SB: **A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase.** *Trends Pharmacol Sci* 1998, **19**:131-135.
31. Chen J, Tao R, Sun H, Tse H, Lau C, Li G: **Multiple Ca²⁺ signaling pathways regulate intracellular Ca²⁺ activity in human cardiac fibroblasts.** *J Cell Physiol* 2010, **223**:68-75.
32. Chu A, Díaz-Muñoz M, Hawkes MJ, Brush K, Hamilton SL: **Ryanodine as a probe for the functional state of the skeletal muscle sarcoplasmic reticulum calcium release channel.** *Mol Pharmacol* 1990, **37**:735-741.
33. Ding JM, Buchanan GF, Chen D, Kuriashkina L, Faiman LE, Alster JM, McPherson PS, Campbell KP, Gillette MU: **A neural ryanodine receptor mediates light-induced phase delays of the circadian clock.** *Nature* 1998, **394**:381-384.
34. Lamia KA, Sachdeva UM, DiTacchio L, Williams EC, Alvarez JG, Egan DF, Vasquez DS, Juguilon H, Panda S, Shaw RJ, Thompson CB, Evans RM: **AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation.** *Science* 2009, **326**:437-440.
35. Oh-hashii K, Naruse Y, Tanaka M: **Intracellular calcium mobilization induces period genes via MAP kinase pathways in NIH3T3 cells.** *FEBS Lett* 2002, **516**:101-105.
36. Aguilar-Roblero R, Mercado C, Alamilla J, Laville A, Díaz-Muñoz M: **Ryanodine receptor Ca²⁺ release channels are an output pathway for the circadian clock in the rat suprachiasmatic nuclei.** *Eur J Neurosci* 2007, **26**:575-582.
37. Colwell CS: **Circadian modulation of calcium levels in cells in the suprachiasmatic nucleus.** *Eur J Neurosci* 2000, **12**:571-576.
38. Díaz-Muñoz M, Dent M, Granados-Fuentes D, Hall AC, Hernández-Cruz A, Harrington M, Aguilar-Roblero R: **Circadian modulation of the Ryanodine receptor type 2 in the SCN of rodents.** *Neuroreport* 1999, **10**:481-486.
39. Hamada T, Niki T, Ziging P, Sugiyama T, Watanabe S, Mikoshiba K, Ishida N: **Differential expression patterns of Inositol trisphosphate receptor types 1 and 3 in the rat suprachiasmatic nucleus.** *Brain Res* 1999, **838**:131-135.
40. Balsalobre A, Maecacci L, Schibler U: **Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured rat-1 fibroblast.** *Curr Biol* 2000, **10**:1291-1294.
41. Goto K, Laval-Martin DL, Edmunds LN: **Biochemical modeling of an autonomously oscillatory circadian clock in *Euglena*.** *Science* 1985, **228**:1284-1288.
42. Khalsa SB, Ralph MR, Block GD: **The role of extracellular calcium in generating and in phase-shifting the Bulla ocular circadian rhythm.** *J Biol Rhythms* 1993, **8**:125-139.
43. Hasegawa K, Kikuchi H, Ishizaki S, Tamura A, Tsukahara Y, Nakaoka Y, Iwai E, Sato T: **Simple fluctuation of Ca²⁺ elicits the complex circadian dynamics of cyclic AMP and cyclic GMP in *Paramecium*.** *J Cell Sci* 1999, **112**:201-207.
44. Xu X, Hotta CT, Dodd AN, Love J, Sharrock R, Lee YW, Xie Q, Johnson CH, Webb AA: **Distinct light and clock modulation of cytosolic free Ca²⁺ and rhythmic Chlorophyll A/B binding protein 2 promoter activity in *Arabidopsis*.** *Plant Cell* 2007, **19**:3474-3490.
45. Harrisling MC, Wu Y, Lnenicka GA, Nitabach MN: **Intracellular Ca²⁺ regulates free-running circadian clock oscillations *In Vivo*.** *J Neurosci* 2007, **27**:12489-12499.
46. Bergner A, Huber RM: **Regulation of the endoplasmic reticulum Ca²⁺-store in cancer.** *Anticancer Agents Med Chem* 2008, **8**:705-709.
47. Pittendrigh C, Daan S: **A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents.** *J Comp Physiol* 1976, **106**:223-252.
48. Harms E, Young MW, Saez L: **Posttranscriptional and posttranslational regulation of clock genes.** *J Biol Rhythms* 2004, **19**:361-373.
49. Um JH, Yang S, Yamazaki S, Kang H, Viollet B, Foretz M, Chung JH: **Activation of 5'-AMP-activated kinase with diabetes drug metformin induces casein kinase I epsilon (CKIepsilon)-dependent degradation of clock protein mPer2.** *J Biol Chem* 2007, **282**:20794-20798.
50. Harrisling MC, Nitabach MN: **Integrating circadian timekeeping with cellular physiology.** *Cell* 2008, **320**:879-880.
51. Weber F, Hung H, Maurer C, Kay SA: **Second messenger and Ras/MAPK signaling pathways regulate CLOCK/CYCLE-dependent transcription.** *J Neurochem* 2006, **98**:248-257.

doi:10.1186/1740-3391-9-6

Cite this article as: Báez-Ruiz and Díaz-Muñoz: Chronic inhibition of endoplasmic reticulum calcium-release channels and calcium-ATPase lengthens the period of hepatic clock gene *Per1*. *Journal of Circadian Rhythms* 2011 **9**:6.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

