



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO GLUCONEOGÉNICO HEPÁTICO
DURANTE LA EXPRESIÓN DEL OSCILADOR SINCRONIZADO POR ALIMENTO

TESIS

Que para optar por el grado de:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

MOISÉS PÉREZ MENDOZA

DIRECTOR DE TESIS
DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ
Instituto de Neurobiología, UNAM

COMITÉ TUTOR
DRA. MARIA LUISA FANJUL DE MOLES
Facultad de Ciencias, UNAM

DRA. CAROLINA ESCOBAR BRIONES
Facultad de Medicina, UNAM

QUERÉTARO, QRO. 2014



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.

Esta tesis fue financiada por el CONACYT (U-49047) y PAPIIT (IN201209). Moisés Pérez Mendoza fue estudiante del Programa de Ciencias Biomédicas (UNAM) y contó con el apoyo de una beca de CONACYT (215711). Fue realizada en el laboratorio de Fisiología Celular, Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología, UNAM-Campus Juriquilla bajo la tutoría del Dr. Mauricio Díaz Muñoz.

Sofía Mendoza Olvera y Moisés Pérez Vázquez

Mis Padres

Emilia[†] y Raymundo[†] (paternos) y Paula[†] y Bonifacio[†] (maternos)

Mis Abuelitos

¡ Por guiarnos en este sendero de la vida !

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por todo el apoyo y formación en todos los sentidos que siempre me han dado. Por ser ese ejemplo de disciplina y perseverancia.

A mis hermanos por su cariño y apoyo en todo momento, gracias por ayudarme a crecer.

A usted Doc Mauricio, por sus enseñanzas, consejos, apoyo y amistad.

A mi comité tutor, la Dra. Carolina Escobar y la Dra. Ma. Luisa Fanjul por sus valiosos consejos y críticas oportunas en el desarrollo del proyecto.

A mi jurado de examen de grado, por sus valiosos comentarios y ajustes para con esta tesis

A la Dra. Olivia Vázquez-Martínez, por todo el apoyo en el manejo de las técnicas del laboratorio, en especial por la inmunohistoquímica y la obtención de imágenes en el microscopio de fluorescencia.

Al M. en N. Fernando López-Barrera, por todo el apoyo en la captura y análisis de imágenes de laminillas con la tinción de PAS/D en tejido de hígado y manejo del software ImageProPlus V 6.0.

A mis compañeros y amigos del laboratorio B11: Oli, Isa, Dalia, Adrián, Marlen, Vania, Braulio, Dalita, Elvira, Julieta, Christian, Héctor, Isaías, Cristina y Raúl, con quienes disfrute experiencias increíbles (esos LabMeetings) durante estos años. Les deseo lo mejor a todos en sus proyectos profesionales y de vida.

Pero más aún, a mis hijos y esposa que siempre han estado conmigo, apoyándome y sugiriéndome lo mejor: Sarah, Elías y Paloma las personas que me mueven todos los días a ser mejor en todos los sentidos.

AGRADECIMIENTOS.....	4
LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	10
PRESENTACION.....	12
1. INTRODUCCION.....	14
2. ANTECEDENTES.....	15
Ritmos biológicos.....	15
Ritmos entrenados o endógenos.....	16
Clasificación de los ritmos biológicos.....	18
Reloj biológico.....	19
Maquinaria molecular del reloj circadiano en mamíferos.....	20
ARTÍCULO 1. El acceso restringido a la alimentación como un sistema experimental para estudiar la regulación circadiana del metabolismo durante el ciclo de ayuno-realimentación.....	21
ARTICULO 2. Gluconeogenesis: una visión contemporánea de una vía metabólica antigua.....	48
Procesos de regulación fisiológica.....	60
Homeostasis.....	60
Reostasis.....	60
Cronostasis.....	61
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	62
4. HIPÓTESIS.....	63
5. OBJETIVO GENERAL.....	63
Objetivos particulares.....	63

6. RESULTADOS.....	64
ARTÍCULO 3 – Daytime restricted feeding modifies the daily variations of liver gluconeogenesis: Adaptations in biochemical and endocrine regulators	64
7. DISCUSIÓN.....	78
8. CONCLUSIONES	85
Perfil Temporal	85
Gluconeogénesis a partir de alanina (ATT)	85
Tolerancia a glucosa (GTT)	86
Zonación hepática	86
Perfil Hormonal	86
9. PERSPECTIVAS	87
10. REFERENCIAS	88

LISTA DE ABREVIATURAS

NSQ	Núcleo supraquiasmático
OSA	Oscilador sincronizado por alimento
CAA	Conducta de anticipación al alimento
HRA	Horario restringido de alimentación
G6Pasa	Glucosa-6-fosfatasa
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carbocquinasa
GYS	Glucógeno sintasa
pGYS	Glucógeno sintasa fosforilada
SIRT1	Sirtuina 1 o Silent Information Regulator T1
PGC-1 α	PPAR gama coactivador tipo 1 alfa
PER	Periodo
CRY	Criptocromo
REB-ERV α	Receptor nuclear de la subfamilia 1, grupo D, miembro 1 o NR1D1
CLOCK	Circadian locomotor output cycles kaput
BMAL1	Receptor nuclear translocador de aril hidrocarburos o ARNTL
RORA	Receptores nucleares tipo A
ATP	Adenosíntrifosfato
AGL	Ácidos grasos libres
CC	Cuerpos cetónicos
AL	Libre acceso al alimento
MA	Mercaptoacetato
MP	Metilpalmoxirato
TAG	Triacilglicéridos
G6P	Glucosa-6-fosfato
PP	Hepatocitos periportales
PC	Hepatocitos pericentrales
NAD ⁺	Nicotinamida
GNG	Gluconeogénesis

RESUMEN

La mayoría de los organismos exhiben ritmos diarios desde el nivel bioquímico hasta el conductual. En mamíferos, muchos ritmos fluctúan de forma circadiana (≈ 24 h), y son controlados por un sistema central que mide el tiempo. Este reloj se encuentra ubicado en el área anterior y ventral del hipotálamo, arriba del quiasma óptico, y es conocido como núcleo supraquiasmático (NSQ). El NSQ es sincronizado por ciclos de luz-oscuridad y su ritmicidad es comunicada a los osciladores periféricos, los cuales adoptan la fase dictada por este reloj central. Sin embargo, la fase de los osciladores periféricos se puede desacoplar del NSQ al restringirse el acceso al alimento, favoreciendo la expresión de otro oscilador, el cual es sincronizado por alimento (OSA). Hasta el momento se desconoce el sitio anatómico del OSA, y la lesión de numerosas estructuras cerebrales, entre ellas el NSQ, no han logrado abatir la conducta de anticipación al alimento (CAA), una característica conductual del OSA, ni la ritmicidad en órganos periféricos de algunos metabolitos sincronizados al alimento, demostrando que este oscilador es independiente del marcapasos central. También se ha visto que la ritmicidad en tejidos periféricos (como el hígado) de los genes y proteínas reloj (Per1, Per2, entre otros) y los niveles de glucocorticoides circulantes bajo un horario restringido de alimentación (HRA), presentan patrones oscilatorios asociados al tiempo de acceso al alimento. Nuestro laboratorio ha reportado que la respuesta fisiológica HRA, implica una adaptación de varios órganos, entre los cuales el hígado presenta un papel destacado. La adaptación (reostasis) que el organismo muestra, cuando se expresa el OSA, implica un periodo de intensa ingesta de alimento (dos horas) seguido de un periodo de ayuno largo (22 h). Esto conlleva un estado metabólico diferente al de animales sometidos a diferentes periodos de ayuno (1 y 2 días) y alimentación *ad libitum*.

Se exploró la respuesta gluconeogénica hepática en ratas bajo HRA en los siguientes perfiles temporales de: 1) la actividad de la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa) y fosfoenolpiruvato carbociquinasa (PEPCK), tanto como su distribución periportal y pericentral, 2) conversión de alanina a glucosa, 3) glucemia y contenido de glucógeno hepático, 4) presencia de glucógeno sintasa (GYS) y su forma fosforilada (en Ser641, pGYS), 5) niveles circulantes de corticosterona, glucagón e insulina, 6) prueba de tolerancia a glucosa y 7) presencia de sirtuina 1 (SIRT1) y PGC-1 α . Los resultados mostraron que el HRA promovió: 1) un cambio de fase en la actividad de G6Pasa y un incremento en la actividad de la PEPCK tanto como

un cambio en la presencia de PEPCCK de los hepatocitos periportales a pericentrales, 2) una conversión neta de alanina a glucosa circulante, 3) una disminución en los valores glucémicos y un cambio de fase en el contenido de glucógeno hepático, 4) un cambio de fase en GYS y un incremento de pGYS, 5) un incremento en los niveles diarios de corticosterona y glucagón, y una disminución en los niveles de insulina, 6) una homeostasis normal de glucosa en todos los grupos, y 7) una presencia aumentada de SIRT1 y PGC-1 α . Esto sugiere que la gluconeogénesis incrementada en el grupo bajo HRA promueve una síntesis de glucógeno hepático y la producción de glucosa. Estos resultados podrían ser una modulación del proceso gluconeogénico debido a adaptaciones reostáticas en lo endocrino, metabólico y regulación temporal del hígado, y podría ser asociada con la fisiología del oscilador sincronizado por alimento (OSA).

ABSTRACT

Most organisms exhibit daily rhythms from the biochemical to the behavioral level. In mammals, many circadian rhythms so fluctuate (≈ 24 h), and are controlled by a central system which measures time. This watch is located in the hypothalamus, above the optic chiasm, and is known as the suprachiasmatic nucleus (NSQ). The NSQ is synchronized by light-dark cycles and rhythmicity is communicated to the peripheral oscillators, which adopt the phase dictated by the central clock. However, the phase of the peripheral oscillators can be uncoupled from NSQ to restricted food access, favoring expression of one oscillator which is synchronized by food (FEO). So far, the anatomic site of the FEO, and the injury of many brain structures, including the NSQ is unknown, have failed to abate advance feed (FAA), a behavioral characteristic of FEO, or rhythmicity in peripheral organs of some synchronized to the feed metabolites, demonstrating that this oscillator is independent of the central pacemaker. It has also been seen that the rhythmicity in peripheral tissues (such as liver) genes and clock proteins (Per1, Per2, among others) and the levels of circulating glucocorticoids under a restricted feeding schedule (RFS) have oscillatory patterns associated with time access to food. Our laboratory has reported that the physiologic response to RFS, involves adaptation of various organs, including the liver has an important role. Adaptation (reosthesis) that the body takes when expressed FEO involves a period of intense food intake (two hours) followed by a long period of fasting (22 h). This greatly different from animals subjected to different periods of fasting (1 and 2 days) and fed ad libitum metabolic state.

We explored the hepatic gluconeogenic response in DRF rats by the temporal profiles of: 1) the activity of glucose 6-phosphatase (G6Pase) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), as well as the periportal and pericentral distribution of PEPCK, 2) conversion of alanine to glucose, 3) glycemia and liver glycogen content, 4) presence of glycogen synthase (GYS) and its phosphorylated form (at Ser641, pGYS), 5) circulating levels of corticosterone, glucagon, and insulin, 6) glucose-tolerance test, and 7) sirtuin 1 and PGC1- α . The results showed that DRF promoted: 1) a phase shift in G6Pase activity and an increase in PEPCK activity as well as a change of PEPCK from periportal to pericentral hepatocytes, 2) a net conversion of alanine to circulating glucose, 3) a decrease in glycemic values and a phase-shift in the liver glycogen content, 4) a phase-shift in GYS and an increase of pGYS, 5) an increase in the daily levels of corticosterone and glucagon, but a reduction in

the levels of insulin, 6) normal glucose homeostasis in all groups, and 7) an enhanced presence of SIRT1 and PGC-1 α . It is proposed that the increased gluconeogenic in DRF group promotes synthesis of hepatic glycogen and the production of glucose. These results could be a modulation of the gluconeogenic process due to rheostatic adaptations in the endocrine, metabolic, and timing regulation of liver, and could be associated with the physiology of the food entrained oscillator (FEO).

PRESENTACION

La presente tesis tuvo como objetivo principal analizar las proteínas y hormonas en la gluconeogénesis por la alternancia ayuno-realimentación durante la alimentación restringida al día con la adaptación que muestra el hígado bajo la expresión del Oscilador Sincronizado por Alimento (OSA). Posteriormente, se exploró el papel de la otra vía involucrada en la glucemia (glucogenólisis) bajo la misma perspectiva que la gluconeogénesis como una integración de las vías de manejo de glucosa hepáticas (gluconeogénesis y glucogenólisis). La principal conclusión de este trabajo es que la gluconeogénesis hepática se mantuvo incrementada aportando glucosa circulante y promoviendo la producción de glucógeno en respuesta a la coordinación hormonal y transcripcional favorecida por la alimentación restringida durante el día.

En la sección de Antecedentes se describen a los ritmos biológicos y a su clasificación, al reloj u osciladores periféricos junto a su maquinaria molecular con la cual mantiene comunicación con el metabolismo en general y que es de gran importancia para la sincronización endógena o inducida externamente por el alimento como en este caso. Cabe señalar, que hay una sección que describe al acceso restringido a la alimentación y su efecto en la interacción reloj-metabolismo la cual esta detallada en el **Artículo 1** publicado como parte del **XL Taller de Actualización Bioquímica (TAB)**: Pérez-Mendoza M, Rivera-Zavala J, Valdés-Fuentes M, Vázquez-Martínez O, Díaz-Muñoz M. (2013). **El acceso restringido a la alimentación como un sistema experimental para estudiar la regulación circadiana del metabolismo durante el ciclo de ayuno-realimentación.** Mensaje Bioquímico. Vol. XXXVII, 41–68.

También, hay otra sección, una revisión de la vía gluconeogénica desde una perspectiva clásica, la interacción hormonal-transcripcional y el papel que juega el reloj circadiano sobre la expresión de las proteínas involucradas en la activación de la vía en sí, más a detalle en el **Artículo 2** publicado en la **Revista de Educación Bioquímica (REB)**: Pérez-Mendoza M, De Ita-Pérez D, Díaz-Muñoz M. (2012). **Gluconeogénesis: una visión contemporánea de una vía metabólica antigua.** REB 31(1):10-20.

Posteriormente, se centran los resultados principales de esta tesis como parte de la caracterización gluconeogénica hepática durante la expresión del oscilador sincronizado por alimento en el **Artículo 3** publicado en **Chronobiology International**: Pérez-Mendoza M,

Rivera-Zavala JB, Díaz-Muñoz M. (2014). **Daytime restricted feeding modifies the daily variations of liver gluconeogenesis: Adaptations in biochemical and endocrine regulators.** Chronobiol Int (Early online): 1-14.

1. INTRODUCCION

La mayoría de los organismos exhiben ritmos diarios desde el nivel bioquímico hasta el conductual. En mamíferos, muchos ritmos fluctúan de forma circadiana (≈ 24 h), y son controlados por un sistema central que mide el tiempo. Este reloj se encuentra ubicado en el área anterior y ventral del hipotálamo, arriba del quiasma óptico, y es conocido como núcleo supraquiasmático (NSQ; Balsalobre et al., 1998). El NSQ es sincronizado por ciclos de luz-oscuridad y su ritmicidad es comunicada a los osciladores periféricos, los cuales adoptan la fase dictada por este reloj central. Sin embargo, la fase de los osciladores periféricos se puede desacoplar del NSQ al restringirse el acceso al alimento, favoreciendo la expresión de otro oscilador, el cual es sincronizado por alimento (OSA; Krieger, 1974; Damiola et al., 2000; Hara et al., 2001). Hasta el momento se desconoce el sitio anatómico del OSA, y la lesión de numerosas estructuras cerebrales, entre ellas el NSQ, no han logrado abatir la anticipación al alimento (CAA), una característica conductual del OSA (Mistlberger, 1994; Stephan, 2002; Davidson, 2009), ni la ritmicidad en órganos periféricos de algunos metabolitos sincronizados al alimento (Davidson y Stephan, 1999), demostrando que este oscilador es independiente del marcapasos central (Stephan, 1992; Mistlberger, 1994). También se ha visto que la ritmicidad en tejidos periféricos (como el hígado) de los genes y proteínas reloj (Per1, Per2, entre otros) y los niveles de glucocorticoides circulantes bajo un horario restringido de alimentación (HRA), presentan patrones oscilatorios asociados al tiempo de acceso al alimento (Krieger, 1974; Escobar et al. 1998; Díaz-Muñoz et al. 2000; Yamazaki et al. 2000; Damiola et al. 2000; Balsalobre, 2000; Stokkan et al. 2001; Turek y Allada, 2002; Reddy et al. 2007; Luna-Moreno et al. 2009). Nuestro laboratorio ha reportado que la respuesta fisiológica al HRA, implica una adaptación de varios órganos, entre los cuales el hígado presenta un papel destacado. Entre los hallazgos que se han observado en el hígado son un incremento en la síntesis de ATP, un estado redox oxidado, aumento en la actividad mitocondrial, incremento en la expresión génica por microarreglos, aumento de ácidos grasos libres y cuerpos cetónicos, disminución de triacilglicéridos, cambios en los perfiles hormonales de glucacón, insulina, leptina, ghrelina, hormona de crecimiento, corticosterona y receptores de glucocorticoides (Escobar et al., 1998; Díaz-Muñoz et al., 2000; Martínez-Merlos et al., 2004; Báez-Ruiz et al., 2005; Luna-Moreno et al., 2007; Díaz-Muñoz et al., 2010; Rivera-Zavala et al., 2011; Luna-Moreno et al., 2012; Arellanes-Licea et al., 2014). La

adaptación cronostática que el organismo adopta, cuando se expresa el OSA, implica un periodo de intensa ingesta de alimento (dos horas) seguido de un periodo de ayuno largo (22 h). Esto conlleva un estado metabólico diferente al de animales sometidos a diferentes periodos de ayuno (1 y 2 días) y alimentación *ad libitum*.

2. ANTECEDENTES

Ritmos biológicos

La Tierra conjuntamente con los movimientos cíclicos de la Luna alrededor del Sol, genera variaciones periódicas ambientales, como los ciclos de luz-oscuridad, las mareas, las estaciones del año, entre otras. Debido a estas variaciones cíclicas ambientales y a la selección natural, la mayoría de los organismos actuales tienen la capacidad de anticiparse y adaptar su fisiología a estos cambios. A estas variaciones ambientales se les conoce también como ritmos biológicos, aunque la definición más acertada es la recurrencia de un fenómeno biológico en intervalos regulares de tiempo. Otras características frecuentemente usadas para describir un ritmo son tres: el periodo (τ) representa el tiempo requerido para completar un ciclo (milisegundos hasta más de un siglo), la amplitud (A) representa la distancia de la media del ritmo al pico o acrofase y la fase es la representación de cualquier punto temporal dentro del ritmo (Figura 1; Koukkari y Sothorn, 2006).

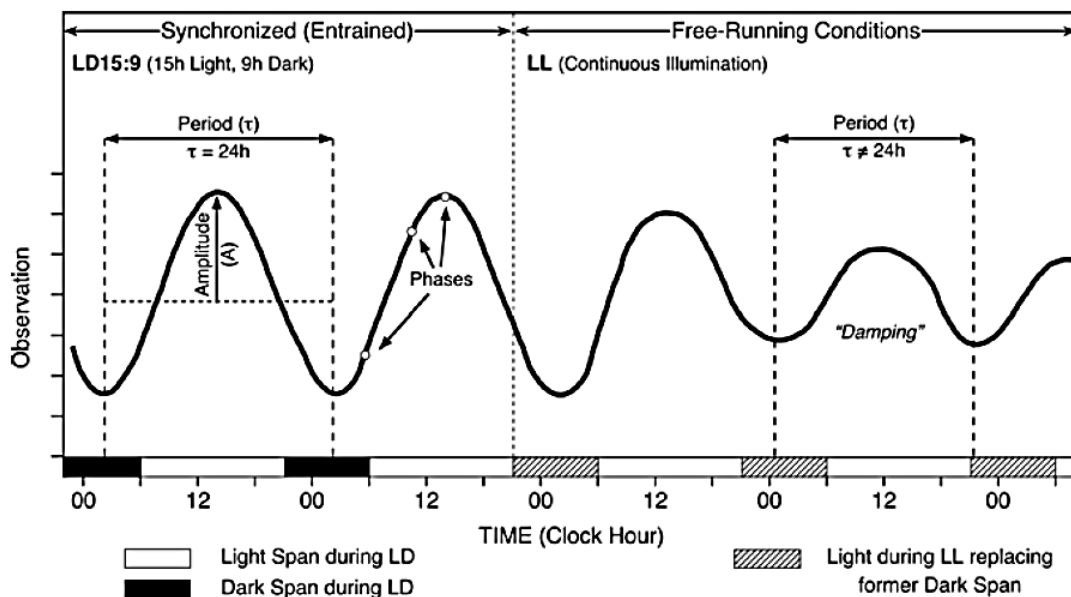


Figure 1. Representación de la terminología usada dentro de la cronobiología. A) en sincronización y B) en libre corrimiento. Tomada de Koukkari y Sothorn, 2006.

Ritmos entrenados o endógenos

El periodo medio de la rotación de la Tierra es cercano a 24 h, por eso se habla de ritmos circadianos (cercano al día). Dicha ciclicidad ambiental es la que ha tenido gran influencia en los organismos que estuvieron más adaptados a tal periodicidad para prevalecer y sobrevivir en los diferentes nichos ecológicos. Actualmente, los ritmos son una propiedad conservada en todos los organismos, desde unicelulares, mamíferos y plantas.

A principios del siglo III a.C., se hicieron las primeras descripciones de los ritmos biológicos en plantas, al describir el movimiento periódico de las hojas del tamarindo (*Tamarindus indica L.*), este hecho fue registrado por Andróstenes de Thasos, menciona que las hojas se movían como “saludando al sol”. Posteriormente, a mediados del siglo XVII, Athanasius Kircher en su obra *De Arte Magnetica* ilustra su percepción en la relación entre el sol y las plantas al diseñar un *horologium botanicum* o reloj botánico, que consta de un girasol sobre un corcho que flota en un recipiente de agua. La flor lleva en su centro un puntero, y al girar buscando al sol, señala la hora en un anillo suspendido (Figura 2).



Figura 2. Reloj botánico o *horologium botanicum* diseñado por Athanasius Kircher en el siglo XVII.

También, otro científico naturalista muy reconocido fue Carolus Linnaeus, quien gracias a sus observaciones en los movimientos periódicos de apertura y cierre de las flores de ciertas plantas lo inspiró para diseñar su “reloj floral”, donde la hora se mide mediante la observación de flores que se abren o cierran a horas precisas del día (Figura 3). A principios del siglo XVIII, se retomaron las descripciones de plantas en su movimiento foliar, donde el francés Jean Jacques De Marian publica sus observaciones en *Mimosa* sp. aislada del ciclo luz-oscuridad, al mantenerlas en oscuridad continua. Esto constituyó la primera descripción formal de un ritmo en ausencia de variaciones ambientales, sugiriendo su posible naturaleza endógena (Capel et al. 2003).



Figura 3. Reloj floral diseñado por Carolus Linnaeus a principios del siglo XVIII. Tomado de Reinberg y Smolensky, 1983.

Los ritmos biológicos pueden haber surgido en el curso de la evolución en respuesta a determinadas variables ambientales cíclicas (luz-oscuridad, temperatura, etc), que actúan como sincronizadores o *zeitgebers* (del alemán *Zeit*, tiempo y *geber*, dador) modelando en

los organismos una representación endógena del tiempo externo. De modo que en sus orígenes los organismos se someterían al orden temporal impuesto por el ambiente y conforme evolucionaron “asimilando” el tiempo externo dieron origen a su propia organización temporal. Así que la estrecha relación biológica-geofísica se explica por las impresiones originales ambientales y sus diferencias se deben a las características particulares de las especies para adaptarse al medio ambiente (Pittendrigh, 1965).

Clasificación de los ritmos biológicos

Los ritmos biológicos son usualmente agrupados en referencia a la longitud de su periodo (Tabla 1). Los movimientos diarios de las hojas de la planta de frijol y los cambios diarios en la temperatura del cuerpo son ejemplos clásicos de variables que se presentan con un ritmo cercano a las 24 h y que son clasificados como ritmos “circadianos”, término introducido por Franz Halberg en 1959. Los periodos que son menores a las 24 h se le conocen como ultradianos y los que son mayores como infradianos. Por otro lado, Jürgen Aschoff extendió el concepto, hallando periodicidades circamareales, circalunares y circanuales (Cardinali y Golombek, 1994).

Tabla 1. Clasificación de los ritmos biológicos de acuerdo a su longitud temporal y a su frecuencia. Tomada de Cardinali y Golombek, 1994.

	ALTA FRECUENCIA $\tau < 0.5$ hs.	FRECUENCIA MEDIA $0.5 < \tau < 3$ días	BAJA FRECUENCIA $\tau > 3$ días
Regiones de los ritmos	$\tau \approx 0.10$ seg. $\tau \approx 0.01$ seg. etc.	Ultradiano: $0.5 < \tau < 20$ h Circadiano: $20 < \tau < 28$ h Infradiano: $\tau > 28$ hs. Circamareal: $\tau \approx 12$ hs.	Circaseptano: $\tau \approx 7$ días Circadiseptano: $\tau \approx 14$ d Circavigintiano: $\tau \approx 20$ d Circatrigintano: $\tau \approx 30$ d Circanual: $\tau \approx 1$ año
Ritmos en:	Electroencefalograma Electrocardiograma Respiración Peristalsis	Sueño-Vigilia Actividad-Reposo Movimientos oculares Componentes en sangre, orina, etc. Temperatura Procesos metabólicos	Apareamiento Desarrollo gonadal Migración Menstruación

Reloj biológico

Debido a la presencia de ritmos endógenos en los organismos, se sugería la existencia de un sistema medidor del tiempo o reloj biológico. Algunos autores como Pittendrigh y Aschoff (1960) propusieron la existencia de estructuras orgánicas de localización anatómica específica que funcionarían como marcapasos capaces de imponer periodo y fase a los procesos fisiológicos. Otros como Halberg y Reinberg, mencionan que las propiedades que definen a un reloj son el resultado de los procesos fisiológicos cíclicos que ajustan sus fases (Reinberg y Smolensky, 1983). Ahora se sabe, gracias a Moore y Stephan que ese sistema es un reloj interno conocido como reloj central o marcapasos, capaz de regular los ritmos circadianos, el cual se encuentra ubicado en los mamíferos en el núcleo supraquiasmático (NSQ) en el hipotálamo. Después de varios acercamientos con lesiones en áreas del hipotálamo se llegó a establecer la zona específica que mantenía los ritmos endógenos, el NSQ. Esto se observó muy bien al lesionar el NSQ de roedores normales (periodo de 24 h) y mutantes (periodo de 20 o 22 h), al realizarles un trasplante de donadores con periodos diferentes, el periodo del ritmo resultante fue el que presentaba el donador. Por tal motivo, al transferirse no solo la ritmicidad sino el periodo mismo, quedaba de manifiesto la función de reloj del NSQ en los mamíferos. Estos primeros acercamientos fueron hechos por dos grupos de trabajo, uno de Moore y el otro de Stephan, donde observaron que si el NSQ era lesionado bilateralmente, los animales mostraban patrones arrítmicos en su actividad locomotriz diaria y por ellos se le adjudico el papel de reloj o marcapasos circadiano (Moore y Eichler, 1972; Stephan y Zucker, 1972). Posteriormente, fueron encontrando procesos rítmicos en otros tejidos, demostrando la existencia de osciladores periféricos fuera del sistema nervioso central. Algunas de las evidencias que lograron vislumbrar a estos osciladores periféricos provino de protocolos con entrenamiento al alimento (Yamazaki et al., 2000; Herzog y Tosini, 2001).

El NSQ se comunica con los osciladores periféricos de forma directa a través de señales hormonales y del sistema nervioso autónomo, e indirectamente por señales de temperatura corporal y el tiempo de ingesta al alimento, siendo determinadas por la actividad-descanso del organismo las cuales son señales de sincronización o entrenamiento (Fig. 4). Entre los osciladores periféricos se reconocen varios órganos y tejidos, tales como el ojo, el hígado, páncreas, riñón, pulmón, músculo esquelético, el tejido adiposo, entre otros. Estos órganos

también presentan los mecanismos moleculares para sostener su ritmicidad diurna, y en ciertas circunstancias son capaces de medir el tiempo de manera independiente al NSQ (Kramer y Merrow, 2013).

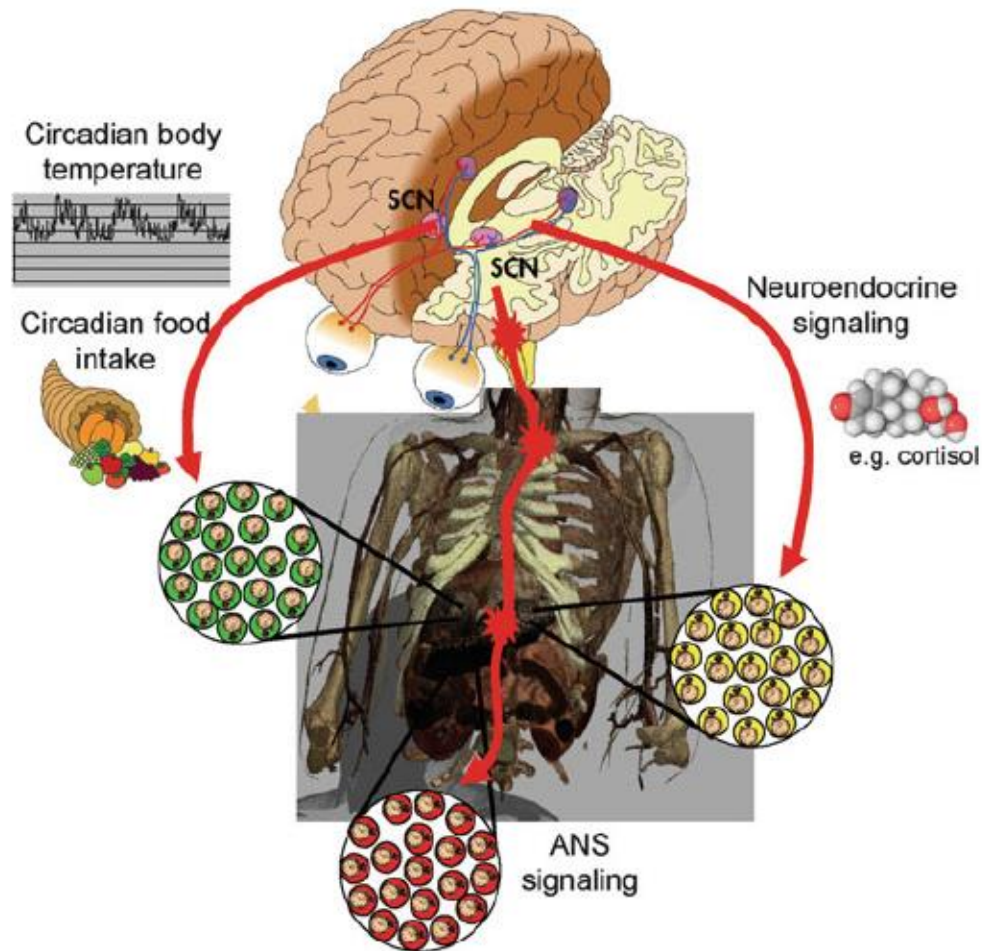


Figura 4. Señales de comunicación entre el NSQ y los osciladores periféricos. Tomado de Kramer y Merrow, 2013. Originalmente dibujado por N. Roggli.

Maquinaria molecular del reloj circadiano en mamíferos

El mecanismo del reloj circadiano es autónomo y depende de una red de retroalimentación transcripcional-traduccionales negativa autoregurable. El papel central dentro de esta red lo ocupan los activadores transcripcionales, CLOCK y BMAL1 (forman un dímero), la cual positivamente regulan la expresión de los genes *Per* y *Cry* al inicio del ciclo. Sus productos proteícos (PER y CRY) se acumulan, dimerizan y forman un complejo que trasloca al núcleo para interactuar con el dímero CLOCK y BMAL1, reprimiendo su propia

transcripción. De forma casi alterna el dímero CLOCK-BMAL1 favorece la transcripción de otros genes de receptores nucleares, *Ror* y *Rev-erb*. Las proteínas resultantes regresan al núcleo y pueden activar o inhibir la expresión de uno de los genes reloj, *Bmal1*. En este sentido las proteínas ROR al traslocar al núcleo favorece la expresión de BMAL y las proteínas REV-ERB la inhiben. A nivel postranscripcional, la estabilidad de las proteínas PER y CRY es regulada por el complejo SCF (Skp1-Cullin-F-box, por sus siglas en inglés), la ubiquitina ligasa E3 y a β -TrCP y FBXL3. Las quinasas, caseína quinasa 1 ϵ/δ (CK1 ϵ/δ) y la quinasa de AMP (AMPK) las cuales fosforilan a las proteínas PER y CRY, respectivamente, para promover una poliubiquitinación por su respectivo complejo de ubiquitina ligasa E3, el cual marca a estas proteínas para su degradación por el proteosoma 26S (Mohawk et al., 2012).

También, la maquinaria del reloj molecular puede afectar la expresión de enzimas metabólicas en diferentes órganos, el caso de la gluconeogénesis hepática como la fosfoenolpiruvato carboxicinas y la glucosa-6-fosfatasa (Stenvers et al., 2001; Zhang et al., 2010).

ARTÍCULO 1. El acceso restringido a la alimentación como un sistema experimental para estudiar la regulación circadiana del metabolismo durante el ciclo de ayuno-realimentación

En este artículo se trata la estrecha comunicación que existe entre la maquinaria del reloj molecular y el metabolismo. Así como al acceso al alimento como un sincronizador de los ritmos biológicos, la importancia del ayuno y las adaptaciones fisiológicas de la ingesta de alimento.



Butanda A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Rendón E y Vázquez Meza H (eds.) **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXVII, 41 – 68, Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. C. Universitaria, México, DF.
(http://bioq9c1.fmedic.unam.mx/tab2013/TAB2013/Mensaje_Bioquimico.html)

ISSN-0188-137x

EL ACCESO RESTRINGIDO A LA ALIMENTACIÓN COMO UN SISTEMA EXPERIMENTAL PARA ESTUDIAR LA REGULACIÓN CIRCADIANA DEL METABOLISMO DURANTE EL CICLO DE AYUNO-REALIMENTACIÓN

RESTRICTED ACCESS TO FOOD AS AN EXPERIMENTAL SYSTEM TO STUDY THE CIRCADIAN REGULATION OF METABOLISM DURING THE CYCLE OF FAST-FEEDBACK

**Moisés Pérez-Mendoza*, Julieta Rivera-Zavala*, Marlen Valdés-Fuentes*,
Olivia Vázquez-Martínez* y Mauricio Díaz-Muñoz**

Instituto de Neurobiología, Departamento de Neurobiología Celular y Molecular,
Campus UNAM-Juriquilla, Querétaro 76230, QRO. MÉXICO.
e-mail: mdiaz@comunidad.unam.mx

* La contribución de estos autores fue similar, por lo que sus apellidos están ordenados de forma alfabética

Resumen

La actividad fisiológica está influida por el reloj circadiano, por lo que la inmensa mayoría de respuestas conductuales, hormonales y metabólicas fluctúan durante el periodo de 24 h comprendido en los ciclos de luz-oscuridad asociados a la rotación de la Tierra. El control principal de esta ritmicidad es ejercido en los mamíferos desde el hipotálamo, por la actividad cíclica del núcleo supraquiasmático. Sin embargo, se ha reconocido recientemente que

existe un reloj alternativo que en lugar de responder a la luz, es sincronizado por la accesibilidad al alimento. Este reloj biológico, del cual se desconoce su localización anatómica, se le conoce como Oscilador Sincronizado por el Alimento (OSA). La expresión del OSA se consigue al restringir la alimentación de cada día a un periodo corto de tiempo (~2 h), y prolongar esta forma de comer hasta 3 semanas. El protocolo implica en cada día la alternancia de un periodo largo sin alimento (22 h) y sólo un tiempo limitado para la ingesta de alimento (2 h). En consecuencia, la expresión del OSA se visualiza como una adaptación de la fisiología circadiana a una forma de comer que conlleva ciclos repetitivos de un ayuno prolongado seguido por una ingesta de comida muy intensa y abundante.

En esta revisión se hace un compendio de las principales adaptaciones endócrinas y de los cambios bioquímicos del hígado que acompañan la expresión del OSA. Los resultados ponen de manifiesto una conexión entre el reloj molecular y las redes metabólicas, con influencias mutuas y complementarias. Asimismo, se constata que la expresión del OSA confiere al organismo una manera nueva y diferente de modular su fisiología, que la distingue de los cambios asociados a los ciclos simples de ayuno de un día y realimentación.

Los datos generados con este modelo experimental tienen la potencialidad de hacernos comprender mejor la relación entre los ritmos biológicos y algunas patologías, y entender de mejor forma cómo la desregulación circadiana puede favorecer entidades nosológicas como la obesidad, la diabetes o el síndrome metabólico.

Palabras clave: Fisiología circadiana, alimentación, osciladores biológicos, metabolismo hepático

Summary

Physiological activity is influenced by the circadian system, hence, most of the behavioral, hormonal and metabolic responses show diurnal variations related to the light-dark cycles associated to the rotational movement of the Earth. The principal pacemaker in vertebrates is located in the hypothalamus within the suprachiasmatic nuclei. However, an alternative clock has been recognized that is independent of light synchronization but is entrained by food access. The anatomical location of this oscillator is still unknown, and is known as the Food entrained oscillator (FEO). The FEO expression implicates a restricted feeding schedule (2 h of food access per day) during 3 weeks. This feeding protocol involves a long fasting time (22 h) and a short mealtime (2 h). Hence, the FEO expression consists in a repetitive cycles of long fasting and brief period of intense and abundant feeding.

In this review we mention the mean endocrine adaptations as well as the biochemical modifications in the liver that are associated to the FEO expression. The result indicates a strong link between the molecular circadian clock and the metabolic pathways, with complementary and mutual influences. In addition, it is shown that the FEO promotes a new and different way of physiological

modulation in contrast to the changes related to a single cycle of 24 h fasting followed by 2 h of meal time.

The data obtained with this experimental protocol have potentially allow us a better comprehension of the relationship between biological rhythms and some pathologies, and at the same time, to understand how circadian des-regulation can promote health alterations such as obesity, diabetes and the metabolic syndrome.

Keywords: Circadian physiology, nutrition, biological oscillators, hepatic metabolism

Metabolismo y Reloj Molecular

Los relojes biológicos son adaptaciones fisiológicas que están codificadas genéticamente y permiten al organismo adecuar su fisiología a los cambios luz-obscuridad ambiental asociados a la rotación de la Tierra.

Aunque hay especies que presentan actividad, ya sea diurna o nocturna, dentro de una misma población se reconocen sujetos con diversos cronotipos. Por ejemplo, en los humanos hay personas que son “alondras” y se levantan muy temprano, mientras que otras son “búhos” y permanecen despiertos hasta muy noche.

La genética moderna ha identificado las vías moleculares que dictan el ritmo circadiano de 24 horas. Estos avances permiten entender porque la vida en las actuales sociedades industrializadas con la luz artificial, el trabajo nocturno, la reducción del tiempo normal de dormir, los viajes o la desorganización temporal, descontrolan el patrón adaptativo al ciclo luz-obscuridad del reloj interno, que ha sido programado a través de la evolución para funcionar con un periodo aproximado de 24 h.

La identificación de un reloj molecular permite entender los desórdenes en el ritmo circadiano y los patrones de sueño en todos los organismos, incluidos los humanos.

Para denominar a un oscilador circadiano como tal, se deben definir ciertas características: persistencia y sostenimiento de la longitud del periodo bajo condiciones constantes, sincronía con las señales ambientales, como la luz, y estabilidad a través de múltiples variaciones en la temperatura.

Los primeros avances en la caracterización del reloj circadiano se hicieron en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, dándose a conocer el concepto de que los relojes se componen de un asa de retroalimentación transcripcional autorregulatoria, con un inicio activador que promueve la transcripción de una serie de represores, que a su vez tienen una retroalimentación para inhibir la expresión y función de genes en un ciclo que se repite a sí mismo cada 24 h. En este sentido se ha identificado una serie de genes y sus respectivas proteínas los cuales participan en la generación de la ritmicidad circadiana, a través de un asa positiva como los genes *Clock* y *Bmal* y un asa negativa *Per* y *Cry*, otros genes que participan de manera importante son *Rev-erb- α* , *Ror- α* y *Dec*. A este conjunto de genes se les ha denominado “genes reloj” [1].

Una característica de los ritmos circadianos que emerge de los estudios moleculares es que las características canónicas del reloj están genéticamente programadas. La mala coordinación entre la longitud del periodo y la sincronización al inicio del periodo luminoso, repercute en la estabilidad del sistema, ya que los ciclos de reparación y daño del DNA se descontrolan. Alternativamente esta mala coordinación puede desencadenar procesos bioquímicos incompatibles, como un descontrol en la fase de oxidación o reducción dentro del ciclo metabólico.

Ya se han identificado las vías sensoriales en el cerebro que sincronizan el reloj independientemente de la formación de la imagen visual. Actualmente se sabe que la respuesta luminosa también sincroniza las neuronas y los relojes periféricos por medio del control del marcapaso maestro conocido como

núcleo supraquiasmático (NSQ). Esto en condiciones de alimentación *ad libitum* [1].

La mayoría de las especies conocidas, desde las bacterias hasta los humanos, han desarrollado un sistema temporal circadiano que los prepara para alternar periodos de ingesta de alimento y periodos de ayuno. Hay diversas evidencias que indican que existe una relación estrecha entre el reloj circadiano y el metabolismo; y que alteraciones en el sistema temporal puede desencadenar enfermedades metabólicas tales como obesidad, diabetes o el llamado síndrome metabólico.

Variaciones diurnas del metabolismo

El NSQ se comunica con los osciladores periféricos a través de señales hormonales y del sistema nervioso autónomo. Entre los osciladores periféricos se reconocen varios órganos y tejidos, tales como el hígado, páncreas, estomago, intestino, incluso el tejido adiposo. Estos órganos también presentan los mecanismos moleculares para sostener su ritmicidad diurna, y en ciertas circunstancias son capaces de medir el tiempo de manera independiente al NSQ.

Un ejemplo de oscilación circadiana a nivel metabólico lo presentan las algas cianofitas. Las variaciones circadianas de estos organismos están sustentadas en un complejo de tan sólo 3 proteínas ahora llamadas “reloj” (KaiA, KaiB, KaiC). Con ATP disponible, este complejo funciona en un ciclo autosostenido de 24 h alternando los estados de fosforilación y defosforilación de sus componentes. El ciclo de reacción de estas cinasas y fosfatasa se mantiene constante a diferentes temperaturas, una propiedad que se sabe caracteriza a un oscilador circadiano. El simple recambio de ATP modula la fosforilación del ciclo, sugiriendo de inmediato que el ritmo del reloj podría estar acoplado a la actividad metabólica. Otra característica que conecta este oscilador central con el metabolismo, es que la actividad de los factores de transcripción del reloj es sensible al estado redox. El reloj molecular regula

también la expresión de enzimas metabólicas muy importantes para la gluconeogénesis como la fosfoenolpiruvato carboxicinas y la glucosa-6-fosfatasa [2].

Más recientemente, se ha encontrado que los ciclos de 24 h en el metabolismo se relacionan a la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Existe la propuesta de que cuando los eucariontes divergieron de las bacterias hace millones de años, la oxigenación de la atmosfera provocó una ventaja adaptativa a estos organismos basada en un la coordinación de reacciones redox que pronto quedaron bajo el control del reloj circadiano.

Se sabe también que hay una extensa integración entre el sistema neuroendócrino y el sistema circadiano porque se ha visto que la integridad del reloj decae con la edad. Para tratar de entender qué factores asociados a la edad puede afectar la integridad del reloj circadiano, se han hecho experimentos en donde mutando algunos genes reloj se observa muerte prematura que correlaciona con el incremento de reacciones pro-oxidantes y la acumulación de especies reactivas de oxígeno. También se ha observado que hay alteraciones en la regeneración hepática principalmente en el acoplamiento del ciclo celular. Aunque no existen datos claros y contundentes, se sugiere fuertemente que existe una correlación muy cercana entre las alteraciones circadianas y el riesgo de padecer cáncer, aunque se necesitan todavía estudios más precisos para comprender mejor la relación entre el ciclo celular, el reloj molecular y la vías oncogénicas [1].

Enfermedades metabólicas

Un punto interesante que debe explorarse a fondo es determinar como los ritmos circadianos modulan la homeostasis y las vías que responden a los nutrientes para coordinar las señales ambientales y su influencia en la regulación del metabolismo energético. Es ampliamente aceptado que existe

una comunicación e influencia recíproca entre los componentes del reloj molecular y las diversas rutas del metabolismo intermedio.

Un punto importante por dilucidar es descubrir cómo el NSQ se comunica con todos los osciladores alternos, dentro y fuera del cerebro, para producir una fase coherente entre el metabolismo del organismo y el sistema circadiano. Ya se conoce que las células del NSQ siguen midiendo el tiempo aún fuera de su sitio anatómico; además que se sugiere que los factores secretados por ellas y las conexiones del sistema nervioso autónomo, contribuyen a la sincronización de los relojes periféricos, aunque la naturaleza de estas vías de comunicación es todavía incipiente.

Las áreas que reciben proyecciones directas del NSQ, como la vía que va a la zona hipotalámica dorso-medial, ha sido implicada en la anticipación a la comida, aunque es posible que otros centros diencefálicos y mesencefálicos estén también involucrados.

Se han efectuado una gran cantidad de estudios para entender cómo la disponibilidad del alimento a horas diferentes a las tradicionales, causa un desplazamiento en la ritmicidad del reloj periférico hepático, sin alterar el marcapasos cerebral central. Una vía importante que sincroniza el oscilador hepático en el momento en que hay disponibilidad de comida, involucra la señalización de los glucocorticoides y la regulación de la temperatura corporal.

Cuando se administran dietas altas en grasa en un periodo circadiano incorrecto, se acelera la ganancia de peso corporal en comparación con animales que comen en el periodo circadiano correcto.

Las herramientas genéticas que inciden de manera directa en el reloj interno, crean oportunidades para analizar las bases moleculares de ciertas patologías metabólicas, como el infarto de miocardio matutino y las crisis de hipertensión. Los factores que se conjugan para que se incremente el riesgo de

infarto al miocardio en las mañanas son múltiples, entre algunos de los que se cree son decisivos está la síntesis diurna de los factores transcripcionales que activan los promotores de citosinas pro-trombóticas. Así mismo, se ha reportado que la arritmia cardíaca ocurre frecuentemente en la mañana debido al control de la expresión de los canales de potasio por genes reloj de las células cardíacas. La fisiología circadiana también influye en la contractibilidad y en el metabolismo oxidativo. Estos efectos vasculares del reloj molecular causan variaciones en la presión sanguínea a lo largo del ciclo luz-obscuridad.

Otros estudios relacionados con el control del metabolismo de la glucosa circulante también han arrojado evidencias interesantes sobre la interacción reloj molecular-metabolismo. La ausencia del gen *Clock* hace que ratones presenten hiperglicemia, que sean más susceptibles a desarrollar obesidad en los primeros meses de vida, y que con el avance de la edad se vuelvan hipoinsulinémicos.

Estudios experimentales del Síndrome Smith-Magenis, que se caracteriza por anormalidades neuronales, de comportamiento, déficit intelectual, obesidad y alteraciones del sueño, han dado evidencias de la conexión entre la expresión alterada del gen *Clock* y alteraciones en las vías energéticas celulares. Esta interacción ha sustentado la hipótesis de que las características moleculares de los elementos del reloj molecular pudieran predecir el riesgo de que los humanos padezcan desórdenes metabólicos.

En la actualidad se sabe que personas que laboran en horarios nocturnos de trabajo con la consecuente alteración del ritmo circadiano, padecen un gran número de enfermedades metabólicas como diabetes tipo 2, obesidad, desórdenes gastrointestinales y del dormir, y una predisposición al cáncer.

Cualquier alteración que se le imponga al ritmo circadiano tiene consecuencias metabólicas adversas en el organismo. Por ejemplo, el hecho aparentemente simple de alterar la hora de ir a dormir por reuniones sociales en los fines de semana, se ha asociado al incremento en el peso corporal.

En general, la interacción mutua del reloj molecular y el metabolismo intermediario se basa en la interfase que entre estos 2 sistemas se establece a varios niveles de enlace: 1) las proteínas reloj son susceptibles de ser reguladas directamente por coenzimas redox (NAD⁺/NADH), 2) las proteínas reloj son fosforiladas por cinasas cuya actividad depende directamente del metabolismo (AMPK), 3) el reloj molecular incide sobre canales y ATPasas que manejan calcio intracelular, y la dinámica del calcio es uno de los eslabones principales del control metabólico, 4) los receptores nucleares están bajo control circadiano, y éstos son los principales coordinadores de la respuesta de ayuno del metabolismo hepático y del tejido adiposo [2].

Por lo tanto, la relación del reloj circadiano con todos los osciladores y las vías metabólicas permiten una coordinación del sistema temporal del organismo con los ciclos de ayuno y alimentación, y esto representa una de las bases principales de la adaptación que presentan los organismos a diferentes estrategias en el consumo y procesamiento del alimento.

El acceso al alimento como un sincronizador de los ritmos biológicos

El ambiente no es constante y se pueden presentar fluctuaciones que imponen a los organismos retos de adaptación y supervivencia. En consecuencia, surgen en cada organismo sistemas de regulación fisiológica capaces de anticipar y oscilar a la par con los fenómenos externos. Entonces la presencia de los ritmos biológicos en los seres vivos capacita una acción adaptativa de índole temporal que permite predecir los cambios ambientales y así poder anticipar su ocurrencia. Un fenómeno importante en la biología de los ritmos biológicos es la sincronización, que es definida como un ajuste de los ritmos internos a eventos ambientales externos. Este proceso puede sustentarse por la luz, interacciones sociales y conductuales, la temperatura, el estatus metabólico y por el alimento [3].

Aunque en los mamíferos el NSQ es reconocido como el reloj o sincronizador maestro, principalmente sincronizado por ciclos de luz-oscuridad, existe otro reloj alternativo que se expresa cuando se restringe el periodo de alimentación [4, 5]. La capacidad de las especies de anticipar el horario de alimentación para prepararse y optimizar la ingesta y digestión del alimento, es un fenómeno clave de la evolución. Estudios en el NSQ han servido para identificar la maquinaria molecular que controla la ritmicidad cercana a ciclos de 24 h. Gracias al desarrollo de estrategias moleculares e inmuno-histoquímicas, en años recientes se ha determinado que la expresión de los elementos del reloj molecular se ubican también en muchos tejidos periféricos, como el hígado, corazón, músculo, tejido adiposo, páncreas, riñón, pulmón, entre otros [6, 7].

Cuando el acceso del alimento se restringe diariamente en animales de laboratorio, se expresa un reloj el cual se ha denominado Oscilador Sincronizado por Alimento (OSA). Durante la expresión de este reloj, se han observado cambios conductuales que anteceden al evento de alimentación, al menos 3 h previas al acceso de alimento, el cual se conoce como actividad anticipatoria al alimento (AAA). Curt Richter (1922) observó que cuando a las ratas se les presentaba diariamente sólo por 25 min el alimento, aumentaba la actividad locomotriz unas horas previas a la presentación del alimento. Estas observaciones fueron recapituladas en los 50's por Reid y Finger (1955). Sin embargo, Bolles y Stokes (1965) confirmaron que esta AAA, era un fenómeno circadiano [8].

La primera estructura que se propuso como centro generador del la AAA fue el hipotálamo, ya que esta zona cerebral está involucrada en la ingesta de alimento y agua, el control de la temperatura, la secreción de hormonas y forma parte de la coordinación con el sistema nervioso autónomo [8]. Se sabe que dentro de esta estructura se encuentran caracterizados centros de saciedad, a nivel del hipotálamo ventromedial y del apetito, en el hipotálamo lateral. No

obstante, las lesiones electrolíticas a estas estructuras no repercutieron en el fenómeno de la sincronización por el alimento [9].

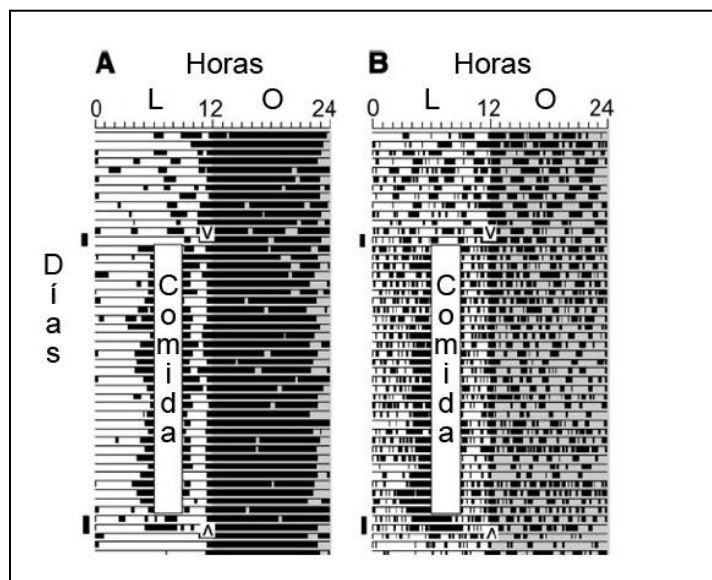


Figura 1. Registro representativo de actividad locomotriz sin lesión (A) y con lesión a nivel del núcleo hipotalámico dorsomedial (B). El acceso restringido del alimento fue de 3 h, barra azul, V comienzo de la restricción y V invertida, fin de la restricción (Modificado de Landry, et al., 2006) [12].

Esta AAA se distingue por presentar ciertas características como son: aumento de la temperatura, niveles altos de corticosterona, movilización de diversos metabolitos, incremento de la actividad locomotriz, importantes alteraciones en el metabolismo intermedio del hígado, etc. [5, 8, 10]. Esta actividad anticipatoria claramente depende de un oscilador circadiano independiente del NSQ, ya que persiste en animales con lesión bilateral de este núcleo y bajo condiciones de luz constante como lo demostraron Stephan y colaboradores (1979, 1992) [11]. Una característica importante es que la AAA se produce cuando el acceso a la comida se da en rangos cercanos a las 24h, y persiste por algunos ciclos bajo condiciones de ayuno (Figura 1).

De forma paralela, el estudio de la actividad anticipatoria se ha utilizado como una herramienta para entender al OSA (como una salida de este reloj). Gooley y colaboradores (2001), tras realizar una lesión en el núcleo

hipotalámico dorsomedial, demostraron que la abolición de esta estructura suprimía temporalmente la AAA. Sin embargo, existe una sincronización consistente en tejidos periféricos como el hígado, el esófago, el estómago y el colon [13]. Un aspecto importante de la AAA es que desaparece enseguida por la alimentación *ad libitum* y como se mencionó antes, persiste en condiciones de ayuno durante varios días. Además se sabe que es susceptible a retrasos o avances en su fase, debido a los cambios en el horario en el que se le presenta el alimento y que es sensible parcialmente a mutaciones de algunos genes reloj, como *Cry* y *NPAS2* [10, 14]. Actualmente, se desconoce cuál es el sustrato anatómico del OSA.

El alimento ha mostrado ser un sincronizador potente de los ritmos circadianos, especialmente en un ambiente natural, donde el acceso al alimento se restringe a ciertas horas del día y consecuentemente muchas especies tienen que optimizar su conducta en función de las horas de alimentación. El entendimiento de la relación entre los órganos periféricos y el OSA es fundamental para comprender su funcionamiento. El OSA es capaz de provocar cambios en la fase de algunos ritmos circadianos como son diferentes hormonas, tales como la insulina, el glucagón y la corticosterona [15], la leptina [16], la dinámica de metabolitos energéticos como los triacilglicéridos, cuerpos cetónicos y ácidos grasos [17-19]. Otra de las modificaciones importantes que tiene el OSA es que conlleva modificaciones en la carga energética, estado redox y actividad mitocondrial. Aceves y colaboradores (2003) demostraron que durante la AAA se presentaba en el hígado un estado hipotiroideo, mientras que al final de la alimentación se cambiaba a hipertiroideo [20]. Otros cambios relevantes tienen que ver con la expresión de genes implicados en procesos celulares y los propios genes reloj [21].

El hígado al ser un órgano vital para el manejo de los nutrientes y por lo tanto del metabolismo intermediario, es considerado como parte fundamental de este oscilador y por lo tanto de la sincronización presente ante la instalación del OSA.

El ayuno como entidad metabólica y fisiológica

El ayuno se define como el tiempo transcurrido desde la última ingesta de alimento y comprende una serie distintiva de adaptaciones fisiológicas que van desde el aprovechamiento de la comida recién ingerida y el concomitante almacenamiento de reservas energéticas, seguido por una degradación del glucógeno hepático y una posterior movilización de las reservas lipídicas. Usualmente estos eventos son suficientes para promover la búsqueda de alimento, pero en el caso de que el ayuno se vuelva extremo, el organismo recurre a otras estrategias como el consumir todas las reservas del tejido adiposo e incluso la movilización de moléculas energéticas del tejido muscular. Ante la falta de nutrientes el organismo activa mecanismos para la producción de sustratos energéticos que aseguren el metabolismo cerebral a costa de disminuir el metabolismo periférico. Si el ayuno es prolongado (días o semanas), el sistema responde con la utilización de fuentes alternas de energía y disminución del gasto proteico [22].

La disminución en los niveles de glucosa (~60 mg/dL) induce la secreción glucagón e inhibe la secreción de insulina, de las células α y β del islote pancreático, respectivamente. La relación de estas hormonas regula las interrelaciones metabólicas de los órganos en respuesta a la falta de glucosa [23]. La hipoglucemia consecuencia del ayuno también induce la secreción de adrenalina y corticosterona, hormonas secretadas por la médula y corteza suprarrenal. La adrenalina inhibe la secreción de insulina y estimula la glucogenólisis en hígado y músculo; los glucocorticoides suprimen la secreción de insulina, inhiben la captación de la glucosa por los tejidos periféricos, promueven la gluconeogénesis, el catabolismo proteico y regulan la movilización de ácidos grasos libres (AGL) [23, 24].

El ayuno comprende tres fases:

Fase postabsortiva, comprende de 6 a 24 h después de haber comenzado el ayuno. Fase en la cual los requerimientos de glucosa por el cerebro son mantenidos principalmente por la glucogenólisis hepática [22].

Fase de ayuno temprano, comprende de 2 a 10 días (Figura 2). Fase gluconeogénica durante la cual los requerimientos de glucosa son cubiertos por el hígado mediante el uso de amino ácidos, lactato, piruvato y glicerol provenientes del tejido muscular y adiposo [22].

Fase de ayuno tardío (inanición), comprende más de 10 días (Figura 2). Fase de movilización total de las reservas lipídicas (lipólisis máxima) para uso de los AGL y aumento en los niveles de los cuerpos cetónicos. Consumo de proteína muscular como fuente de sustrato gluconeogénico [22].

Durante la fase de postabsortiva el glucagon estimula la glucogenólisis del hígado y del músculo. El glucógeno hepático no es suficiente para satisfacer los requerimientos del cerebro y los glóbulos rojos después de algunas horas, ya que los niveles de este polisacárido comienzan a declinar 8 h después de una comida [22].

Cuando las reservas de glucógeno se agotan el organismo entra a la fase de ayuno temprano, y la glucosa circulante se sostiene principalmente por la actividad gluconeogénica del hígado. Los sustratos por excelencia de este proceso son el piruvato y el lactato, producto de la oxidación parcial de la glucosa, el glicerol como residuo lipolítico, y la alanina, que se forma por la degradación de proteínas en el músculo. Estas unidades de 3 carbonos ingresan a la circulación, son captadas y recicladas por el hígado (~10% riñón) para la producción de glucosa [25]. De la glucosa formada por la gluconeogénesis el 70% es consumida por el cerebro, el 10 % por el corazón y el 7 % por otros músculos [26, 27].

Durante la transición de ayuno temprano y ayuno tardío, los niveles crecientes de glucagon activan a la enzima lipasa hormono-sensible del tejido adiposo, la cual promueve la movilización de los AGL y el glicerol, productos de

la hidrólisis de los triacilglicéridos [28]. Los AGL actúan como fuente energética para todos los tejidos, a excepción del cerebro, los glóbulos rojos y la médula renal, además de aportar la energía para llevar a cabo la gluconeogénesis. Los AGL de cadena par son degradados a acetil-CoA, el cual ingresa al ciclo de Krebs para su metabolismo terminal a CO₂ y H₂O. Por otro lado, el glicerol y el propionil-CoA, derivado de los AGL de cadena impar, actúan como sustratos para la producción de glucosa a través de la gluconeogénesis [25].

En la fase de ayuno tardío o inanición, no llegan nutrientes a partir del intestino y las reservas de glucógeno hepático se han agotado, la gluconeogénesis toma un papel preponderante. El ciclo de Cori (producción de lactato en músculo y conversión del lactato a glucosa por el hígado) y el ciclo de alanina-glucosa (generación de alanina por el músculo y su transformación en glucosa por el hígado), juegan un papel importante en el aporte de glucosa. La glutamina acompaña a la alanina como sustrato gluconeogénico en condiciones extremas de inanición [25]. Durante esta fase las proteínas no son renovadas ni remplazadas, y se utilizan principalmente como fuentes de unidades de carbono para la síntesis de glucosa.

Las concentraciones de acetil-CoA formado por la oxidación de ácidos grasos aumentan y no pueden seguir el ciclo de Krebs, ya que el uso de esqueletos carbonados para la gluconeogénesis disminuye la cantidad de oxaloacetato. En el hígado el aumento de acetil-CoA lleva a la formación de cuerpos cetónicos (acetoacetato y β-hidroxibutirato), moléculas energéticas que son usadas por tejidos que no son totalmente dependientes de la glucosa. A medida que aumenta el tiempo de ayuno (~3 días), los niveles de cuerpos cetónicos incrementan, atraviesan la barrera hemato-encefálica y son metabolizados por el cerebro para obtener energía [29]. La cetosis es una adaptación para el ayuno tardío, proceso mediante el cual se elimina el exceso de carbonos de ácidos grasos del hígado. Conforme más AGL se oxidan, más cuerpo cetónicos se producen y disminuye la degradación del CO₂, esto conduce a una producción total constante de ATP en el hígado.

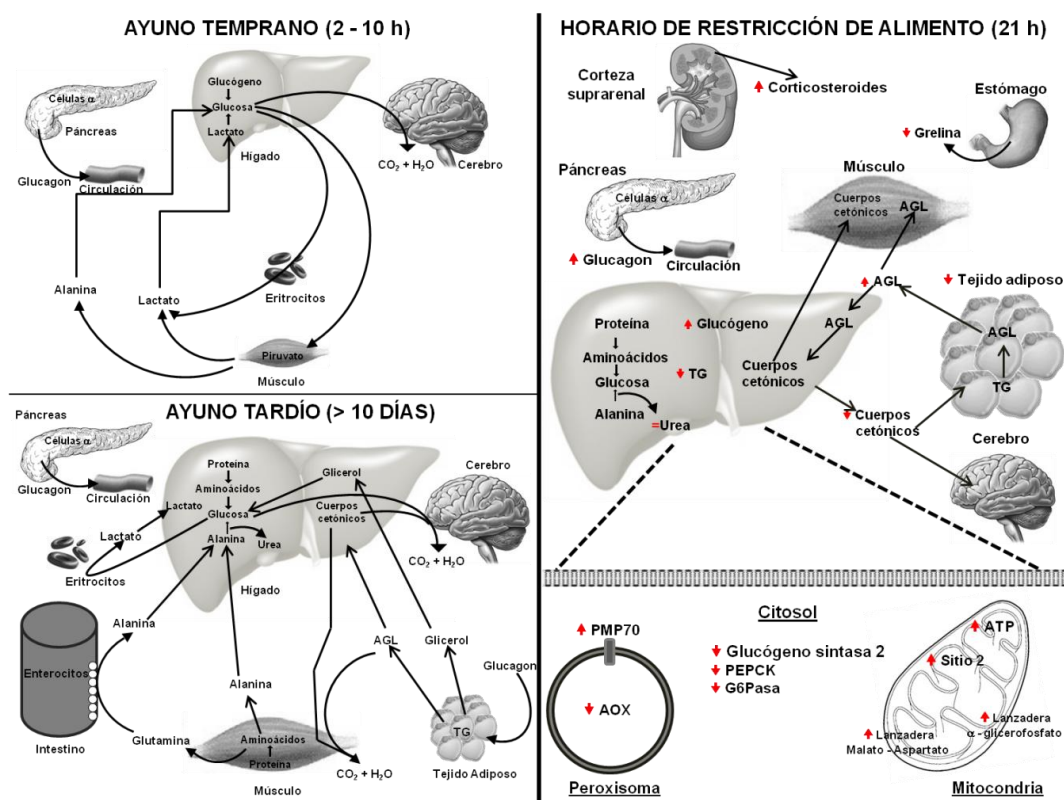


Figura 2. Dinámica de procesos metabólicos durante diferentes tipos de ayuno. Durante el ayuno temprano, de 2 a 10 h (arriba a la izquierda), se activa la fase gluconeogénica con sustratos como alanina, lactato, piruvato y glicerol. El ayuno tardío, más de 2 días (abajo a la izquierda), se maximiza la movilización de lípidos (AGL y cuerpos cetónicos) y de prolongarse se activa también el manejo de la proteína muscular. El horario de restricción de alimento (HRA) (panel de la derecha), comprende una ingesta de alimento de 2 h (12:00 a 14:00 h), un ayuno de 22 h (14:00 a 12:00 h), diariamente por 3 semanas, fase de movilización y aumento de AGL y cuerpos cetónicos, aumento en los niveles en sangre de corticosteroides. **AGL:** ácidos grasos libres, **ATP:** adenosíntrifosfato, **AOX:** acilCoA oxidasa, **G6Pasa:** glucosa 6 fosfatasa, **PEPCk:** fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, **PMP70:** proteína de membrana peroxisomal 70 y **TG:** triacilglicéridos. ▲ aumento del grupo de HRA (11:00 h) vs ayuno 24 h, ▼ disminución del grupo de HRA (11:00 h) vs ayuno 24 h, = sin cambios entre el grupo de HRA (11:00 h) vs ayuno 24 h.

Un tipo distinto de ayuno que forma parte de un protocolo experimental de alimentación conocido como horario de restricción al alimento (HRA) comprende un ayuno de 22 h con acceso de 2 h al alimento (de 12:00 a 14:00

h) diariamente por un período de 3 semanas (Figura 2). En este protocolo se puede explorar el comportamiento rítmico circadiano de parámetros de importancia fisiológica y metabólica. Observaciones realizadas antes del acceso a la comida (a las 11:00 h) al terminar la tercera semana de este protocolo de alimentación, han demostrado cambios significativos en hormonas, metabolitos y parámetros involucrados en el metabolismo energético. Los niveles en sangre de glucagon y AGL, los niveles en hígado de glucógeno, la proteína de membrana peroxisomal (PMP70), el ATP, la capacidad oxidativa del sitio 2 (succinato) de la cadena de transporte de electrones, el control respiratorio de la lanzadera malato-aspartato y la lanzadera α -glicerofosfato en la mitocondria y la ornitina transcarbamilasa, (enzima que participa en el ciclo de la urea) presentan un incremento al compararlos con un grupo control de ayuno simple de un sólo día [15, 18, 19, 30, 31]. En contraste, la proporción del tejido adiposo, niveles ghrelina circulante, glucógeno y triacilglicéridos hepáticos, la enzima peroxisomal acilCoA oxidasa [19], la enzima glucógeno sintasa, la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK) y la glucosa 6-fosfatasa (G6Pasa); enzimas de la gluconeogénesis, y la carbamoil-fosfato sintetasa I (CPSI), enzima del ciclo de la urea, presentan una reducción significativa al compararlos contra un ayuno simple de un día.

Se han reportado complicaciones médicas en pacientes durante un ayuno prolongado. No fatales: dolor de cabeza, náusea, dolor abdominal, cansancio, gota, insuficiencia renal, porfiria, anemia. Fatales: obstrucción del intestino delgado, acidosis láctica y arritmia ventricular.

Adaptaciones a la ingesta de alimento y procesamiento de nutrientes

Los mecanismos que sustentan la ingesta de alimento y el subsiguiente balance de energía no implican específicamente un punto de referencia como la composición y el peso corporal, o la prevención de síndromes clínicos, tales como la obesidad o la diabetes, sino que se han establecido a lo largo de la evolución para incrementar la sobrevivencia y optimizar funciones

[18], disminuyen las moléculas de ATP, el estado redox se reduce [30] y la triyotironina (T_3) aumenta [20]; la actividad de la glucógeno sintasa del hígado se eleva y favorece la conservación de los niveles de glucógeno. La leptina se incrementa después de 2 h de haber ingerido alimento (Figura 3).

Adaptaciones a la ingesta de alimento y procesamiento de nutrientes

Los mecanismos que sustentan la ingesta de alimento y el subsiguiente balance de energía no implican específicamente un punto de referencia como la composición y el peso corporal, o la prevención de síndromes clínicos, tales como la obesidad o la diabetes, sino que se han establecido a lo largo de la evolución para incrementar la sobrevivencia y optimizar funciones reproductivas. Una perspectiva biológica de este problema inicia con la observación de que las células gastan energía constantemente y requieren un continuo suplemento de combustibles para el metabolismo energético. La ingesta de alimento, el procesamiento de nutrientes y su transformación metabólica, son el resultado de una serie de adaptaciones que sustentan la fisiología de los organismos heterótrofos. Sin embargo, la disponibilidad de alimento y la demanda energética fluctúan en muchos hábitats, y la gran mayoría de los organismos no comen continuamente, por lo que las calorías necesarias dependen más de la efectividad en la obtención del alimento, y del momento estacional, entre muchas variables más. La ingesta de combustibles se canaliza a la oxidación celular o el almacenamiento en reservorios especiales en forma de glucógeno en el hígado y músculo, o en la forma de triacilglicéridos en el tejido adiposo. Cuando el tracto digestivo está vacío, el cuerpo libera los nutrientes y combustible desde otros órganos (tejido adiposo, hígado). La habilidad de los organismos para monitorear la disponibilidad de energía interna y externa les permite priorizar sus opciones conductuales [32].

Entre los principales mensajeros químicos relacionados con la ingesta de nutrientes están los glucocorticoides (corticosterona/cortisol), y el neurotransmisor hipotalámico conocido como neuropéptido Y. El sistema de comunicación neuronal basado en el neuropéptido Y, que fue caracterizado

inicialmente en el tracto intestinal [33], es activado en el núcleo arqueado y paraventricular por la falta del alimento y en coordinación con niveles elevados de glucocorticoides. En particular, el cortisol/corticosterona a bajas dosis potencia la ingestión de alimento, principalmente de carbohidratos, para recuperar la energía. También hay otras hormonas que estimulan la señal de hambre y la conducta de ingesta de alimento, como son: el glucagon, la ghrelina, la hormona de crecimiento. Por el contrario, las hormonas que favorecen el procesamiento de nutrientes son: la insulina, la leptina y la colecistoquinina. Naturalmente, la secreción de estas hormonas se efectúa en respuesta a la disponibilidad de nutrientes, y sus niveles circulantes reflejan la disponibilidad de energía para todo el sistema en general. Por lo tanto, estas hormonas y otros péptidos liberados en la circulación promueven los ajustes conductuales y metabólicos apropiados para cualquier situación energética determinada [34].

Otro aspecto importante de la ingesta del alimento es la señal que determina el dejar de comer. Este aspecto es controlado en parte por un sistema sensorial que detecta la distensión mecánica del lumen estomacal o la contracción intestinal vía el nervio vago [35]. El llenado del estómago restringe la cantidad de alimento como una función de volumen, independiente del contenido nutritivo del mismo. Además, el número de comidas que se hagan por cada cierto tiempo determina la cantidad a ingerir de alimento cada vez que se coma. Esto está íntimamente relacionado por la oxidación de la glucosa y de los AGL, que sustentan la formación anaerobia y aerobia de ATP [36].

La disponibilidad de energía proveniente del metabolismo de glucosa y de lípidos está sujeta a regulación circadiana que sincroniza la ingesta y gasto de energía de acuerdo a los cambios diurnos en el ambiente externo. La ingesta de alimento y manejo de nutrientes es muy diferente en protocolos de horario restringido de alimentación (HRA) o acceso temporal al alimento. La ingesta de alimento se ve acelerada a tal punto de que los animales bajo HRA ingieren una cantidad considerable de alimento (18-20 g), aunque no en la

misma proporción que los animales con alimento *ad libitum* (AL) (25-30 g), pero en menor tiempo (sólo 2 h). Posteriormente, el vaciamiento gástrico y los niveles de leptina disminuyen lentamente, alrededor de 12 h [16]. Sin embargo, los animales alcanzan un nivel máximo de glucosa al finalizar las 2 h de acceso al alimento, disminuyendo súbitamente dentro las siguientes 3 h por la acción de la insulina al promover la captura de la misma por los demás órganos (tejido adiposo, músculo, hígado, cerebro, etc). En las horas siguientes después de haber consumido alimento se observan los siguientes cambios: aumenta el nivel de insulina [17], se recuperan los niveles de triacilglicéridos hepáticos [18], disminuyen las moléculas de ATP, el estado redox se reduce [30] y la triyotironina (T_3) aumenta [20]; la actividad de la glucógeno sintasa del hígado se eleva y favorece la conservación de los niveles de glucógeno. La leptina se incrementa después de 2 h de haber ingerido alimento (Figura 3).

En condiciones normales, la insulina es secretada posprandialmente de las células β pancreáticas en respuesta a los niveles elevados de glucosa en sangre y para regular procesos metabólicos como el aprovechamiento periférico de la glucosa, la síntesis de lípidos o la inhibición de la gluconeogénesis hepática. Además del papel ampliamente reconocido de la insulina a nivel periférico como hormona anabólica, existe también una acción ejercida a nivel cerebral con consecuencias directas en la homeostasis de la glucosa y en los procesos reproductivos [37].

Se ha visto que ratones con deficiencia del receptor de insulina en el cerebro, son obesos y tienen problemas de fertilidad, reforzando que el concepto de que la insulina en el cerebro no sólo regula el peso corporal, sino que también influye en el metabolismo de glucosa a nivel periférico.

La insulina se une a su receptor, que pertenece a la familia de los receptores de tirosincinasa, y se inicia una cascada de señalización en los tejidos blanco (cerebro y órganos periféricos) [38].

En roedores, la señalización de insulina en el sistema nervioso central es crítica para suprimir la producción de glucosa por el hígado. Esta acción depende de la señalización por la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) y la activación de canales de potasio dependientes de ATP en el hipotálamo, específicamente en neuronas orexígenicas, además de la activación de la cascada de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK). En contraste, en perros, la acción de la insulina suprime la red de salida de glucosa hepática, disminuyendo la entrada de glucosa y la síntesis de glucógeno [39].

Se sabe que la insulina cuando accede al cerebro disminuye la ingesta de alimento y el peso corporal. Se propuso que la insulina sirve como una señal adipocítica en el cerebro que informa sobre la cantidad de grasa corporal y causa una respuesta metabólica de largo plazo, disminuyendo la ingesta de alimento e incrementando el gasto de energía. La insulina puede llegar al cerebro gracias a un transportador que atraviesa la barrera hematoencefálica cuando es secretada de manera aguda en respuesta al incremento de la concentración de glucosa en sangre. Los niveles de insulina en plasma correlacionan directamente con los niveles de tejido adiposo [39].

El control de la homeostasis energética por la insulina se ejerce principalmente por el núcleo arcuato del hipotálamo. Este núcleo integra las señales periféricas hormonales que reflejan el estado energético del cuerpo. Otra zona cerebral que es blanco de la insulina es el núcleo ventromedial, donde se ha visto que una infusión directa de insulina disminuye la ingesta de alimento y el peso corporal en ratas [38].

La insulina y la leptina, que es producida principalmente por adipocitos del tejido adiposo blanco, actúan en conjunto en neuronas dopaminérgicas modulando el sistema de recompensa del cerebro. La decisión de comer no sólo se sustenta en el estatus energético del organismo, sino también por los aspectos de recompensa y hedonísticos de la comida.

El aspecto de recompensa al consumir alimentos, contribuye significativamente al desarrollo de la obesidad, ya que la señalización en estos circuitos neuronales dopaminérgicos (núcleo acumbens, área tegmental ventral y sustancia nigra) puede sobrepasar la señalización hipotalámica. Ya se ha reportado que la restricción de alimento y el ayuno, estados en los cuales la insulina y la leptina están disminuidas, incrementan la necesidad de recompensa y reforzamiento de la misma forma como sucede con la adicción a las drogas [37].

El problema actual de la epidemia de obesidad que es una problemática mundial, también se relaciona con la señalización de insulina. Existen estudios en donde se ha visto que las dietas normo-calóricas, pero altas en grasa por periodos cortos, son suficientes para reducir de forma crónica la sensibilidad del hipotálamo por la insulina; lo que favorece a que haya un incremento del peso corporal, ya que se favorece el consumo inmoderado de comida (hiperfagia).

Los ácidos grasos pueden sensibilizar el hipotálamo, y entonces activar cascadas proinflamatorias, lo que trae como resultado resistencia a insulina y leptina a nivel central [39].

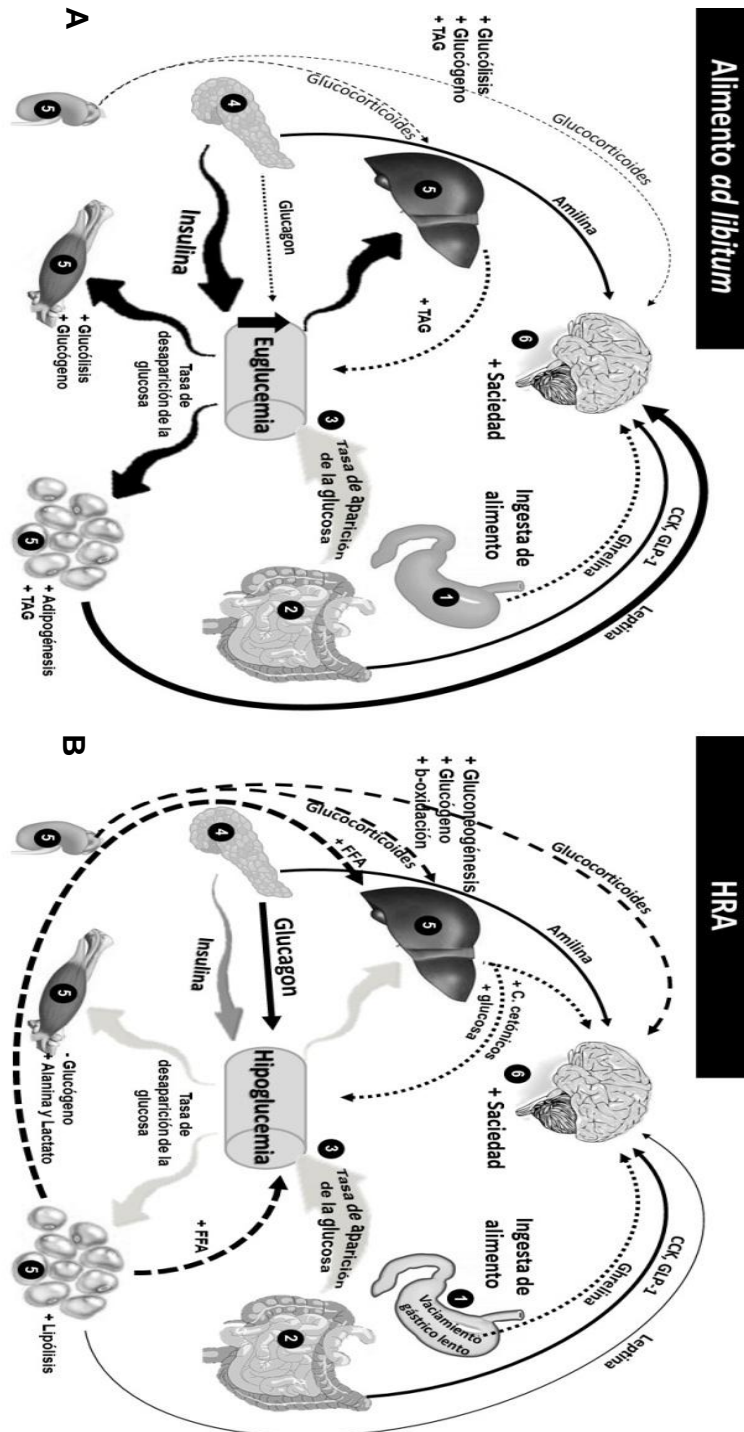


Figura 3.

Figura 3. Adaptaciones a la ingesta de alimento. A) Alimento *ad libitum*: al ingerir alimento el estómago llega a una distensión discreta, disminuyendo la liberación de ghrelina (1), seguida de un procesamiento y absorción de nutrientes en el intestino, aumentando la liberación de CCK y GLP-1 (2), favoreciendo el incremento de glucosa circulante (3), que a su vez estimula las células α del páncreas para disminuir la liberación de glucagón y las células β para estimular la liberación de insulina y amilina (4). La insulina, disminuye la glucosa circulante, por la captura de los órganos periféricos, estimulando glucólisis y glucogénesis (músculo); adipogénesis,

formación de TAG y liberación de leptina (tejido adiposo); glucólisis, glucogénesis y TAG (hígado) y disminuyendo la liberación de glucocorticoides (5). En combinación, estos parámetros favorecen la estimulación de centros de saciedad en el cerebro (6). B) Horario restringido de alimentación: la ingesta del alimento está limitada a 2h, lo que provoca una gran distensión gástrica, disminuyendo muy paulatinamente la ghrelina y con un vaciamiento gástrico lento de casi 18 h (1), con el procesamiento y absorción de nutrientes se libera CCK y GLP-1 (2), favoreciendo un incremento de la glucosa circulante, pero por efecto de la insulina disminuye rápidamente (3), manteniéndose los niveles elevados de glucagón y de amilina (4). El glucagón elevado fomenta que haya gasto de recursos energéticos (músculo) gluconeogénesis (formación de glucosa), glucogénesis y β -oxidación, liberando cuerpos cetónicos a la circulación (hígado), lipólisis y liberación de AGL y glicerol (tejido adiposo) y liberación aumentada de glucocorticoides (5). Favoreciendo la estimulación de centros de saciedad y el metabolismo de lípidos sobre el de carbohidratos (6).

Conclusión

El acceso al alimento en un horario restringido (2 h por día durante la fase luminosa) conlleva una adaptación multifuncional: a) Las variables fisiológicas que varían en función del estado de ayuno y alimentación adoptan un nuevo punto de control (set point); b) este control emergente implica la adquisición de una estrategia novedosa para regular la interacción entre las reacciones anabólicas y catabólicas, control que por su naturaleza se conoce como homeorrético, alostático o reostático, dependiendo la fuente consultada; c) el control reostático se ejerce sobre el proceso circadiano de ayuno-alimentación, por lo que influye en el funcionamiento del reloj molecular, teniendo como consecuencia una adaptación cíclica de frecuencia cercana a las 24 h. Este control reostático-circadiano se le ha denominado cronostasia.

Referencias

1. Bass, J. (2012) *Nature*. **491**, 348-356.
2. Stenvers, D.J., Jonkers, C.F., Fliers, E., Bisschop, P. y Kalsbeek, A. (2001) *Prog. Brain Res.* **199**, 359-376.
3. Challet, E. y Pévet, P. (2003) *Front. Biosci.* **8**, 246-257.
4. Aguilar-Roblero, R. y Díaz-Muñoz, M. (2010) *Sleep Biol. Rhythms.* **8**, 9-17.

5. Davidson, A.J. (2006) *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **290**, R1524-R1526.
6. Balsalobre, A. (2002) *Cell Tissue Res.* **309**, 193-199.
7. Glossop, N.R.J. y Hardin, P.E. (2002) *J. Cell Sci.* **115**, 3369-3377.
8. Blum, I.D., Lamont, E.W. y Abizaid, A. (2012) *Neurosci. Biobehav. Rev.* **36**, 254-270.
9. Mistlberger, R.E. (2011) *Physiol. Behav.* **104**, 535-545.
10. Mistlberger, R.E. (1994) *Neurosci. Biobehav. Rev.* **18**, 171-195.
11. Stephan, F.K. (1992) *Physiol. Behav.* **52**, 997-1008.
12. Landry, G.J., Simon, M.M., Webb, I.C. y Mistlberger, R.E. (2006) *Am. J. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **290**, R1527-R153.
13. Davidson, A.J., Poole, A.S., Yamazaki, S. y Menaker, M. (2003) *Genes Brain Behav.* **2**, 32-39.
14. Shibata, S., Tahara, Y. y Hirao, A. (2010) *Adv. Drug Deliv. Rev.* **62**, 918-927.
15. Escobar, C., Díaz-Muñoz, M., Encinas, F. y Aguilar-Roblero, R. (1998) *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **274**, R1309-R1316.
16. Martínez-Merlos, M.T., Ángeles-Catellanos, M., Díaz-Muñoz, M., Aguilar-Roblero, R., Mendoza, J. y Escobar, C. (2004) *J. Endocrinol.* **181**, 53-63.
17. Díaz-Muñoz, M., Vázquez-Martínez, O., Aguilar-Roblero, R. y Escobar, C. (2000) *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **279**, R48-R56.
18. Díaz-Muñoz, M., Vázquez-Martínez, O., Báez-Ruiz, A., Martínez-Cabrera, G., Soto-Abraham, M.V., Avila-Casado, M.C. y Larriva-Shad, J. (2010) *Comp. Hepatol.* **23**, 9.
19. Rivera-Zavala, J., Báez-Ruiz, A. y Díaz-Muñoz, M. (2011) *PPAR Res.* 2011, 261584.
20. Aceves, C., Escobar, C., Rojas-Huidobro, R., Vázquez-Martínez, O., Martínez-Merlos, T., Aguilar-Roblero, R. y Díaz-Muñoz, M. (2003) *J. Endocrinol.* **179**, 91-96.
21. Hara, R., Wan, K., Wakamatsu, H., Aida, R., Moriya, T., Akiyama, M. y Shibata, S. (2001) *Genes Cells.* **6**, 268-279.
22. Kerndt, P. R., Naughton, M. D., Driscoll, C. E. y Loxterkamp D. A. (1982) *Western J. Med.* **170**, 379-399.
23. Aronoff, S. L., Berkowitz, K., Shreiner, B. y Want, L. (2004) *Diabetes Spec.* **17**, 183-190.
24. Macfarlane, D. P., Forbes, S. y Walker, B. R. (2008) *J. Endocrinol.* **197**, 189-204.
25. Azzout, B., Bois-Joyeux, B., Chanez, M. y Peret, J. (1987) *J. Nutr.* **117**, 164-169.
26. Katz, J. y Tayek, J. A. (1998) *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **275**, E537-E542.
27. Berg, J. M., Tymoczko, J. L. y Stryer, L. (2002) *Biochemistry*. 5th edition. New York: WH Freeman.
28. Vaughan, M., Berger, J. E y Steinberg, D. (1964) *J. Biol. Chem.* **239**, 401-409.
29. Oliver, O. E. (2005) *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **33**, 246-251.

30. Báez-Ruiz, A., Escobar, C., Aguilar-Roblero, R., Vázquez-Martínez, O. y Díaz-Muñoz, M. (2005) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **289**, G1015-G1023.
31. Luna-Moreno, D., García-Ayala, B. y Díaz-Muñoz, M. (2012) *Brit. J. Nutr.* **108**, 2002–2013.
32. Schneider, J.E. y Watts, A.G. (2002) *Hormon. Brain Behav.* 1st. Ed. Elsevier Inc. Academic Press.
33. Gray, T.S., O'Donohue, T.L., and Magnuson, D.J. (1986) *Peptides* **7**, 341-349.
34. Broberger, C. y Hökfelt, T. (2001) *Physiol. Behav.* **74**, 669-682.
35. Schwartz, G.J. (2000) *Nutrition.* **16**, 866-873.
36. Friedman, M.I., Horn, C.C. y Ji, H. (2005). *Chem. Senses* **30**, i182-i183.
37. Williamson, R., McNeilly, A. y Sutherland, C. (2012) *Biochem. Pharmacol.* **84**, 737-745.
38. Konner, A.C., Klockener, T. y Bruning, J.C. (2009) *Physiol. Behav.* **97**, 632-638.
39. Vogt, M.C. y Bruning, J.C. (2012) *Trend. Endocrinol. Metab.* **849**, 1-9.

Semblanza del Dr. Mauricio Muñoz Díaz



Estudió Biología en la Facultad de Ciencias de la UNAM. La Maestría y Doctorado los realizó en el Instituto de Fisiología Celular en el programa de Investigación Biomédica Básica. Después de 2 estancias posdoctorales (en Baylor College, Houston, TX y en UCSD, San Diego, CA) se incorporó como investigador al Instituto de Fisiología

Celular, para después cambiar su adscripción al Instituto de Neurobiología en el campus UNAM-Juriquilla en Querétaro. Actualmente es Investigador Titular C y nivel III del SNI.

ARTICULO 2. Gluconeogenesis: una visión contemporánea de una vía metabólica antigua

Este artículo trata de plasmar a la vía gluconeogénica desde una perspectiva evolutiva, su regulación hormonal-transcripcional y de su diferente expresión en el acino hepático, así como la influencia del reloj biológico sobre la misma y la implicación de su desregulación.

GLUCONEOGÉNESIS: UNA VISIÓN CONTEMPORÁNEA DE UNA VÍA METABÓLICA ANTIGUA*

Moisés Pérez-Mendoza, Dalia De Ita-Pérez y Mauricio Díaz-Muñoz

Instituto de Neurobiología, Campus UNAM-Juriquilla, Querétaro 76230, QRO. México
Correo E: barrales.hebert@colpos.mx

RESUMEN

La gluconeogénesis (GNG) es la ruta metabólica que permite la síntesis de glucosa a partir de sustratos no glúcidos, principalmente en el hígado. La vía como tal, apareció temprano en la filogenia de los seres vivos, pero actualmente se le relaciona primariamente con la respuesta al ayuno (se activa) y a la alimentación (se inhibe) en organismos vertebrados. Las enzimas clave del proceso, fosfoenolpiruvato carboxilasa y glucosa 6-fosfatasa se encuentran sujetas a una compleja regulación endocrina y transcripcional. Otro tipo de regulación ejercida sobre la GNG es a través del reloj circadiano molecular, que le confiere ritmicidad con un periodo cercano a las 24 h. La GNG en el hígado se lleva a cabo principalmente en los hepatocitos periportales. Varias patologías, entre ellas la diabetes, existe desregulación en la GNG.

ABSTRACT

Gluconeogenesis (GNG) is a metabolic pathway that allows the generation of glucose from non-glycosidic substrates such as amino acids, lactate and glycerol. GNG appeared very early in the phylogenetic development of living beings. In vertebrates it is active during fasting, and inhibited after feeding. The two principal enzymes of the process, phosphoenolpyruvate carboxylase and glucose 6-phosphatase, are regulated for a complex network of endocrine and transcriptional factors. GNG is also modulated by the circadian molecular clock which communicates 24-h rhythmicity to the process. Within the liver, GNG is more active in periportal than pericentral hepatocytes. Several diseases, such as diabetes, show deregulation of the GNG.

PALABRAS

CLAVE:

Metabolismo de carbohidratos, hígado, piruvato carboxilasa, fosfoenol-piruvato carboxilasa, zonación metabólica, hormonas.

KEY WORDS:

Carbohydrates metabolism, liver, pyruvate carboxylase, phosphoenolpyruvate carboxylase, metabolic zonation, hormones.

Existen rutas metabólicas bien establecidas en los libros de texto desde hace décadas. La gluconeogénesis (GNG), que se define como la formación de glucosa a partir de sustratos diferentes a los glúcidos, se ubica en esta categoría. Sin embargo, aunque ya se cuenta con un conjunto de conceptos plenamente aceptados por la comunidad científica sobre el proceso gluconeogénico, el avance constante de la investigación biomédica básica detecta periódicamente peculiaridades bioquímicas y aspectos metabólicos novedosos que continúan enriqueciendo nuestra perspectiva. Esta revisión intenta dar cuenta de hallazgos recientes sobre el surgimiento, la naturaleza y la regulación de la GNG, haciendo evidente nuevos enfoques y aplicaciones en el quehacer médico relacionados con esta vía.

I) LA VÍA

La GNG consta de una serie de reacciones enzimáticas de aparición temprana en el surgimiento y consolidación de los seres vivos en nuestro planeta. Culmina con la síntesis neta de glucosa partiendo de sustratos diversos como aminoácidos, lactato y glicerol. En los vertebrados, se le asocia como parte de la respuesta al ayuno y es clave para el mantenimiento de la glucemia, aunque la glucosa generada también puede terminar incorporada al glucógeno hepático en ciertas condiciones post-absortivas. El hígado es el principal órgano, aunque no el único, en donde se lleva a cabo la GNG. La vía se ha detectado, aunque en mucha menor escala, en tejido renal y epitelio intestinal.

La GNG se relaciona y coordina con otras rutas

metabólicas como la glucólisis, el ciclo de Krebs y el ciclo de la urea. En la Figura 1 se ilustra un esquema con la ruta gluconeogénica, en donde se observa que sustratos como el lactato y la alanina se transforman primariamente en piruvato (todos ellos formado por 3 átomos de C), y eventualmente se encausan hasta su conversión en glucosa (6 átomos de C). Varias de las reacciones de la GNG son compartidas con la glucólisis, ya que no tienen impedimento termodinámico para ser reversibles. La GNG se caracteriza por la presencia y actividad de 4 enzimas que no participan en la glucólisis, y que por lo tanto son distintivas de la actividad gluconeogénica (1):

1. Piruvato carboxilasa: Enzima mitocondrial dependiente de biotina que forma oxaloacetato, en una reacción que se considera anaplerótica del ciclo de Krebs. Es modulada alostéricamente de forma positiva por acetil-CoA.
2. Fosfoenolpiruvato carboxicinasas: Enzima mitocondrial y/o citoplásmica, según la especie. En una reacción dependiente de energía convierte al oxaloacetato en fosfoenolpiruvato.
3. Fructuosa 1,6-bisfosfatasa: Metaloenzima que convierte al intermediario bifosfatado de la fructosa en su forma monofosfato. El AMP y la 2,6-fructosa bisfosfato actúan como inhibidores.
4. Glucosa 6-fosfatasa: Enzima intrínseca de membrana localizada en el retículo endoplásmico, permite al hígado aportar glucosa al torrente sanguíneo.

Estas enzimas se encuentran reguladas a múltiples niveles (ver siguientes secciones), pero un aspecto interesante de destacar es que el hígado siempre presenta un nivel basal de sus actividades, sin importar la condición alimenticia o la influencia endocrina.

La GNG es también susceptible de ser regulada por el estado redox celular. La reacción reversible catalizada por la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (enzima común para la glucólisis y la GNG) requiere coenzima oxidada (NAD^+) para la glucólisis y reducida (NADH) para la GNG (Fig. 1). Por lo tanto, la GNG se favorece en un estado redox reducido (relación $\text{NAD}^+:\text{NADH}$ de 500:1 en el ayuno) en comparación con un estado redox oxidado (relación $\text{NAD}^+:\text{NADH}$ de 700:1 después de comer).

La incorporación del glicerol (3 átomos de C), proveniente de la actividad lipolítica, a la ruta gluconeogénica, se realiza por su conversión a fosfato de dihidroxiacetona, mediante la acción secuencial de las enzimas glicerol cinasa y glicerol 3-fosfato deshidrogenasa.

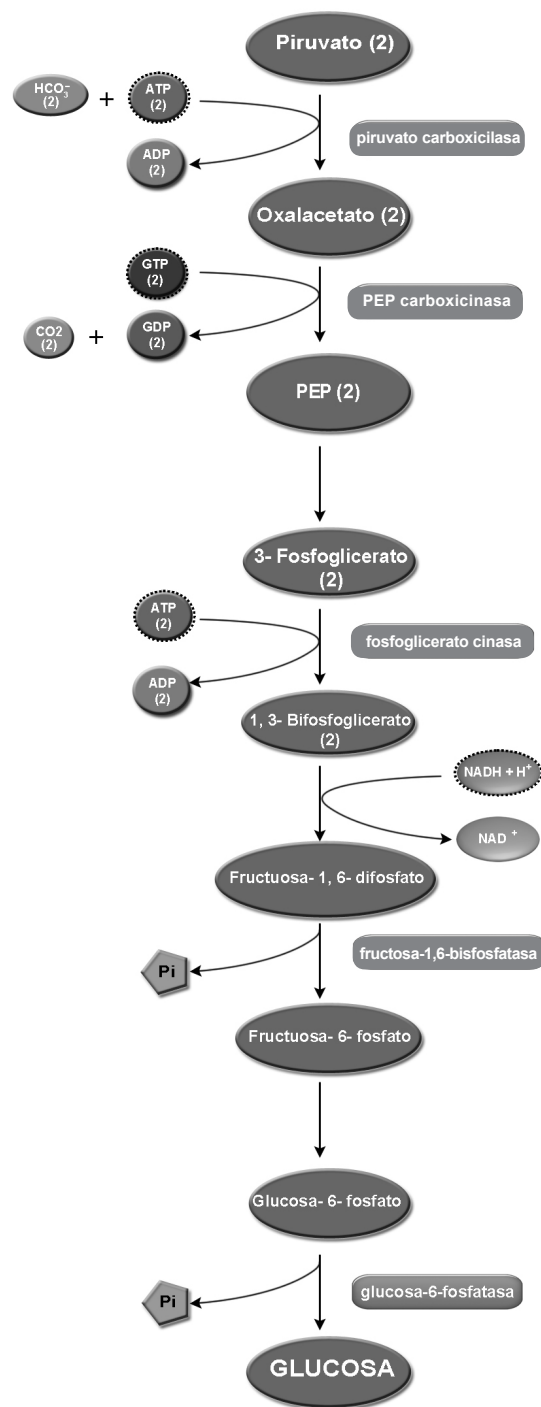
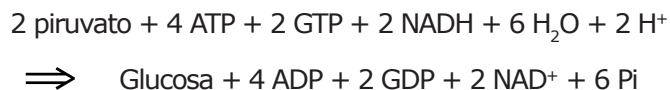


Figura 1. Elementos constituyentes y moduladores de la vía gluconeogénica del hígado.

La ecuación general que engloba las reacciones gluconeogénicas partiendo del piruvato y culminando con la síntesis de glucosa es la siguiente:



II) EVOLUCIÓN

Reportes recientes han puesto en evidencia que la GNG o elementos centrales de esta vía metabólica están presentes en micro organismos quimio-lito-autótrofos, de aparición muy temprana en la filogenia de nuestro planeta. Estos procariontes anaerobios, con capacidad de fijar CO_2 , obtienen energía a partir de la oxidación de compuestos inorgánicos como el hierro y el azufre, siendo las bacterias nitrificantes ejemplos bien conocidos. El metabolismo intermediario de estos organismos está centrado en la síntesis y manejo de la acetil-CoA; estos organismos son capaces de formar fosfoenolpiruvato por una serie de reacciones de fijación de CO_2 , y además manejan el ciclo de Krebs de manera reductiva (se produce NADH, no NAD^+). El punto clave es que en un conjunto de arqueo-bacterias y de eubacterias termofílicas se ha detectado la expresión de una fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa/fosfatasa que hace posible la formación de hexosas (como la fructosa bisfosfato) a partir de triosas lábiles (gliceraldehído fosfato y dihidroxiacetona fosfato), que son susceptibles de convertirse al compuesto tóxico metilglioxal. Esta enzima bifuncional, muy conservada y estable en altas temperaturas, pudiera representar una enzima gluconeogénica ancestral (2). Una interpretación interesante de la actividad unidireccional de la enzima fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa/fosfatasa, y de otros estudios de filogenia molecular, es que en la ruta Embden-Meyerhof-Parnas del metabolismo de glucosa, la actividad gluconeogénica (anabólica) haya precedido a la actividad glucolítica (catabólica).

III) REGULACIÓN HORMONAL-TRANSCRIPCIONAL

En los organismos, las hormonas que son secretadas por un tipo celular específico en un órgano viajan en la circulación sanguínea y regulan las funciones celulares de otros tejidos u órganos. Esta regulación implica una respuesta a la señalización endocrina que puede ser por modificaciones post-traduccionales, liberación de iones o a nivel transcripcional. En el último caso, la hormona activa un factor de transcripción específico, el cual se une a su correspondiente elemento de respuesta genómico, inhibiendo o activando genes blanco. La acción coordinada de hormonas secretadas por varios tejidos se aprecia al estudiar el mantenimiento del nivel de glucemia. La concentración de glucosa es mantenida dentro de un rango muy definido (independiente del ayuno o la alimentación), por un delicado balance entre la absorción

intestinal, la producción de glucosa por el hígado (gluconeogénesis) y la utilización de glucosa por los tejidos periféricos.

La ruta gluconeogénica es catalizada por varias enzimas, sin embargo destacan 2: la fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK) y la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa). La PEPCK es la primera enzima de la vía mientras que la G6Pasa es la última. La enzima PEPCK cataliza la conversión del oxaloacetato a fosfoenolpiruvato (PEP), y su actividad es afectada por la regulación hormonal a nivel de la transcripción ya que no se conocen modificadores alostéricos. Por otro lado, la enzima G6Pasa juega un papel importante en la formación de glucosa libre a partir de glucosa-6-fosfato (G6P). La G6P es un intermediario metabólico de encrucijada, ya que además de participar en la GNG-glucólisis, interviene en el metabolismo del glucógeno y en el ciclo de las pentosas. La expresión genética de estas 2 enzimas se modula a la alta por varias hormonas, entre ellas el glucagon (proviene del páncreas) y los glucocorticoides (proviene de la corteza adrenal) que son secretados principalmente durante el ayuno. También, el ácido retinoico y las hormonas tiroideas favorecen la transcripción del gen *PEPCK*. En contraste, la insulina que es liberada por las células β pancreáticas cuando hay disponibilidad de alimento, es el principal represor transcripcional de los genes de las enzimas PEPCK y G6Pasa.

IV) FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXICINASA (PEPCK)

La transcripción del gen *Pepck* en el hígado está sujeta a regulación por múltiples factores tanto coactivadores como correpresores que se unen a la región promotora, y que son activados y reclutados por la acción secuencial y coordinada de las hormonas implicadas (Fig. 2). Entre los coactivadores que regulan su transcripción se incluyen: la proteína de unión al CREB (CBP), el coactivador del receptor de esteroides tipo 1 (SRC-1), el coactivador del PPAR γ tipo 1 α (PGC-1 α). Se ha sugerido que el factor SRC-1 interacciona con HNF-4 α ("hepatic nuclear factor-4 α "), COUP-TFII ("chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II") y con HNF-3 β , los cuales son todos necesarios para una inducción transcripcional máxima por parte de los glucocorticoides, formando así un gran complejo transcripcional con CBP. Por otro lado, el glucagon induce el aumento en los niveles del mensajero de PGC-1 α , siendo PGC-1 α un estimulador de la transcripción de *Pepck*. Sin embargo, la transcripción de *Pepck* ocurre aun sin PGC-1 α (niveles basales) sugiriendo que actúa como un amplificador

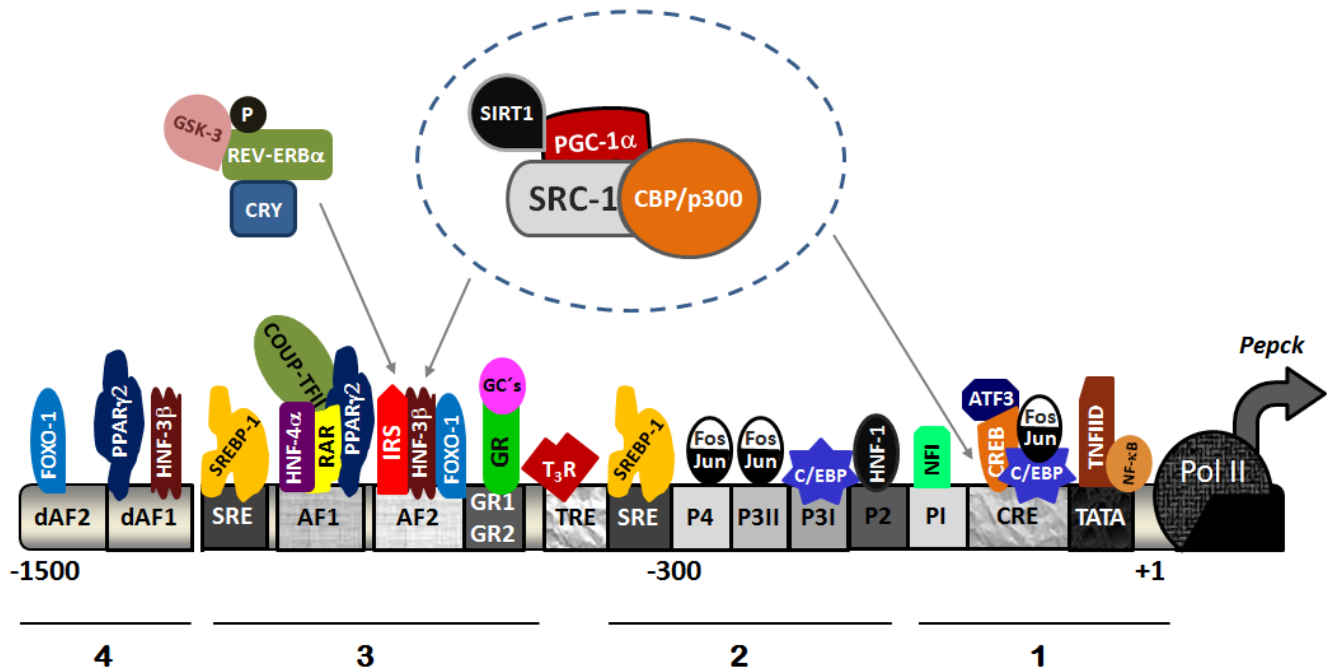


Figura 2. Factores de transcripción que se unen al sitio promotor de *Pepck*. Elemento regulado por AMPc (CRE); RNA polierasa II (Pol II); elementos reguladores que interaccionan con miembros de la familia C/EBP (P1, P2, P3I, P3II, P4); elemento regulado por esteroides (SRE); elemento de respuesta a hormonas tiroideas (TRE); unidades reguladas por glucocorticoides (GR1, GR2); factores accesorios (AF1, AF2); factores accesorios distales (dAF1, dAF2); factor nuclear κ B (NF- κ B); factor de transcripción IID (TFIID); heterodímero (Fos/Jun); proteína de unión aceleradora/CAAT (C/EBP); proteína de unión del elemento regulado por AMPc (CREB); factor de transcripción activado 3 (ATF3); factor nuclear 1 (NF1); factor nuclear hepático (HNF-1, HNF-3 β , HNF-4 α); proteína de unión al elemento regulado por esteroides (SREBP-1); receptor de la hormona tiroidea T3 (T₃R); glucocorticoides (GC); receptor de glucocorticoides (GR); factor de transcripción forkhead (FKHR o FOXO); receptor activado por el proliferador peroxisomal gamma 2 (PPAR γ 2); receptor de ácido retinoico (RAR); factor de transcripción del promotor de ovoalbúmina de pollo tipo II (COUP-TFII); secuencia regulada por insulina (IRS); coactivador del receptor de esteroides tipo 1 (SRC-1); sirtuina 1 (SIRT1); coactivador de PPAR gamma tipo 1 α (PGC-1 α); proteína de unión a CREB/p300 (CBP/p300); cinasa de la glucógeno sintasa tipo 3 (GSK-3); criptocromo (CRY); proteína del receptor nuclear (REV-ERB α); grupo acetilo (Ac). Las flechas significan que la proteína o complejo proteínico se une a las proteínas señaladas favoreciendo (+) o inhibiendo (-) el evento transcripcional. Los números indican que son isoformas diferentes. Adaptado de referencia 3.

transcripcional para este gen. También, la acción de la enzima sirtuina 1 (SIRT1) al deacetilar a PGC-1 α promueve la transcripción por el ensamblaje del complejo transcripcional que incluye al SRC-1 y al CBP/p300. Sin embargo, se ha propuesto que el PGC-1 α , junto con FOXO-1 ("forkhead box proteína O1") y HNF-4 α , participa en la inhibición promovida por insulina de la transcripción del gen *Pepck*. La SIRT1 y el NAD⁺ favorecen la disminución de la actividad de FOXO-1. Mientras, que el CBP al interactuar con el NF-1, C/EBP β -B1, Sp1 y con SREBP-1c inhibe su transcripción (3).

El promotor del gen *Pepck* comprende 4 regiones (Fig. 2). La región I presenta una caja TATA, crucial para la transcripción basal y un elemento regulador de AMPc (CRE) a través del cual el AMPc ejerce su efecto estimulador en la transcripción de

Pepck. Otros factores que se unen a esta región incluye al NF-1, CREB, CREM, C/EBP, Fos/Jun, ATF-3 y AT-4. La región II es importante para la regulación de tejidos específicos, tiene un dominio que une a HNF-1 y que es requerido para la expresión renal de PEPCK y un elemento regulador que interacciona con miembros de la familia C/EBP de factores de transcripción en sitios conocidos como P3(1). El sitio P3(1) es también necesario para la inducción del gen *Pepck* en respuesta a la triyodotironina (T3), al AMPc, y a la proteína de unión al CRE (CREB), que interactúa con el coactivador tipo 1 del receptor de esteroides (SRC-1) al ser reclutado por el receptor tiroideo (TR) en presencia de T3. La región III, contiene una unidad regulada por glucocorticoides (GRU), que contiene 2 sitios regulatorios (GR1 y GR2), 2 sitios (AF1 y AF2) que

unen al receptor del ácido retinoico (RAR), una secuencia regulada por la insulina (IRS), el factor nuclear hepático tipo 3 β (HNF-3 β) y -4 α , el elemento que une al factor transcripcional promotor de la ovoalbúmina de pollo (COUP-TF), y los sitios para receptores activados por el factor proliferador peroxisomal PPAR γ 2. Además, 2 sitios de unión al SREBP-1 localizado en ambas regiones II y III que permiten la regulación por la insulina disminuyendo la expresión del gen *Pepck*. La región IV, contiene elementos reguladores que están implicados en la expresión del tejido adiposo del gen *Pepck*. Aquí se ha detectado un sitio de unión a PPAR γ 2, que es requerido para la expresión de *Pepck*, en el tejido adiposo blanco así como el pardo. Otros factores que se unen a los sitios de unión dAF son FOXO-1 y HNF-3 β (4).

El estudio de los mecanismos responsables de la regulación de la transcripción del gen *Pepck* por la acción de la insulina ha sido un campo de mucho interés por más de 50 años. En 1963, Shrago y colaboradores publicaron el primer análisis sistemático de la regulación de la expresión génica de *Pepck* por hormonas, incluyendo a la insulina. Observaron que en hígados de ratas diabéticas, la actividad de la PEPCK aumentaba, y que al inyectar insulina la actividad disminuía hasta niveles basales. Estos estudios fueron de suma importancia en la predicción de que durante la diabetes se estimulaba la expresión de *Pepck*, debido a una elevación en los niveles de AMPc, y a la falta de acción inhibitoria de la insulina. Otro factor enzimático importante en la regulación de la PEPCK es la glucógeno sintasa cinasa tipo 3 (GSK-3), que al fosforilar a la enzima glucógeno sintasa (GS) provoca que disminuya su actividad y por lo tanto que se reduzca la formación de glucógeno. Con respecto a la regulación de la PEPCK, al disminuir la GSK-3 se ha observado que también disminuye la expresión de *Pepck* (3). Otros factores que disminuyen la expresión de *Pepck* (también de G6Pasa) es la proteína reloj "cryptochrome" tipo 1 (CRY1), al interactuar con la subunidad α de las proteínas G e interferir en su señalización (5) y el receptor nuclear estimulado por las proteínas de reloj (REV-ERB α), el cual se une a la región del elemento de respuesta a receptores nucleares (RORE) e impide la unión de otros factores de transcripción que favorecen la expresión de *Pepck*, además de reprimir directamente a PGC-1 α (6).

V) GLUCOSA-6-FOSFATASA (G6Pasa)

La G6Pasa está localizada en el retículo endoplásmico y es un sistema con estructura cuaternaria

que consta de una subunidad catalítica y transportadores para G6P y glucosa. El gen para G6pasa, tiene regiones promotoras que inducen su expresión en respuesta a múltiples factores: elementos de respuesta a glucocorticoides, al AMPc estimulado por glucagón, la misma glucosa, los ácidos grasos libres y a la insulina (Fig. 3).

Hay 3 elementos que favorecen la expresión de G6pasa por medio del receptor a glucocorticoides (GR) que se unen a HNF-1 y -4, factores que se unen al CRE y a FKHR (FOXO-1a), que son esenciales para su completa inducción. El único factor que inhibe la respuesta de los glucocorticoides es el nGRE4 con una baja afinidad. La unidad de respuesta a insulina (IRU, por sus siglas en inglés) disminuye la transcripción de G6pasa, y está compuesta por las regiones A y B. La región A funciona como un elemento accesorio para la unión de HNF-1. La región B contiene 3 elementos de respuesta a insulina (IRE) denominados IRE-1, -2 y -3. Así el FOXO-1a une a IRE-1 con una alta afinidad y a IRE-2 con baja afinidad, pero con similar importancia para la respuesta de la insulina. Sin embargo, IRE-3 no reconoce a FOXO-1a. Además, la respuesta del promotor de G6pasa a AMPc depende de la cooperación entre las regiones proximal y distal, e involucra a HNF-4 α , los sitios de unión a C/EBP y a CREB. De forma similar, el PGC-1 α actúa en conjunto con el HNF-4 α y el GR para inducir la expresión de G6pasa. La insulina actúa vía la cinasa Akt/PKB fosforilando e inactivando a PGC-1 α , con la intermediación de TORC2 fosforilado. El coactivador TORC2 interactúa con CREB favoreciendo la expresión de PGC-1 α en respuesta al glucagón durante el ayuno permitiendo un incremento en G6pasa. Por otro lado, la isoforma α 2 de la cinasa AMPK reduce la expresión de G6pasa al fosforilar e inhibir a TORC2. El factor transcripcional FOXO-1 es otro potente estimulador de la transcripción de G6pasa, siendo más efectivo que para *Pepck* (7). La glucosa por medio de sus elementos de respuesta en el promotor de G6pasa, coadyuva a su expresión al interactuar con HNF-1. Otro factor enzimático es la GSK-3, su acción en la expresión de la G6pasa es similar que con la *Pepck*, que al disminuir la GSK-3 también disminuye la expresión de G6pasa (3). Los ácidos grasos libres (FFA, por sus siglas en inglés) también contribuyen de forma positiva a la expresión de G6pasa. Los FFA más abundantes durante el ayuno son el palmitato y el oleato. El palmitato favorece el reclutamiento de varios factores como PPAR γ , HNF-4 α , HNF-3 β , C/EBP α , C/EBP β , SREBP-1, FOXO, CREB, NF-kB y COUP-TF, los cuales incrementan la expresión de G6pasa (8).

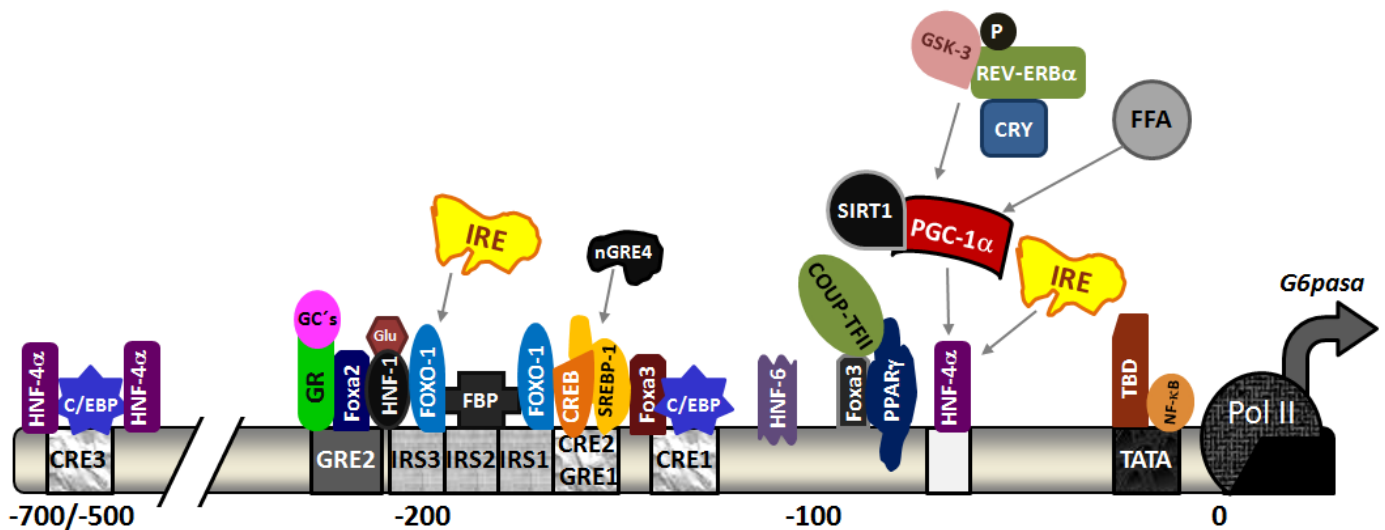


Figura 3. Factores de transcripción que se unen al sitio promotor de *G6pasa*. Elementos regulados por AMPc (*CRE1*, *CRE2*); RNA polimerasa II (*Pol II*); elementos regulados por glucocorticoides (*GRE1*, *GRE2*); secuencias reguladas por insulina (*IRS1-3*); factor nuclear κ B (*NF- κ B*); proteína de unión a la secuencia TATA (*TBD*); proteína de unión aceleradora/CAAT (*C/EBP*); proteína de unión del elemento regulado por AMPc (*CREB*); factores nucleares hepáticos (*HNF-1*, *HNF-4a*, *HNF-6*); elemento de respuesta a insulina (*IRE*); proteína de unión al elemento regulado por esteroides (*SREBP-1*); glucosa (*Glu*); receptor de glucocorticoides (*GR*); factor de transcripción forkhead (*FHFR* o *FOXO*); receptor activado por el proliferador peroxisomal gamma (*PPAR γ*); factor de transcripción del promotor de ovoalbúmina de pollo (*COUP-TFII*); sirtuina 1 (*SIRT1*); coactivador de *PPAR* gamma tipo 1a (*PGC-1 α*); cinasa de la glucógeno sintasa tipo 3 (*GSK-3*); criptocromo (*CRY*); proteína de receptor nuclear (*REV-ERB α*); ácidos grasos libres (*FFA*); grupo acetilo (*Ac*); grupo fosfato (*P*). Las flechas significan que la proteína o complejo proteínico se une a las proteínas señaladas favoreciendo (+) o inhibiendo (-) el evento transcripcional. Los números indican que son isoformas diferentes. Modificada de referencia 8.

VI) REGULACIÓN NUTRICIONAL Y CIRCADIANA

La homeostasis de glucosa debe estar muy bien regulada para asegurar las demandas de energía durante los ciclos ayuno/alimentación en los animales. En este contexto, es bien sabido que la GNG hepática es la vía metabólica principal que mantiene normales los niveles de glucosa en sangre durante períodos prolongados de ayuno.

Varias funciones biológicas en los mamíferos, incluida la alimentación, son controladas por el reloj circadiano, localizado en el núcleo supraquiasmático (NSQ) hipotalámico. El NSQ coordina a los relojes periféricos ubicados en diversos órganos, como el hígado, a través de señales nerviosas, sinápticas y humorales. La ritmicidad circadiana se sustenta en un mecanismo molecular presente en cada una de las células del organismo, donde se involucran asas de retroalimentación transcripción-traducción de una familia de genes denominados reloj (Fig. 4).

Los ritmos circadianos y el estado energético en el organismo están íntimamente ligados, lo cual se ha evidenciado por el descubrimiento de que el receptor hormonal nuclear huérfano (NRH) alfa erb

reverso (*REV-ERB- α*) y los receptores huérfanos de ácido retinoico (*ROR α* y *β*) constituyen un asa de retroalimentación corta que controla la transcripción de *Bmal1* (brain and muscle aryl hydrocarbon nuclear translocator like) (9) (Fig. 4). Tanto *PPAR α* como *PGC1 α* , modulan la transcripción de *Bmal1* a través de la misma asa, indicando que *REV-ERB- α* es un punto esencial para la entrada metabólica en el reloj molecular. En este sentido, la GNG se ve abolida por la delección de *Bmal1* y se atenúa en los ratones mutantes del gen *Clock* (10). Además, la proteína *CRY* regula los cambios circadianos de la GNG hepática al inhibir la producción de AMPc estimulado por el glucagón, lo cual posiblemente es debido a la interacción con la subunidad *Gs α* de una proteína G (11) (Fig. 5).

Otros estudios han demostrado que la dieta tiene un gran impacto en la fisiología de los relojes periféricos. Damiola y col. (12) reportaron que cambios en la alimentación cambian el patrón circadiano de expresión génica en el hígado, pero no en el NSQ. Los nutrientes de la dieta, y la forma de tener acceso al alimento, son estímulos que repercuten directamente en los relojes periféricos. Estudios en humanos que siguieron un protocolo

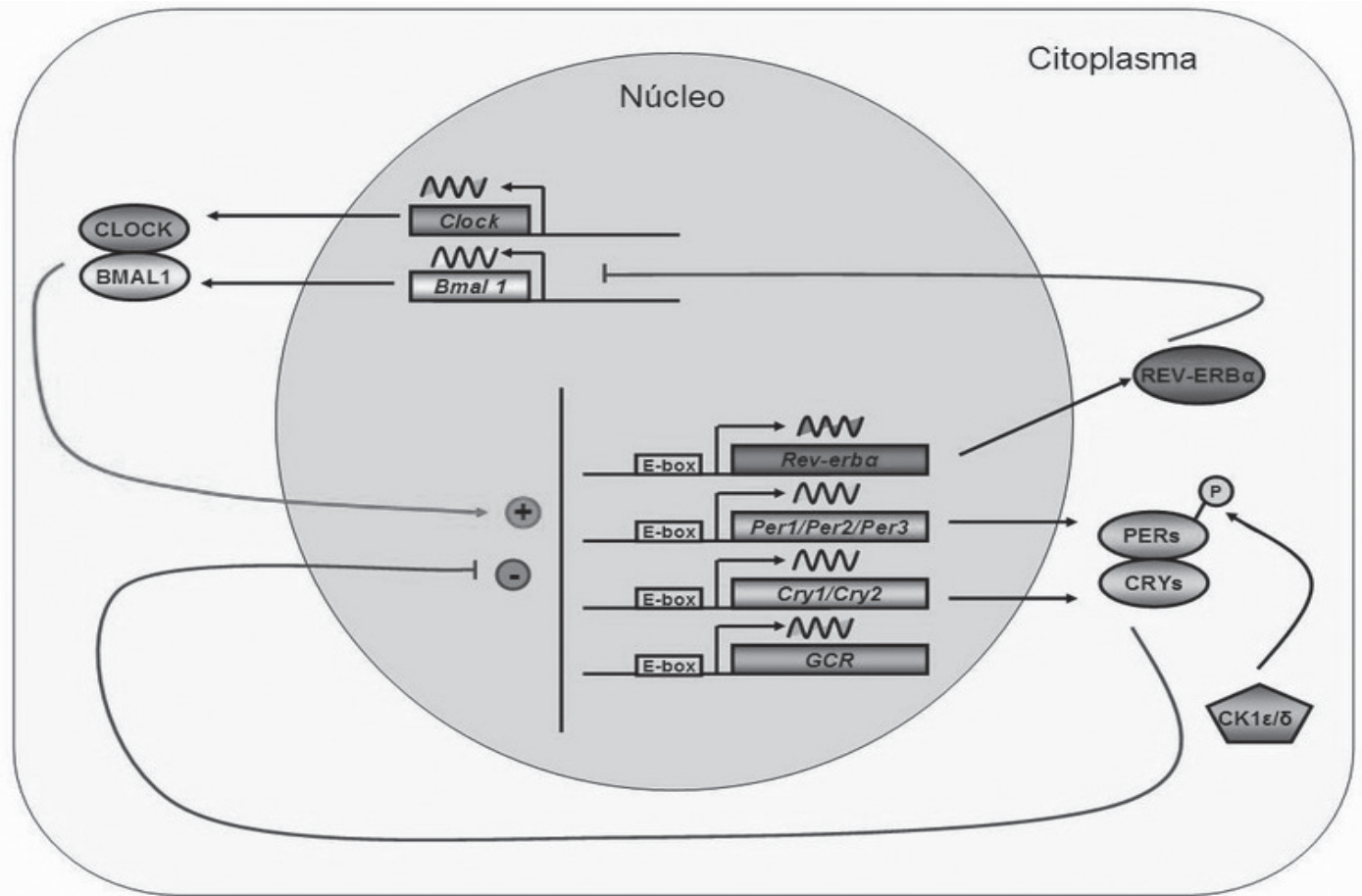


Figura 4. Mecanismo molecular del reloj circadiano. Se conforma por un asa de retroalimentación positiva, integrada por los genes *Clock* y *Bmal1* y 2 asas de retroalimentación negativa. Una de las cuáles se integra por los genes *Period* (*Per*) y *Cryptochrome* (*Cry*) y la otra por el gen *Rev-erb α*, respectivamente. Una vez que los genes *Clock* y *Bmal 1* son transcritos y traducidos, sus proteínas en el citoplasma forman un heterodímero que se transloca al núcleo y autorregula de manera positiva su propia transcripción. Por otro lado, los genes *Per* y *Cry*, cuyas proteínas en el citoplasma se heterodimerizan entre sí y se activan por la caseína cinasa épsilon ($CK\epsilon$), se translocan al núcleo e inhiben su propia transcripción. Además, la proteína *REV-ERB α* cuya proteína en el citoplasma se transloca al núcleo, regula negativamente la transcripción de los genes reloj *Clock* y *Bmal1*. Adaptado de referencia 9.

de alimentación con restricción calórica, mostraron una modificación del metabolismo hepático con un incremento de la GNG y cetogénesis. Estas acciones se asociaron a un aumento en la disponibilidad de sustratos gluconeogénicos como el lactato y aminoácidos, así como a un estímulo en la β -oxidación mitocondrial. Estos experimentos demostraron que la composición dietética, el tamaño de la ración de alimento, y la hora en la que se come, pueden impactar la regulación circadiana del control metabólico.

VII) REGULACIÓN CELULAR Y ZONAL

El hígado es el órgano central del metabolismo, y en apariencia su histología parece ser homogénea. Sin embargo, diversos estudios histoquímicos y

bioquímicos han mostrado diferencias entre los hepatocitos que integran la unidad anatómica y funcional del hígado –el lóbulo o acino hepático– (Fig. 6). Dichas diferencias incluyen tanto la presencia como la concentración de diversas enzimas implicadas en varias vías metabólicas. A este fenómeno se la ha denominado zonación metabólica o heterogeneidad funcional (13).

El acino hepático se divide en 3 regiones: i) una zona externa denominada región periportal (PP) o zona 1, integrada por la población de hepatocitos que rodea a la triada portal, compuesta por una ramificación de la arteria hepática (HA), por la vena porta (PV) y por un conducto biliar (BD); ii) una zona intermedia o zona 2, la cual es una región de transición entre la zona más externa y la más interna y iii) una zona interna, llamada re-

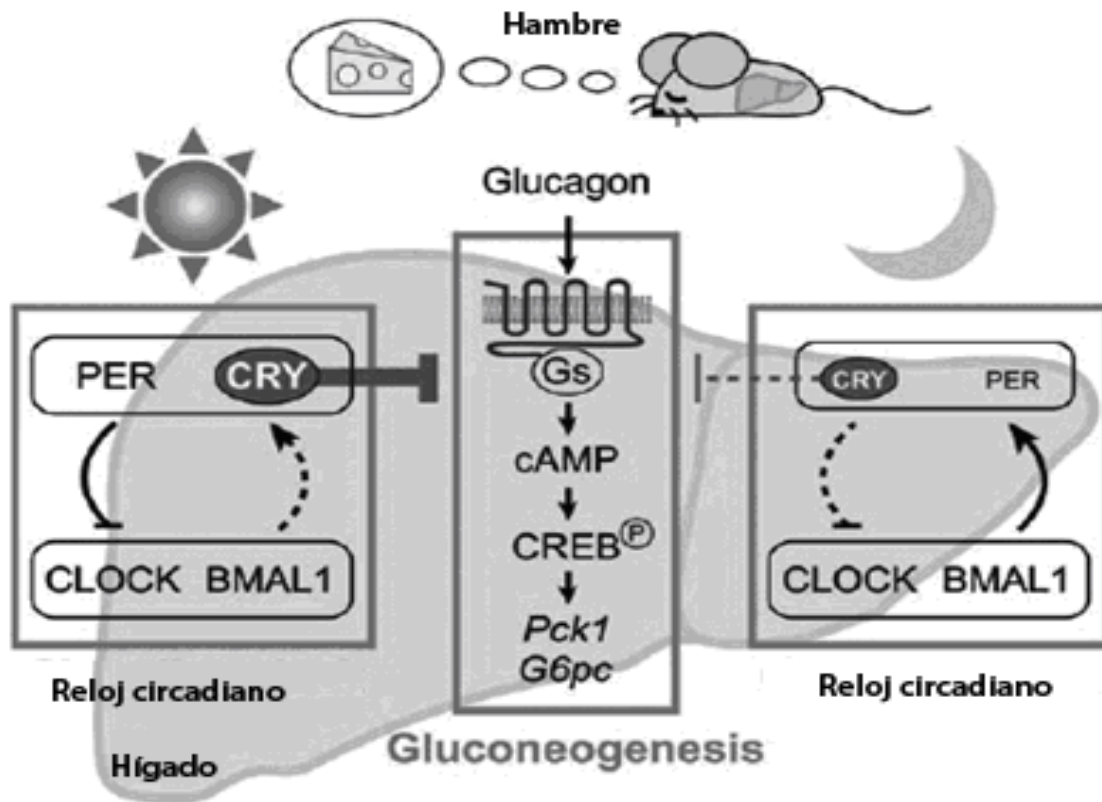


Figura 5. La proteína reloj CRY regula la gluconeogénesis en el hígado. Las asas de retroalimentación circadianas (recuadros laterales) están constituidas de los activadores transcripcionales CLOCK y BMAL1 y los represores PER y CRY. En el hígado de ratones, el heterodímero CLOCK-BMAL1 activa la expresión de los genes *Per* y *Cry* en la noche temprana (recuadro derecho). Una vez traducidas, las proteínas PER y CRY inhiben la actividad de CLOCK-BMAL1 por la mañana (recuadro izquierdo) formando un asa de retroalimentación negativa que presenta un ciclo por día. La señal de hambre induce la gluconeogénesis a través de la activación de la señal de cAMP/CREB –unión del elemento de respuesta a cAMP– (recuadro central). CRY inhibe la producción de cAMP estimulada por glucagón, a través de la interacción de este con la subunidad G_s de una proteína G. La ritmicidad circadiana de los niveles de CRY da pie al programa gluconeogénico con el ayuno. Por la mañana cuando los niveles de CRY son elevados, la respuesta es discreta (recuadro izquierdo), mientras que en la noche temprana cuando los niveles de CRY son bajos y los ratones normalmente empiezan a comer, la respuesta es elevada (recuadro derecho). Adaptado de referencia 11.

gión pericentral (PC) o zona 3, conformada por los hepatocitos que circundan a la vena central (Fig. 6). Estas características anatómicas permiten un mayor aporte de oxígeno, nutrientes, sustratos metabólicos y hormonas a la zona PP, respecto a la zona PC. Esta situación determina un gradiente enzimático a lo largo del acino que permite a determinadas vías metabólicas llevarse a cabo de manera preponderante en una u otra región del eje portal-venoso. De esta forma, se sabe que la glucólisis, lipogénesis y metabolismo de xenobióticos son mayoritarios en la zona PC, mientras que la GNG, ureagénesis y metabolismo oxidativo se realizan primordialmente en la zona PP (Fig. 6). Es de suma importancia mencionar que la zonación metabólica es dinámica más que estática, lo que permite al hígado adaptarse a alguna alteración metabólica, tal como el ayuno prolongado.

Durante la fase post-absortiva entre las comidas, el glucógeno es primeramente degradado a glucosa en la zona PP; posteriormente la glucosa se oxida a lactato en la zona PC. El lactato es liberado a la circulación y transportado a la zona PP, donde se utiliza para la GNG. En la fase absortiva después de las comidas, la glucosa pasa por alto a los hepatocitos PP y es capturada por los hepatocitos PC y ahí se convierte en glucógeno. Cuando las reservas de glucógeno están al límite en los hepatocitos PC, la glucosa es degradada a lactato, el cual deja el hígado, recircula al área PP y es capturado y convertido vía GNG a glucosa y eventualmente a glucógeno (13).

Rajas y col. (14) observaron por inmunohistoquímica la distribución de las enzimas gluconeogénicas PEPCCK y G6Pasa en el acino hepático, en animales con alimentación *ad libitum* y en animales con ayuno de 48 h. Encontraron que en los animales *ad libitum*,

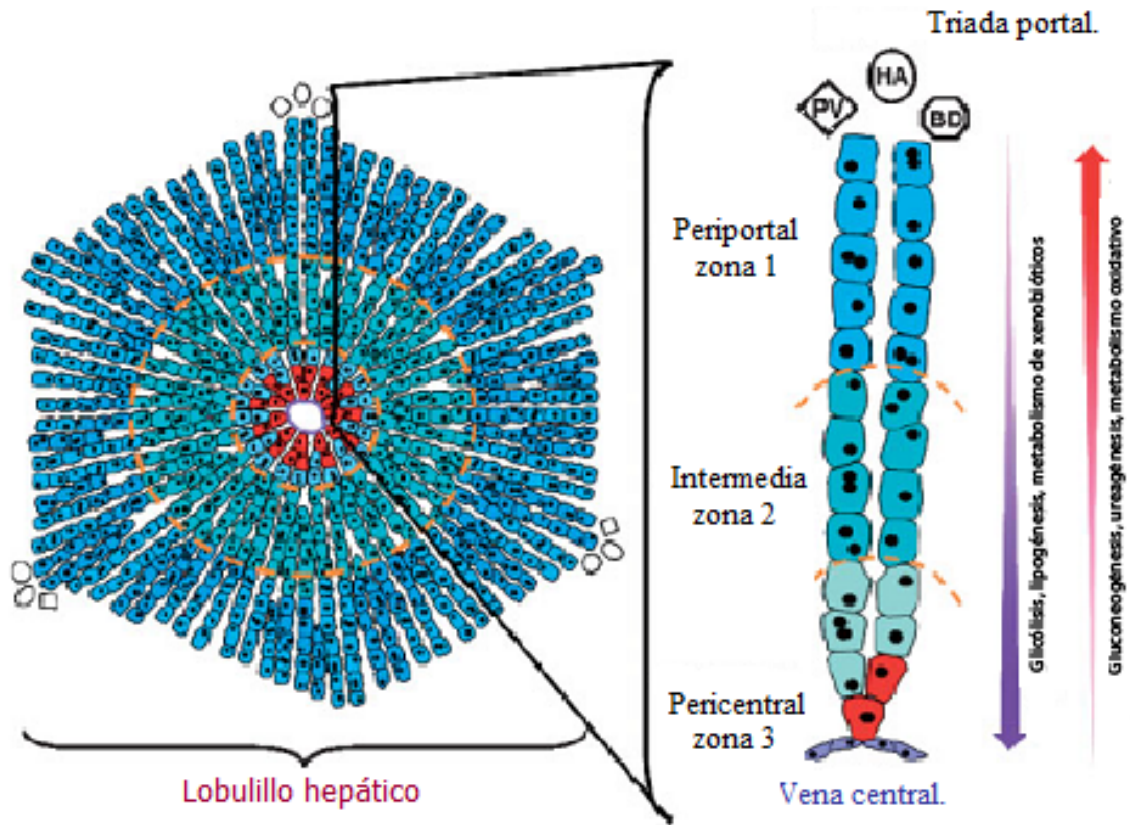


Figura 6. Diagrama de la unidad microanatómica del hígado. El lóbulo o acino hepático. A lo largo del eje portavenoso, los hepatocitos se dividen en 3 zonas: periportal, intermedia y pericentral, cada una alrededor de referencias anatómicas específicas como la triada portal (conformada por la vena portal, una ramificación de la arteria hepática y un conducto biliar) y la vena central. Tal disposición, les confiere gradientes enzimáticos de diversas vías metabólicas. Adaptado de referencia 15.

la enzima G6Pasa se presenta con muy baja concentración en la zona PP, incrementando su expresión en la misma zona durante el ayuno y extendiéndose sutilmente en la zona PC. En tanto, la PEPCK presentó una evidente zonación PP tanto en los animales *ad libitum*, como en los ayunados, pero en éstos se hace también muy evidente también en la zona PC. Lo anterior, refleja un gradiente enzimático de la zona PP a la PC, en el que la zona gluconeogénica no solo se intensifica, sino que se amplía a lo largo del acino, cuando se incrementa la capacidad gluconeogénica del hígado en periodos de ayuno.

Las poblaciones de hepatocitos en el acino hepático también muestran una heterogeneidad estructural al ser examinados bajo el microscopio electrónico. Estas diferencias se manifiestan en el tamaño de las células hepáticas en cada región zonal, así como en el tamaño y cantidad de organelos en cada población: en los hepatocitos PP las mitocondrias son más grandes que en los hepatocitos PC, mientras que hay una mayor proporción de retículo endoplásmico liso y lisosomas en los hepatocitos PC (Tabla 1).

Estas diferencias son muy importantes, ya que algunas enzimas de la GNG tienen una localización subcelular específica. Tal es el caso de la PEPCK que cataliza, como ya se mencionó, la conversión de oxalacetato a fosfoenolpiruvato. Existen 2 formas de la PEPCK, la citosólica y la mitocondrial, codificadas por 2 diferentes genes nucleares. Se ha propuesto que la PEPCK mitocondrial lleva a cabo la GNG a partir de oxaloacetato; mientras que la PEPCK citosólica lleva a cabo la GNG a partir de aminoácidos glucogénicos como la alanina (5).

Además, algunos coactivadores transcripcionales como el PGC-1 α , que regula los genes implicados en el metabolismo energético mitocondrial, se ha relacionado con la regulación en la producción de glucosa hepática. En animales ayunados se induce su expresión en el hígado, propiciando una regulación a la alta de las 2 enzimas, PEPCK y G6Pasa (16).

Por lo anterior, podemos concluir que la zonación hepática optimiza la actividad metabólica y el uso de la energía celular al hacer posible la separación

parcial de procesos antagónicos en diferentes células, como la GNG y la glucólisis.

VIII) IMPLICACIONES CLÍNICAS Y PERSPECTIVAS

Se reconoce una extensa variedad de afecciones de carácter metabólico en las que existe GNG alterada. Entidades patológicas como la obesidad, la diabetes y el llamado síndrome metabólico, se caracterizan por promover niveles elevados de glucosa sanguínea, aún en estados de ayuno. Esta circunstancia que conlleva a graves implicaciones al estado de salud general, y que se convierte en un factor de pronóstico reservado, se asocia a un incremento de la GNG hepática, así como de la actividad glucogenolítica (hidrólisis del glucógeno hepático). Por supuesto, el aumento de GNG se asocia a una desregulación de la vía, ya sea por una pérdida de sensibilidad a la señalización por insulina, o a una exacerbación de la señalización por glucagon. Entre los múltiples blancos farmacológicos que se han visualizado en los últimos años para disminuir o mitigar la producción de glucosa por el hígado, se encuentran inhibidores de las enzimas gluconeogénicas fructuosa 1,6-bisfosfatasa y glucosa 6-fosfatasa (1).

Otra situación que eventualmente puede favorecer el aumento de la GNG en estados alterados de salud, es el incremento de sustratos gluconeogénicos que acompañan ciertos padecimientos. En esta categoría se encuentra la actividad lipolítica elevada, que se traduce en un incremento en el glicerol circulante, además de una mayor disponibilidad de ácidos grasos libres cuya oxidación en el hígado favorece la GNG. Condiciones que favorecen la liberación de aminoácidos del tejido muscular como la fatiga excesiva y estados de caquexia, aumentan la disponibilidad de alanina que también

sirve como sustrato gluconeogénico.

Se ha reconocido en los últimos años una cascada de respuestas transcripcionales que se inician en el retículo endoplásmico (mediadas por factores tales como PERK, ATF4 y ATF6, entre otros) en situaciones de estrés metabólico, que se conoce como respuesta reticular. La respuesta reticular en el hígado se ha asociado con el desarrollo de la diabetes y la obesidad. Recientemente se reportó una conexión directa entre la respuesta reticular y un incremento en la GNG, mediada por una disminución en la actividad de la cinasa dependiente de AMP (AMPK) y un aumento simultáneo en la actividad y expresión del factor C/EBP β . El conjunto de ambas acciones resulta en un incremento de la transcripción de las enzimas gluconeogénicas (17). Estos eventos forman parte de algunas de las alteraciones propias del estado diabético y de la ganancia incrementada de peso corporal que repercuten en la señalización intracelular responsable del incremento en la producción de glucosa por parte del hígado en estas condiciones patológicas.


La ingesta de etanol tiene un efecto inhibitorio sobre la GNG. El mecanismo de acción del etanol para ejercer esta acción es consecuencia de su metabolismo, ya que al servir de sustrato a la enzima alcohol deshidrogenasa genera un desbalance en el equilibrio redox, tanto citosólico como mitocondrial. El estado redox altamente reducido (aumento de NADH en los 2 compartimentos) promovido por el etanol incide sobre el equilibrio de reacciones que favorecen la transformación de intermediarios gluconeogénicos hacia otros metabolitos. Por ejemplo, el piruvato se convierte en lactato y el oxaloacetato en malato. El resultado final es un decremento en la actividad de la GNG, que coadyuva a la hipoglicemia que frecuentemente caracteriza a los consumidores de bebidas etílicas. 

TABLA 1
Heterogenidad morfológica de las células hepáticas.

Zona periportal (PP) o zona 1		Zona pericentral (PC) o zona 3	
Hepatocitos	pequeños	Hepatocitos	grandes
Mitocondria	grandes	Mitocondria	pequeñas
Membrana del Golgi	↑	Membrana del Golgi	↓
Glicógeno del Golgi	↑	Glicógeno del Golgi	↓
Retículo endoplásmico liso	↓	Retículo endoplásmico liso	↑
Lisosomas	↓	Lisosomas	↑

La flecha hacia arriba (↑) indica una cantidad mayor del organelo o componente. La flecha hacia abajo (↓) indica una cantidad menor del organelo o componente.

REFERENCIAS

1. Nuttall FQ, Ngo A, Gannon MC (2008) Regulation of hepatic glucose production and the role of gluconeogenesis in humans: is the rate of gluconeogenesis constant? *Diabetes Metab Res Rev* 24:438-458.
2. Fuchs G (2011) Alternative pathways of carbon dioxide fixation: insights into the early evolution of life? *Annu Rev Microbiol* 65:631-658.
3. Chakravarty K, Cassuto H, Reshef L, Hanson RW (2005) Factors that control the tissue-specific transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase-c. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 40:129-154.
4. Chakravarty K, Hanson RW (2008) Insulin regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase-C gene transcription: The Role of Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c. *Nut Rev* 65:S47-S56.
5. Zhang EE, Liu Y, Dentin R, Pongsawakul PY, Liu AC, Hirota T, Nusinow DA, Sun X, Landais S, Kodama Y, Brenner DA, Montminy M, Kay SA (2010) Cryptochrome mediates circadian regulation of cAMP signaling and hepatic gluconeogenesis. *Nat Med* 16:1152-1156.
6. Yin L, Wu N, Lazar MA (2010) Nuclear receptor Rev-erba: a heme receptor that coordinates circadian rhythm and metabolism. *NRS* 8:1-6.
7. Yabaluri N, Bashyam MD (2010) Hormonal regulation of gluconeogenic gene transcription in the liver. *J Biosci* 35:473-484.
8. Xu C, Chakravarty K, Kong X, Tuy TT, Arinze IJ, Bone F, Massillon D (2007) Several transcription factors are recruited to the glucose-6-phosphatase gene promoter in response to palmitate in rat hepatocytes and H4IIE cells. *J Nutr* 137:554-559.
9. Bass J, Takahashi JS (2010) Circadian integration of metabolism and energetics. *Science* 330:1349-1354.
10. Kennaway DJ, Owens JA, Voultsios A, Boden MJ, Varcoe TJ (2007) Metabolic homeostasis in mice with disrupted Clock gene expression in peripheral tissues. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293:1528-1537.
11. Hatori M, Panda S (2010) CRY links the circadian clock and CREB-mediated gluconeogenesis. *Cell Res* 20:1285-1288.
12. Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, Schibler U (2000) Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev* 14(23):2950-61.
13. Katz NR (1992) Metabolic heterogeneity of hepatocytes across the liver acinus. *J Nutr* 122:843-849.
14. Rajas F, Jourdan-Pineau H, Stefanutti A, Mrad EA, Iynedjian PB, Mithieux G. (2007) Immunocytochemical localization of glucose 6-phosphatase and cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase in gluconeogenic tissues reveals unsuspected metabolic zonation. *Histochem Cell Biol* 127(5):567.
15. Burke ZD, Tosh D (2006) The Wnt/ β -catenin pathway: master regulator of liver zonation? *BioEssays* 28:1072-1077.
16. Hanson RW, Reshef L (1997) Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annu Rev Biochem* 66:581-611.
17. Choudhury M, Qadri I, Rahman SM, Schroeder-Gloeckler J, Janssen RC, Friedman JE (2011) C/EBP β is a AMP kinase sensitive and up-regulates PEPCK in response to ER stress in hepatoma cells. *Mol Cell Endocrinol* 331:102-108.

Procesos de regulación fisiológica

Los procesos de regulación fisiológica son importantes y variados, ya que pueden actuar en función de la demanda de las condiciones expuestas en el medio. Entre estos procesos se conocen a la homeostasis, la alostasis, la reostasis y la cronostasis.

Homeostasis

El concepto fue inspirado por Claude Bernard (1857) donde postula la condición de la vida, como el mecanismo regulador, al “medio interno”. De hecho, su experiencia en la vivisección lo iluminó para proponer su teoría del equilibrio dinámico de los seres vivos o *milieu intérieur*. Según él, las células tienen una organización muy compleja porque están cubiertas de líquidos que caracterizan su medio interno. Esto las obliga a mantener un equilibrio interno y gozar de mecanismos de compensación que las hacen independientes del medio externo (con ciertos límites). Esta idea no fue muy bien aceptada por la comunidad científica a principios del siglo XX, de ahí que Walter Canon (1929) propusiera su concepto de homeostasis como la estabilidad de los sistemas fisiológicos que mantienen la vida o la constancia para la misma. Después de la segunda guerra mundial, Norbert Wiener y cols. (1948) proponen que hay sistemas de retroalimentación negativa que proveen a los organismos mecanismos orientados a lograr un fin específico, es decir, mantener una variable regulada dentro de un rango específico de valores. Por otro lado, después de más de un siglo de fisiología exclusivamente homeostática se conocen otros procesos y que éste no es el único mecanismo de regulación fisiológica (Rodríguez de Romo, 2007).

Reostasis

El concepto de reostasis fue propuesto por Nicholas Mrosovsky (1990), donde se refería a los procesos fisiológicos encargados de adaptar las funciones orgánicas a cambios en las necesidades del organismo, o en las condiciones del ambiente en las que el organismo se encuentra. La reostasis propone que el punto de regulación de diversos procesos fisiológicos, no puede ser único ni absoluto, porque impondría demandas energéticas prácticamente incosteables para el organismo, con lo que se limitaría su capacidad adaptativa. Por otro lado, denota que el punto de regulación de una variable fisiológica se da en función de las necesidades del organismo, impuestas por las condiciones particulares del individuo respecto

a su desarrollo o por las condiciones ambientales que lo rodean. Por otro lado, el concepto de alostasis fue introducido por McEwen y Wingfield (2003), el cual es muy similar al de reostasis. Sin embargo, se relaciona más a procesos de respuesta al estrés.

Cronostasis

El concepto de cronostasis define aquellos mecanismos que transmiten un orden temporal a diversos procesos fisiológicos, que ajustan el tiempo interno (biológico) con el ambiental (geofísico) y regulan el desarrollo diurno de los diferentes procesos fisiológicos y conductuales entre sí. La forma en que la cronostasis opera es a través del sistema circadiano, es decir, un mecanismo preciso y eficaz para medir el tiempo, ya sea por uno o varios relojes biológicos (Aguilar-Roblero, 2007).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el protocolo de la expresión del OSA, se han encontrado incrementados algunos parámetros que sugieren adaptaciones físicas y metabólicas anticipándose a la llegada del alimento y como consecuencia del manejo del mismo durante las horas posteriores. Así como algunos otros parámetros encontrados en un análisis por microarreglos del hígado, una actividad locomotriz incrementada, una distensión gástrica provocada por la hiperfagia, modificaciones en los niveles de hormonas gluconeogénicas como el glucagón y la corticosterona, una glucemia casi normal con tendencia a hipoglucemia, niveles de ácidos grasos y cuerpos cetónicos elevados, un estado redox oxidado y niveles elevados de ATP. De lo anterior, ya que hay ciclos de ayuno-alimentación durante el protocolo, se sugiere que exista una gran activación gluconeogénica hepática durante la expresión del OSA, provocando una adaptación fisiológica diferente a la de una alimentación *ad libitum*.

4. HIPÓTESIS

Se espera que la actividad gluconeogénica hepática aumente en comparación con los animales con alimento *ad-libitum*.

5. OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar la gluconeogénesis hepática durante un protocolo de acceso restringido al alimento.

Objetivos particulares

Determinar lo siguiente:

- La actividad enzimática de las proteínas clave que regulan la gluconeogénesis hepática: G6pasa y PEPCK.
- La presencia de las proteínas clave que regulan la gluconeogénesis hepática: G6pasa y PEPCK por Western blot.
- La distribución de la proteína clave de la gluconeogénesis (PEPCK) en la zonación hepática (periportal y pericentral) por Inmunohistoquímica.
- El perfil diurno de la glucosa circulante (glucemia).
- La gluconeogénesis hepática global *in vivo*, por prueba de tolerancia a alanina (formación de glucosa a partir de alanina).
- La presencia de las proteínas clave que regulan la producción de glucógeno hepática: GYS y pGYS (Ser641) por Western blot.
- La contenido de glucógeno hepático por Tinción de PAS/D.
- El perfil diurno de las hormonas involucradas en la regulación de la gluconeogénesis hepática: Corticosterona, Glucagon e Insulina.
- La resistencia a la glucosa, por prueba de tolerancia a la glucosa.
- La presencia de algunas proteínas clave que participan en la regulación transcripcional de la gluconeogénesis hepática: SIRT1 y PGC-1 α por Western blot.

6. RESULTADOS

ARTÍCULO 3 – Daytime restricted feeding modifies the daily variations of liver gluconeogenesis: Adaptations in biochemical and endocrine regulators

ORIGINAL ARTICLE

Daytime restricted feeding modifies the daily variations of liver gluconeogenesis: Adaptations in biochemical and endocrine regulators

Moisés Pérez-Mendoza, Julieta B. Rivera-Zavala, and Mauricio Díaz-Muñoz

Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus UNAM-Juriquilla, Querétaro, QRO, México

Daytime restricted feeding (DRF) promotes circadian adaptations in the metabolic processing of nutrients. We explored the hepatic gluconeogenic response in DRF rats by the temporal profiles of the following: (1) the activity of glucose 6-phosphatase (G6Pase) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), as well as the periportal and pericentral distribution of PEPCK; (2) conversion of alanine to glucose; (3) glycemia and liver glycogen content; (4) presence of glycogen synthase (GYS) and its phosphorylated form (at Ser641, pGYS); (5) circulating levels of corticosterone, glucagon and insulin; (6) glucose-tolerance test; and (7) sirtuin 1 (SIRT1) and peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator 1 α (PGC-1 α). The results showed that DRF promoted: (1) a phase shift in G6Pase activity and an increase in PEPCK activity as well as a change of PEPCK from periportal to pericentral hepatocytes, (2) a net conversion of alanine to circulating glucose, (3) a decrease in glycemic values and a phase shift in the liver glycogen content, (4) a phase shift in GYS and an increase of pGYS, (5) an increase in the daily levels of corticosterone and glucagon, but a reduction in the levels of insulin, (6) normal glucose homeostasis in all groups and (7) an enhanced presence of SIRT1 and PGC-1 α . It is proposed that the increased gluconeogenic in DRF group promotes synthesis of hepatic glycogen and the production of glucose. These results could be a modulation of the gluconeogenic process due to rheostatic adaptations in the endocrine, metabolic and timing regulation of liver and could be associated with the physiology of the food entrained oscillator.

Keywords: Alanine tolerance test, food entrained oscillator, glucose metabolism, gluconeogenesis, PEPCK, glycogen

INTRODUCTION

Restricted feeding schedules have been used as an experimental protocol to study diverse aspects of nutrition and metabolic responses in relation to the circadian system (Lima et al., 1985; Philippens et al., 1977). In particular, daytime restricted feeding (DRF) is an experimental protocol used to study the physiological and metabolic adaptations of circadian rhythmicity when mealtime becomes a predominant timing cue in nocturnal animals (Stephan, 2002). DRF usually involves food intake for 2–4 h in the middle of the light period. After a few days of this routine, the animals show behavioral arousal before mealtime, which is known as anticipatory activity (AA) (Mistlberger, 2009). In addition, the 24-h variations of a great variety of metabolic and endocrine parameters change in phase, amplitude or even the type of rhythmicity. Overall, DRF

orchestrates a physiological response that has been considered by some authors as rheostatic in nature (Aguilar-Roblero & Díaz-Muñoz, 2010). Underlying the DRF protocol is also the expression of an alternative circadian oscillator, different and independent of the hypothalamic suprachiasmatic nuclei, whose anatomic location is so far unknown. This putative oscillator is known as the food entrained oscillator (FEO; Mendoza, 2007). DRF/FEO expression involves distinctive physiological and circadian aspects such as a marked hyperphagia, disruption of the resting period and lower caloric intake (Martínez-Merlos et al., 2004; Mistlberger, 2011).

Two key parameters that control the metabolic networks, the redox state and the energy charge, change in the liver during the DRF protocol/FEO expression: during AA, cytoplasmic and mitochondrial

Submitted November 28, 2013, Returned for revision March 12, 2014, Accepted March 24, 2014

Correspondence: Mauricio Díaz-Muñoz, PhD, Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Campus UNAM-Juriquilla, Querétaro, QRO 76230, México. Tel/Fax: +52 (442) 2381035. E-mail: mdiaz@comunidad.unam.mx

redox states become oxidized and their ATP content increases (Díaz-Muñoz et al., 2000). In addition, DRF promotes specific modulation of lipid metabolism (augmented lipolysis and reduced levels of liver triacylglycerols) (Díaz-Muñoz et al., 2010; Rivera-Zavala et al., 2011), an increased amplitude of the serum urea rhythm (Luna-Moreno et al., 2012) and a phase shift in the hepatic glycogen content (Escobar et al., 1998). The DRF protocol involves a short time for daily food intake, and hence, food is inaccessible for most of the 24-h period. This situation resembles a fasted day. Thus, it is of interest to determine how biochemical responses in the liver associated with fasting are modulated by this chronobiological and metabolic challenge. However, so far, no reports exist regarding the gluconeogenic response in the DRF protocol.

Gluconeogenesis (GNG) is an ancient metabolic pathway that played an important role in CO₂ fixation in the early evolution of life (Fuchs, 2011), but in mammals is mainly related to the replenishment of circulating glucose by the periportal hepatocytes of the liver in fasting and in pathological conditions (Roden & Bernroider, 2003). In the liver, GNG is under a complex transcriptional, endocrine and neuronal control. Overall, glucagon (*via* cAMP, adenosine monophosphate cyclic, cAMP response element-binding (CREB), acutely transforming retrovirus AKT8 in rodent T cell lymphoma/protein kinase B, and CRE, cAMP-responsive element) and glucocorticoid (*via* the glucocorticoid receptor [GR] and glucocorticoid-responsive element) are the main positive hormonal regulators. Co-activators such as peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator 1 α (PGC-1 α), hepatic nuclear factors (HNFs), and forkhead O box (FoxO) can up-regulate the transcriptional activities of gluconeogenic genes. The redox sensor sirtuin 1 (SIRT1) can also favor the activity of some of these transcriptional factors. In contrast, insulin secreted after food intake represses the gluconeogenic response by disrupting, *via* Akt/PKB signaling, the gluconeogenic transcriptional machinery (Jitrapakdee, 2012).

In order to gain more understanding regarding the physiological adjustments in the liver of rats under restricted feeding schedules and expressing the FEO, the aim of this project was to explore the hepatic gluconeogenic response by characterizing the temporal profiles of the following: (1) the activity of marker enzymes the glucose 6-phosphatase (G6Pase) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), (2) the hepatic zonal distribution of PEPCK, (3) conversion of alanine to glucose, (4) gluconeogenic outputs (glycemia, liver glycogen content and glycogen synthesizing enzymes), (5) hormonal regulators (corticosterone, glucagon and insulin), including an evaluation of the glucose-tolerance test and (6) metabolic effectors (silent mating type information regulation 2 homolog 1, SIRT1 and PPAR- γ coactivator 1- α , PGC1- α).

MATERIALS AND METHODS

Animals and housing

Adult male Wistar rats weighing 180–220 g at the beginning of the experiment were maintained in a 12:12 h light–dark cycle (lights on at 08:00 h) at constant temperature (22 ± 1 °C), with an average light intensity of 350 lux. The animal groups ($n=4$) were kept in transparent acrylic cages ($40 \times 50 \times 20$ cm) with free access to water and food unless stated otherwise. All experimental procedures were approved and conducted according to the institutional guide for care and use of animals under biomedical experimentation and under international ethical standards (Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Mexico; Portaluppi et al., 2010).

Experimental design

The control and experimental groups were similar to those reported by Ángeles-Castellanos et al. (2005). Rats were distributed randomly to determine daily and food-entrained rhythmicity and assigned to the one of the following feeding conditions for 3 weeks:

- (1) Control animals fed *ad-libitum* with free access to food and water throughout the 24-h period (AL).
- (2) Experimental group with restricted feeding schedule: food access was limited manually to 2 h daily, from 12:00 to 14:00 h (DRF).

At the end of the feeding protocol, different subgroups of animals were sacrificed at 3-h intervals over a 24-h period, starting at 08:00 h.

In addition, for a comparison with the daily cycle of fasting (22 h) – re-feeding (2 h) in the DRF group, two additional control groups were included as follows:

- (1) Animals were maintained with free food access for 3 weeks; on the last day, food was removed at 14:00 h, and the animals were sacrificed (at 11:00 h) after 21 h (\sim 1 day) of food deprivation (acute Fasted).
- (2) Rats were similarly deprived of food for 22 h, then re-fed for 2 h (from 12:00 h to 14:00 h) and sacrificed at 14:00 h (acute Refed).

The DRF protocol used in this project has been proved to be adequate to elicit AA and all the biochemical markers that characterized FEO expression. For example, it has been reported that unpredictable feeding schedules are unable to produce AA (Escobar et al., 2007). Nocturnal AA has also been studied in rats (Landry et al., 2011); however, the metabolic and physiological adaptations associated to the FEO have not been as extensively characterized as with the DRF protocol.

Blood and liver sampling

Rats were sacrificed by decapitation for trunk blood collection. Blood was collected in two fractions. The first fraction was collected in vacutainer tubes and centrifuged at 5000 rpm for 5 min to obtain serum; the other fraction was collected in tubes with 1% citrate and centrifuged at 3500 rpm for 10 min to obtain plasma.

The liver was divided into two portions: 5 g was processed for subcellular fractionation (nucleus, microsomes and cytosol) according to Aguilar-Delfin et al. (1996), and 0.5 g was cut into fragments of $\sim 1 \text{ mm}^3$ for immunohistochemistry. The subcellular fractionation was done as follows: liver was homogenized in 10 mM Tris-HCl (pH 7.4; 1:10 w/v), the homogenate was centrifuged at 1500 g for 15 min, and the pellet was kept for further isolation of the nuclear fraction. The supernatant was centrifuged at 10 000 g for 20 min to sediment the mitochondrial fraction. The new supernatant was ultracentrifuged at 100 000 g for 60 min yielding the microsomal (pellet) and the cytosolic fractions (supernatant). The nuclear fraction was prepared from the first pellet using the citric acid method reported by Reiners and Busch (1980).

Western blot analyses

The cytosolic fraction was used to measure the presence of PEPCK, glycogen synthase (GYS), glycogen synthase phosphorylated at Ser641 (pGYS), SIRT1 and PGC-1 α , whereas the microsomal fraction was the source of G6Pase. Total protein was measured using the Folin phenol reagent (Lowry et al., 1951). Equal amounts of proteins were mixed with 2 \times Laemmli sample buffer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) and incubated at 80 °C for 10 min. The proteins were separated on a 10% polyacrylamide gel, electroblotted onto a nitrocellulose membrane and then incubated overnight with one of the following primary antibodies: goat polyclonal anti-PEPCK (sc-28477) and anti-G6Pase (sc-33839), mouse monoclonal anti-SIRT1 (sc-74465) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and rabbit polyclonal anti-GYS (3886), anti-pGYS (Ser641; 3891, Cell Signaling Technology, Danvers, MA), anti-PGC-1 α (ab-54481) and anti- β -actin (ab75186) (Abcam, Cambridge, MA), at 1:250 dilution. Membranes were washed and incubated for 2 h with alkaline phosphatase (AP)-conjugated secondary antibody against goat, mouse and rabbit at 1:5000 dilution; and bands were visualized using the AP conjugate substrate kit (Bio-Rad Laboratories) according to the manufacturer's instructions. β -Actin was used as loading control.

PEPCK hepatic zonation

PEPCK was detected and quantified in liver slices (8 μm) with a goat polyclonal antibody (sc 28477) (Santa Cruz Biotechnology) using a modified technique (Luna et al., 2008) as follows: the tissue was incubated for 20 min in sodium citrate buffer (10 mM sodium citrate, 0.05% Tween, pH 6) at 95–100 °C. Samples were washed with buffered saline, blocked with milk and incubated overnight with anti-PEPCK primary antibody, 1:100 dilution. The slices were then incubated for 1 h with rabbit anti-goat polyclonal antibody conjugated to FITC (sc2010) (Santa Cruz Biotechnology), 1:250 dilution. Controls to test for unspecific labeling were prepared by omitting the primary antibody. The fluorescent signal was

quantified with the Image Pro-Plus program as follows: total fluorescence was determined in at least 10 fields from individual periportal and pericentral hepatocytes in three liver slices per rat. The measurements were done at times corresponding to the peaks and valleys of the daily variation of PEPCK activity in AL and DRF groups. The total number of hepatocytes analyzed was at least 120 for each experimental condition.

Liver glycogen content

Glycogen was analyzed following the protocol of Díaz-Muñoz et al. (2010). In brief, liver fragments (six rats for each experimental group) were immediately placed for 48 h in a fixative solution (freshly prepared 10% w/v formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2), embedded in paraffin, sectioned at 7- μm thickness and assessed for glycogen content within the hepatocytes by the Periodic acid Schiff reaction with diastase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) addition for non-specific staining (PAS/D). The staining was quantified with the Image Pro-Plus program as follows: area staining was determined in at least six fields (40 000 μm^2 each) in three liver slices per rat.

PEPCK and G6Pase activity

PEPCK activity was measured at 30 °C as described by Opie and Newsholme (1967). Briefly, phosphoenolpyruvate was carboxylated by PEPCK to form oxaloacetate, which was then converted to malate using malic dehydrogenase. This conversion was monitored by a decrease in NADH absorbance at 340 nm. G6Pase activity was assayed by quantifying the released phosphate according to Nordlie & Arion (1966) with minimal modifications. The protein concentration was measured using the Lowry method (Lowry et al., 1951).

Hormonal parameters

Corticosterone (in 100 μL of serum) was quantified using an ELISA assay (Assay Design, Ann Arbor, MI), following the instructions of the manufacturer. Glucagon (in 100 μL of plasma) and insulin (in 10 μL of serum) were quantified using ELISA assays (ALPCO Diagnostics, Windham, NH) as instructed by the manufacturer. Absorbance was measured at 405 nm (corticosterone assay), at 490 nm (glucagon assay) and at 450 nm (insulin assay) using an ELISA reader (Bio-Rad, Laboratories, Richmond, CA). All determinations were performed in duplicate.

Glucose determinations

Serum glucose was measured using a commercial colorimetric kit (Glucose GOD FS*, DiaSys Diagnostic Systems, Holzheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. For the alanine tolerance test (ATT), rats were deprived of food for ~ 1 day (21-h fasting), and trunk blood samples were taken at time 0 (baseline) or 10, 20, 40 and 60 min after an i.p. injection of L-alanine (100 mg/kg body weight, Sigma) dissolved

in pre-warmed PBS. Serum glucose levels were determined as previously mentioned. For glucose tolerance tests (GTT), rats were deprived of food for ~1 day (21-h fasting), and after an i.p. injection of glucose (2 mg/g body weight) in sterile water, blood was collected from the tail immediately (time 0) as well as 15, 30, 60 and 120 min later. At each time point, glucose was measured using a glucometer (AccuChek Active, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN).

Data analysis

Data were grouped for experimental condition and time and are displayed as mean \pm standard error of the mean. They were compared with a two-way ANOVA for independent measures with a factor for group (two levels) and a factor for time (eight levels). In order to determine significant time effects for each curve, a one-way ANOVA was performed for individual groups. The one- and two-way ANOVAs were followed by a Bonferroni post hoc test with significant values set at $p < 0.05$. For chronobiological analysis, first a one-way ANOVA was performed in each group and then a 24-h period single-cosinor method was used as previously described (Caldelas et al., 2007). For the feeding condition controls, a Student's *t*-test was used to detect significant differences between fasted vs. re-fed and DRF vs. fasted (11:00 h). For rhythmic interpretation of the results, the following parameters were considered: acrophase, MESOR, amplitude and rhythmicity, which correspond to a p value (< 0.01) of an F test of fitting the original results to an expected sinusoidal curve with a 24-h period. Statistical analysis was performed with the program GraphPad Prism, version 5.0, for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). All graphs were drawn using the SigmaPlot curve-fitting program (Jandel Scientific, San Rafael, CA).

RESULTS

DRF enhanced the activity of liver PEPCK and shifted the phase of G6Pase

Daily variations in the enzymatic activities of hepatic G6Pase and PEPCK are shown in Figure 1 for the AL and DRF groups. Rhythmic parameters are shown in Table 1. The AL group showed a peak in G6Pase activity at the light–dark transition (20:00 h), as expected for a gluconeogenic marker (Figure 1A). DRF promoted a phase shift in the G6Pase activity, with the highest values at times before food access (08:00 h and 11:00 h). No change in the amplitude of the fluctuation was observed (Figure 1A). The daily PEPCK activity in the AL group showed two peaks of different amplitude, the larger at the light–dark transition (08:00 h) and the smaller at the end of the light period (17:00 h). This bimodal pattern is also observed in the DRF group, but with lower amplitude, and a shift of the 17:00 h peak to the dark period (23:00 h). The average value of PEPCK activity over the

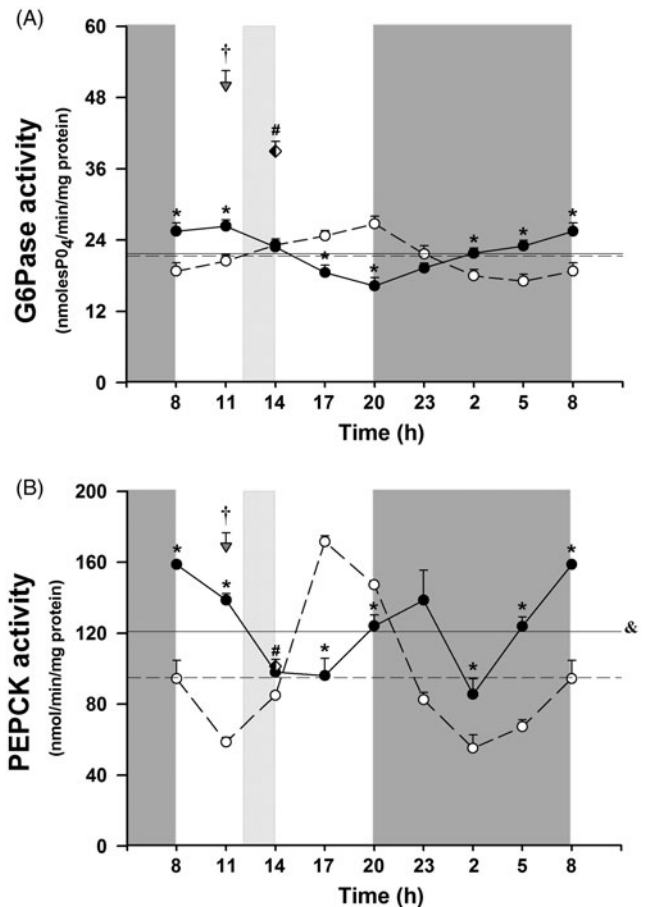


FIGURE 1. Daily variations of gluconeogenic enzymatic markers glucose 6-phosphatase (G6Pase) and phosphoenol-pyruvate kinase (PEPCK) under the protocol of daytime restricted feeding (DRF). Temporal profile of G6Pase activity (panel A) and PEPCK activity (panel B). AL (white circles), DRF (filled circles), acute fasting (gray triangle) and acute re-feeding groups (black–white rhombus). Light on at 08:00 h and off at 20:00 h. Hatched bars indicate mealtime (12:00 h–14:00 h). Data are expressed as mean \pm SEM of at least eight independent observations. #Significant difference between fasting vs. re-feeding (Student's *t* test, $p < 0.001$). †Significant difference between groups before food access, DRF vs. fasting (11:00 h) (Student's *t* test, $p < 0.001$). *Time points with a significant difference between AL and DRF groups (two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test, $p < 0.05$). &Significant difference in the 24-h mean between DRF and AL groups (Student's *t* test, $p < 0.05$).

complete 24-h period was significantly higher in DRF rats (~22%) (Figure 1B).

Acute fasting clearly increased the microsomal G6Pase activity (more than twofold at 11:00 h). This increase was partially reversed (~20%) after 2 h of feeding (14:00 h), but the activity was still higher than the values shown by the AL and DRF groups (Figure 1A). A similar response was observed for cytoplasmic PEPCK activity: evident elevation before food access (11:00 h) and reduction after mealtime (14:00 h). Different from G6Pase, the values of PEPCK activity in the controls of feeding condition were within the range of the activity shown by the AL and DRF groups (Figure 1B).

TABLE 1. Chronobiological parameters obtained by Cosinor analysis for the effects of daytime restricted feeding on glycemia, gluconeogenic markers and endocrine and metabolic regulators.

	MESOR		Amplitude		Acrophase (h)		Rhythmicity (%)	
	AL	DRF	AL	DRF	AL	DRF	AL	DRF
Glycemia (mg/dL)	94 ± 1.5	89 ± 1.7	12 ± 0.2	18 ± 0.3	19 ± 0.3	16 ± 0.3	93	60
Corticosterone (ng/mL)	176 ± 7.3	209 ± 5.4	51 ± 2.1	41 ± 1.1	18 ± 0.7	13 ± 0.3	88	42
Glucagon (pg/mL)	110 ± 17	187 ± 45	37 ± 6	66 ± 16	11 ± 1.7	11 ± 2.6	31	63
Insulin (ng/dL)	–	2.2 ± 0.3	–	1.3 ± 0.2	–	14 ± 1.9, 2 ± 0.3	–	41
G6Pase activity	21 ± 1.1	22 ± 1.1	12 ± 0.6	12 ± 0.6	20 ± 1.1	11 ± 0.5	92	92
PEPCK activity	95 ± 4.3	120 ± 6.7	42 ± 1.9	29 ± 1.6	20 ± 0.9	8 ± 0.4, 23 ± 0.7	56	74
G6Pase/ β -actin	1.4 ± 0.14	1.1 ± 0.04	0.5 ± 0.01	0.27 ± 0.01	17 ± 0.5	12 ± 0.5	76	65
GYSTOTAL/ β -actin	1 ± 0.06	0.9 ± 0.03	0.2 ± 0.01	0.12 ± 0.004	22 ± 1.4	13 ± 0.4	79	52
pGYS (Ser641)/ β -actin	0.8 ± 0.09	1.3 ± 0.1	0.6 ± 0.07	0.9 ± 0.1	23 ± 2.7	5 ± 0.6	67	50
Liver glycogen content	195 ± 13	232.3 ± 20	104 ± 0.34	54 ± 0.03	5 ± 0.6	7 ± 0.7	87	51
SIRT1/ β -actin	–	0.4 ± 0.09	–	0.34 ± 0.07	–	11 ± 2.5	–	51

Single mean Cosinor analysis was performed to evaluate daily rhythmicity (significant rhythm at $p < 0.05$).

Amplitude represents the difference between the peak (or trough) and the mean value of a wave (Mesor). Acrophase represents the time at which the peak of a rhythm occurs. The existence of rhythmic patterns was defined by one-way ANOVA. Values are means \pm SE of $n = 40$ with 4–8 animals per time point.

Bold numbers indicate significantly different from the control group (t student, $p < 0.05$). Hyphen indicates no rhythmic pattern detected.

DRF increased the amount of liver G6Pase and shifted the phase of PEPCK

Daily variations of hepatic G6Pase and PEPCK detected by western blot are shown in Figure 2 for the AL and DRF groups. Rhythmic parameters are shown in Table 1. The AL group showed a distinct peak in G6Pase signal at the transition from light to darkness (17:00–20:00 h), similar to that observed for G6Pase activity (Figure 1A). DRF promoted a reduction in the average daily levels of G6Pase, the highest values at times before food access (11:00 h) and the amplitude of the fluctuation decreased (Figure 2A). The amount of PEPCK protein in the AL group reached a plateau at the light–dark transition that continued all night (17:00–05:00 h). However, in the DRF group, a bimodal pattern was observed (one peak at 11:00–14:00 h and another peak at 02:00 h), but with higher amplitude. It was noteworthy that the 24-h average value of PEPCK activity was not significantly different in DRF and AL rats (Figure 2B).

Acute fasting clearly increased the microsomal G6Pase protein (by 20% at 11:00 h). This increase was reversed after 2 h of feeding (14:00 h) (Figure 2A). A similar response was observed for cytoplasmic PEPCK protein: evident elevation before food access (11:00 h) with a clear reduction after mealtime (14:00 h) (Figure 2B).

DRF modified the hepatic zonation of PEPCK

To gain information regarding PEPCK expression in periportal and pericentral hepatocytes during the DRF protocol, immunohistochemical observations were done in liver slices (Figure 3) at the times corresponding to the highest and lowest activities detected in the daily PEPCK rhythm (Figure 1B): for the AL group at 08:00 h and 20:00 h (peaks) and 2:00 h (valley); for the DRF group at 11:00 h and 23:00 h (peaks) and 14:00 h (valley). As expected, the PEPCK signal was

enriched in periportal hepatocytes in control groups of feeding conditions (the acute fasted and re-fed rats), since the ratio periportal/pericentral of PEPCK signal was 2.4 and 3.5, respectively. Similarly, AL rats showed PEPCK expression mostly in periportal hepatocytes at times of peak activity (ratio of 1.5 at 08:00 h and 2.9 at 20:00 h), but also during the valley (ratio of 1.3 at 02:00 h). In contrast, the PEPCK zonation showed striking changes in the DRF group at certain times: at the peak at 11:00 h, the expression of PEPCK was mainly periportal (ratio 1.4); however, in the valley (14:00 h) and at the peak at 23:00 h, the expression of PEPCK was mainly pericentral (ratios 0.2 and 0.5, respectively).

Taken together, the results with the gluconeogenic markers suggest that hepatic GNG is more active, with modified 24-h rhythmicity and an enriched expression in pericentral hepatocytes in DRF rats at certain times. Hence, the next experiment was designed to evaluate the outputs of the gluconeogenic pathway in the DRF protocol by measuring the daily variations of glycemia and the liver glycogen content.

Twenty-four hour profile of glycemia is modified by DRF

The temporal variations of glycemia during a 24-h period and the effect of DRF are shown in Figure 4, panel A. Rhythmic parameters are listed in Table 1. The AL group showed a temporal profile with an increased glucose level at the transition from the light to the dark periods (from 17:00 h to 20:00 h), reaching a plateau that was maintained during the dark period. This pattern is the one expected for species with nocturnal feeding habits. In contrast, the DRF group showed a single peak in blood glucose after food intake (14:00 h); later, at 17:00 h, the glycemia decreased, reaching levels even lower than the average value in the AL group. The reduced level of blood glucose increased gradually until

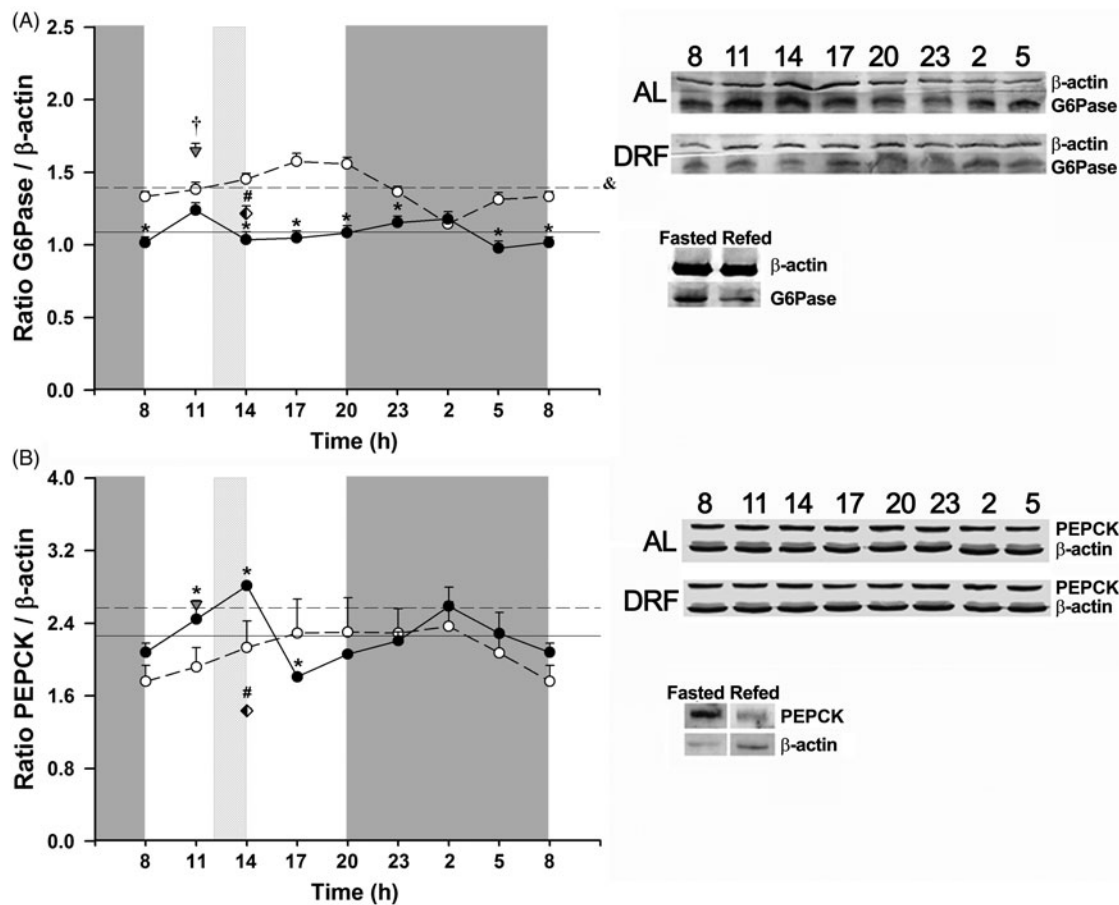


FIGURE 2. Daily variations of expression of glucose 6-phosphatase (G6Pase) and phosphoenol-pyruvate kinase (PEPCK) under the protocol of daytime restricted feeding (DRF). Expression G6Pase in the hepatic microsomal fraction (panel A) and PEPCK in cytosolic fraction (panel B). AL (white circles), DRF (filled circles), fasting (gray triangle), and re-feeding groups (black–white rhombus). Each value was normalized using the housekeeping protein actin as reference, and a representative western blot for each condition is shown. Light on at 08:00 h and off at 20:00 h. Hatched bars indicate mealtime (12:00 h–14:00 h). Data are expressed as mean \pm SEM of at least eight independent observations. #Significant difference between fasting vs. re-feeding (Student's *t* test, $p < 0.001$). †Significant difference between groups before access food, DRF vs. fasting (11:00 h) (Student's *t* test, $p < 0.001$). *Time points with a significant difference between AL and DRF groups (two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test, $p < 0.05$). &Significant difference between the DRF and AL groups in the 24-h mean (Student's *t* test, $p < 0.05$).

the end of the dark period, and then showed a clear increase in the light period at the time of AA, prior to the large peak associated with mealtime. Overall, the average blood glucose level during the 24-h period was slightly but significantly lower ($\sim 10\%$) in the DRF rats than in the AL group.

Acute fasting promoted a substantial and significant decrease ($\sim 26\%$) at 11:00 h in the level of glycemia. As expected, the glycemia reached normal values after 2 h of food access (at 14:00 h).

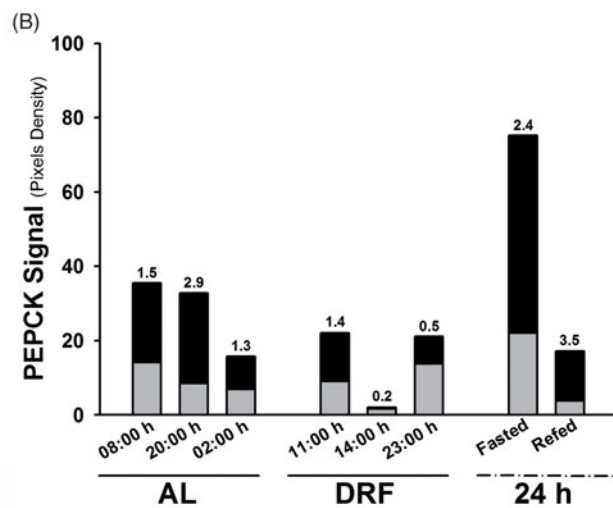
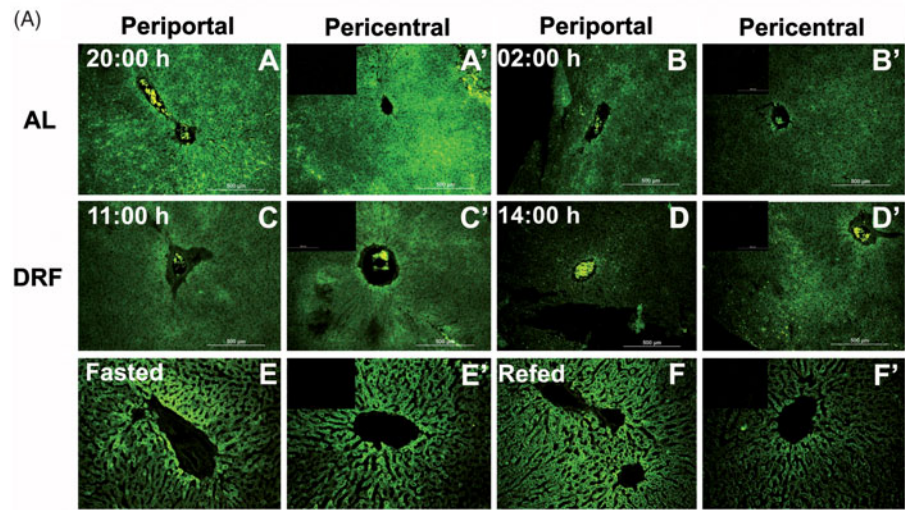
DRF shifted the peak of GYS and increased the levels of its Ser641 phosphorylated form

Figure 5, panels A and B, depict the daily variations of GYS and the levels of the inactive form of GYS (pGYS), which is phosphorylated at Ser641 by glycogen synthase kinase-3 β . Rhythmic parameters are listed in Table 1. The AL group showed elevated GYS levels during most of the dark period, in accordance with the nocturnal feeding habits of

Wistar rats. In the DRF group, there was a phase shift, with higher levels of GYS before (11:00 h) and after mealtime (14:00 h), but no change in amplitude was detected (Figure 5A). In contrast, the DRF protocol promoted alterations in the daily variations of pGYS: AL rats showed lower values during the light periods and significantly higher levels during the dark period, with a valley at 17:00 h and a peak at 23:00 h. The DRF protocol increased the levels of pGYS at almost all the sampling times, resulting in a significant increase in average throughout the 24-h period ($\sim 65\%$). In addition, a clear valley was observed after food access (14:00 h) and a peak at the end of the dark period (05:00 h) (Figure 5B).

No changes were observed between the control groups of feeding condition, acute fasting and the acute re-fed, in either GYS or pGYS levels (Figure 5A and B, respectively). The values of GYS and pGYS shown by these groups were similar to the AL group and lower than those of the DRF group.

FIGURE 3. (A) Zonal distribution of phosphoenol pyruvate carboxykinase (PEPCK) in pericentral and periportal of hepatocytes. Panel A: Immunohistochemical signal for PEPCK at times of high and low PEPCK activity (Figure 1, panel B). Group fed *ad-libitum* (AL), group under daytime restricted feeding (DRF) as well as acute fasted and acute re-fed groups. Magnifications $40\times$, scales are indicated with white bars. Insets included in images of periportal hepatocytes are representative of control slices without primary antibody. (B) Histogram showing quantification of the PEPCK signal in periportal (black bars) and pericentral (gray bars) hepatocytes. The ratio between the signals measured in periportal and pericentral hepatocytes is depicted at the top of each column. Hence, distribution can be periportal (>1), pericentral (<1) or without zonation ($=1$). Data are expressed as mean \pm SEM of at least 100 independent observations of individual hepatocytes.



DRF promoted higher levels of liver glycogen

The liver glycogen content was evaluated in a temporal profile of 24 h in both the AL and DRF groups. Figure 5, panel C, shows that liver glycogen content was very sensitive to 24 h of fasting, reaching very low levels after this treatment, but at the same time, it was very responsive to a re-feeding period. AL rats showed higher levels of glycogen at end of the dark period; a pronounced valley was present at 17:00 h. In contrast, in DRF rats, the peak of glycogen content was observed at 17:00 h (a phase shift of 12 h); interestingly, the lowest value of glycogen (20:00 h) was 50% more elevated than the valley observed in the AL group (17:00 h) (Figure 5C).

Acute fasting promoted a substantial and significant decrease ($\sim 74\%$) at 11:00 h in the level of glycogen content. As expected, the glycogen content reached almost normal values ($\sim 82\%$) after 2 h of food access (at 14:00 h) (Figure 5C).

DRF did not modify the ATT

To analyze the liver capacity to convert alanine into circulating glucose by gluconeogenic activity, the ATT

was applied in our experimental protocol (AL, DRF and acute fasting) (Figure 4B). For each group, the experiment was performed at times prior to feeding. As expected, because alanine conversion to glucose is favored during the absence of nutrients, ATT in the acute fasted group resulted in a net increase in the glycemia level (peak at 20 min after alanine treatment). In contrast, ATT in AL rats at 19:00 h (at the end of light period) did not modify the glycemia level. Unexpectedly, the same pattern was observed in DRF rats at 11:00 h (prior to mealtime), but at 23:00 h, it was observed a significant increase in circulating glucose levels (peak at 10 min after alanine treatment).

Each group showed different levels of glycemia (higher in AL-19:00 h group, moderate in both DRF groups and lower in fasted group), the same pattern was observed when the area under the curve (AUC) was calculated from the ATT experiment. Therefore, AL rats showed an increase of $\sim 67\%$ in comparison to the 24-h fasted rats, whereas both DRF groups showed only $\sim 30\%$ of increment (Figure 4C).

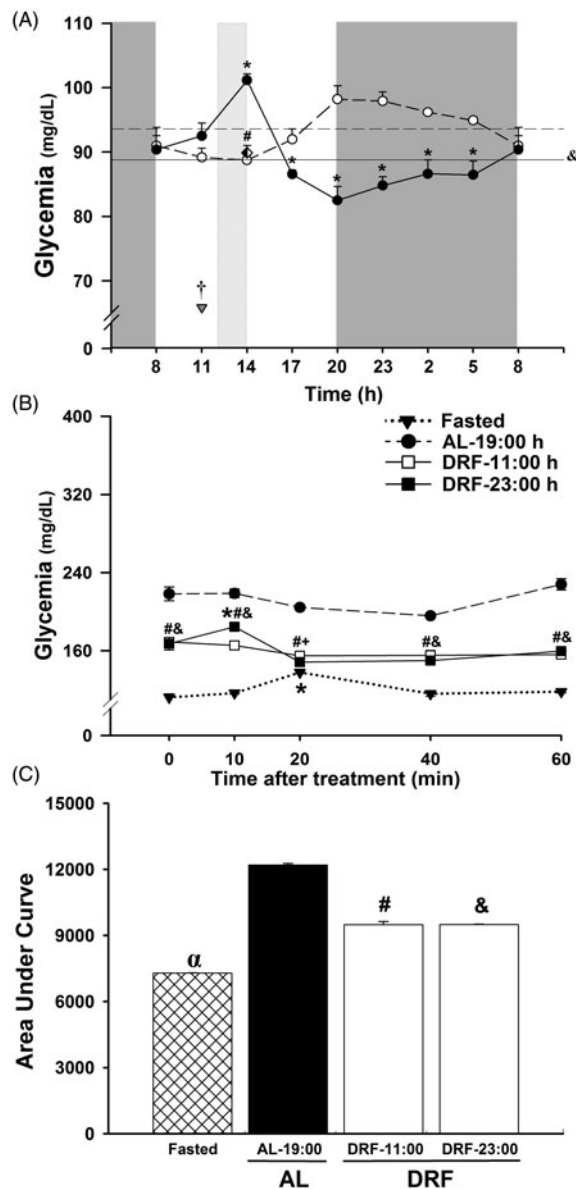


FIGURE 4. Panel A. Daily variations of glycemic levels during the protocol of daytime restricted feeding (DRF). AL (white circles), DRF (filled circles), fasting (gray triangle), and re-fed groups (black-white rhombus). Data are expressed as mean \pm SEM. #Significant difference between fasting vs. re-feeding (Student's *t* test, $p < 0.001$). †Significant difference between groups before food access, DRF vs. fasting (11:00 h) (Student's *t* test, $p < 0.001$). *Time points with a significant difference between AL and DRF groups (two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test, $p < 0.05$). &Significant differences in the 24-h mean comparing DRF and AL groups (Student's *t* test, $p < 0.001$). Panel B. Alanine tolerance test (ATT) results. AUC of glycemia during ATT, performed at times of peak PEPCK activity: Fasted (black triangle/cross-hatched bar), AL (black circle/black bar, 19:00 h) and DRF (white square/white bar, 11:00 h and black square/white bar, 23:00 h). Trunk blood samples were taken at time 0 (baseline) and 10, 20, 40 and 60 min after an i.p. injection of alanine (100 mg/kg body weight). Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 4$). *Significant differences from initial time (one-way ANOVA for each group followed by Bonferroni post hoc test, $p < 0.05$). #DRF-11:00 h vs. Fasted/AL groups, &DRF-23:00 h vs. Fasted/AL groups, +DRF-23:00 h vs. AL group, α Fasted vs. AL group, time points with a significant difference (two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test, $p < 0.05$).

DRF favors high levels of corticosterone and glucagon, and low levels of insulin as averaged over 24 h

Figure 6 shows the 24-h variations in the levels of corticosterone (panel A), glucagon (panel B) and insulin (panel C). Rhythmic parameters are listed in Table 1. The first two hormones are positive regulators of GNG, whereas insulin is the best-known inhibitor of this metabolic pathway.

The AL group showed an expected temporal profile for corticosterone, with a clear elevation at the transition from light to darkness (from 17:00 h to 20:00 h), which is coincident with the awaking of these rodents (Figure 6A). In contrast, the DRF group showed a modified rhythm with two peaks, a larger one before food access (11:00 h) and the other at the light-dark transition as for the AL group. There was a significant increase of corticosterone averaged over 24 h in the DRF rats ($\sim 19\%$). The 24-h variations of circulating glucagon in AL group showed an irregular profile with the lowest value at 14:00 h, higher values from 17:00 h to 8:00 h and a peak at 11:00 h. The principal difference in the profile of the DRF group was a sustained elevation from the last part of the dark period to the first part of the light period (from 2:00 h to 14:00 h), resulting in a significant increase ($\sim 35\%$) in the 24-h average value of circulating glucagon (Figure 6B). The 24-h profile of blood insulin in AL group showed lower values at the end of the light period (from 17:00 h to 20:00 h) with a clear rise during mealtime that lasted until the middle of the light period (from 23:00 h to 14:00 h). Significant differences in the profile shown by the DRF group were observed: There was an evident peak after the food access period (14:00 h), followed by a pronounced decrease that reached a minimum during the light period just before food access (11:00 h) (Figure 6C). Taken together, the 24-h data indicated a significantly lower level of circulating insulin in the DRF rats ($\sim 25\%$).

Controls of feeding condition showed clear effects on circulating corticosterone ($\sim 20\%$ less in comparison to acute fasting) and insulin ($\sim 100\%$ more in comparison to acute fasting). No changes of blood glucagon levels were observed between the acute fasting and acute re-fed rats.

DRF did not modify the GTT

Determining how quickly a dose of glucose is cleared from the blood gives information regarding insulin signaling and glucose homeostasis. We applied the GTT in our experimental protocol (AL, DRF and acute fasting groups), again at times before food access to favor conditions with high gluconeogenic activity (Figure 7). After acute fasting and under the DRF protocol (at 11:00 h and 23:00 h), rats showed lower glycemic values at time zero. They also showed a conventional pattern of glucose clearance: a clear peak 15 min after glucose administration and normal values of circulating glucose 60 min after the treatment.

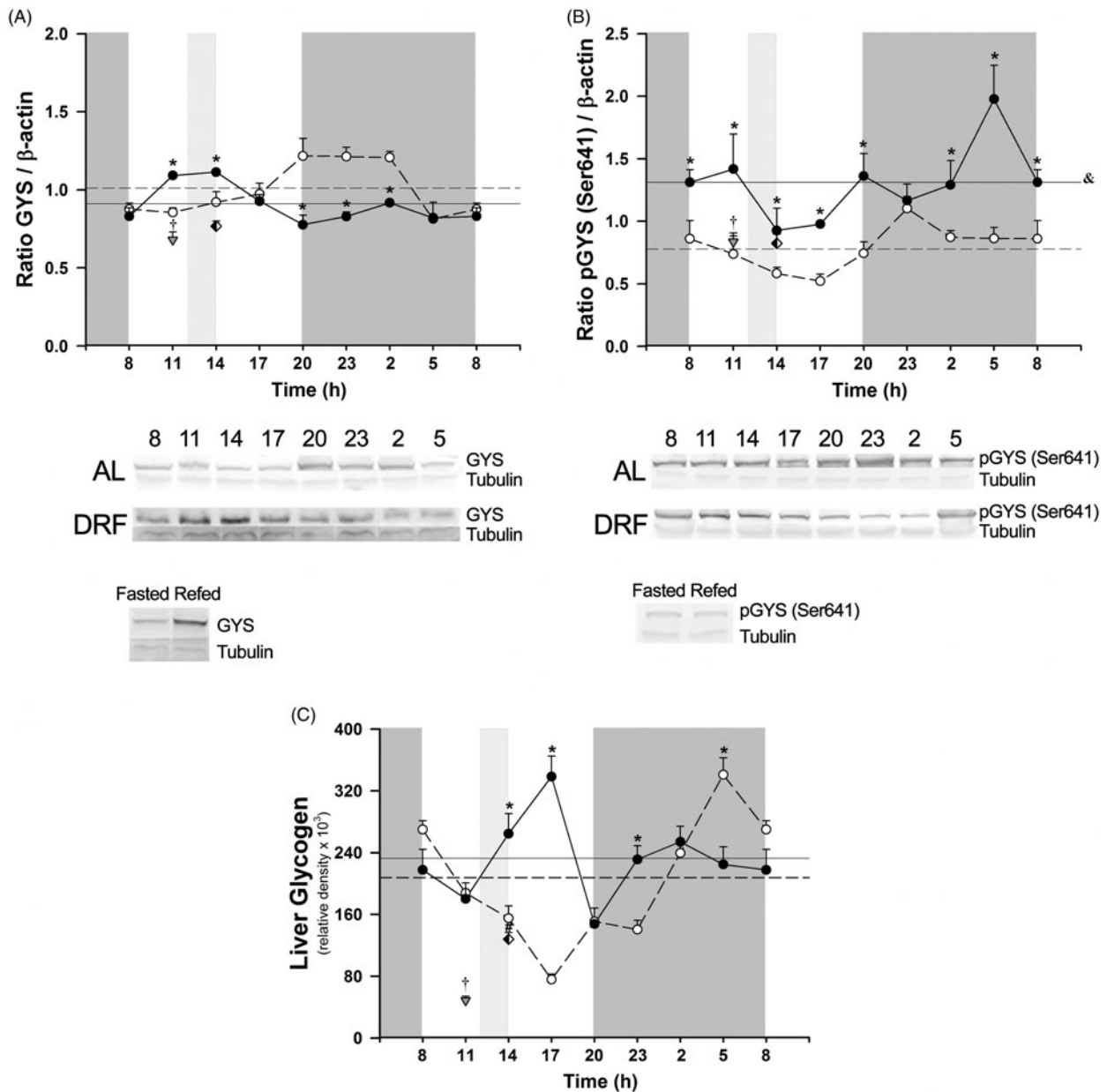


FIGURE 5. Liver glycogen content, expression of glycogen synthase (GYS) and presence of phosphorylated-GYS (at Ser641) under the protocol of daytime restricted feeding (DRF). For panels A and B: presence of glycogen synthase (GYS) and phosphorylated-GYS (at Ser641). AL (white circles), DRF (filled circles), fasting (gray triangle) and re-fed groups (black-white rhombus). Each value was normalized using the housekeeping protein tubulin as reference, and a representative western blot for each condition is shown. Panel C. Content of liver glycogen evaluated by PAS staining. *Significant difference between light and dark period, and fasted and re-fed conditions; #Significant difference between the AL and DRF groups in the dark period (Student's *t* test, $p < 0.05$). Data are expressed as mean \pm SEM of at least eight independent observations. Hatched bars indicate mealtime (12:00 h–14:00 h). Data are expressed as mean \pm SEM of at least eight independent observations. #Significant difference between fasting vs. re-feeding (Student's *t* test, $p < 0.001$). †Significant difference between groups before food access, DRF vs. fasting (11:00 h) (Student's *t* test, $p < 0.001$). ‡Time points with a significant difference between AL and DRF groups (two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test, $p < 0.05$). &Significant difference in the 24-h mean between DRF and AL groups (Student's *t* test, $p < 0.05$).

In contrast, AL rats showed higher glycemic values at time zero and a shorter peak at 15 min after glucose administration, but a similar normalization of blood glucose after 60 min of treatment. When the AUC is considered, it was observed that both DRF groups showed higher values than the AL groups; even, the DRF-11:00 h showed a net increase in comparison to the fasted group (Figure 7B).

DRF modified the temporal profile and increased the levels of liver SIRT1 and PGC-1 α

Figure 8 shows the presence of PGC-1 α (transcription factor) and SIRT1 (deacetylase enzyme) in the liver cytosolic fraction detected by western blot. Rhythmic parameters are listed in Table 1. Both molecules are positive modulators of hepatic gluconeogenic activity. AL and DRF group showed a non-rhythmic temporal

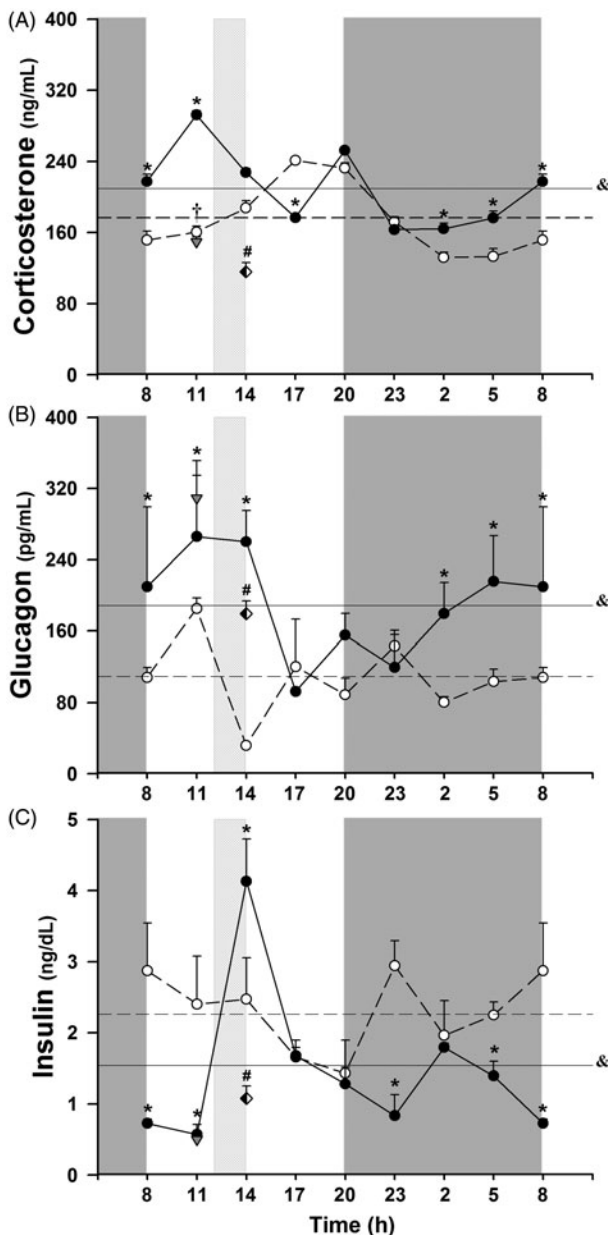


FIGURE 6. Daily variations of circulating hormones that positively or negatively control the liver gluconeogenic activity under the protocol of daytime restricted feeding (DRF). Panel A, Corticosterone; panel B, Glucagon, and panel C, Insulin. AL (white circles), DRF (filled circles), fasting (gray triangle) and re-fed groups (black-white rhombus). Light on at 08:00 h and off at 20:00 h. Hatched bars indicate mealtime (12:00 h–14:00 h). Data are expressed as mean \pm SEM of at least eight independent observations. #Significant difference between fasting vs. re-feeding (Student's *t* test, $p < 0.001$). †Significant difference between groups before food access, DRF vs. fasting (11:00 h) (Student's *t* test, $p < 0.001$). *Time points with a significant difference between AL and DRF groups (two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test, $p < 0.05$). &Significant differences in the 24-h mean between DRF and AL groups (Student's *t* test, $p < 0.05$).

profile for PGC-1 α . However, the DRF protocol promoted an increased expression of this transcription factor at all times tested with a significant elevation (~40%) of the 24-h average value (panel A). PGC-1 α

responded to feeding condition, since a clear elevation was observed in the acute fasted group (11:00 h) with a clear reduction after mealtime (14:00 h) (Figure 8A). SIRT1 showed no rhythm in the AL group, whereas the DRF protocol promoted two significant peaks: the first was associated with the time before feeding and after mealtime (8:00 h and 14:00 h); the second occurred at the beginning of the dark period (23:00 h). SIRT1 showed change associated with a single cycle of fasting and re-feeding (Figure 8B).

DISCUSSION

GNG, timing system and DRF protocol

The best understood view of GNG is as an adaptive response during starvation promoted by glucagon: After glucagon interacts with its receptor, the increased levels of cAMP stimulate pyruvate kinase A (PKA) activity, promoting the phosphorylation of CREB. Phospho-CREB interacts with CRTC2/TORC2 (CREB-regulated transcription coactivator 2) and binds to the CRE in the promoters of gluconeogenic enzyme genes. Phospho-CREB also binds to the promoter of the *PGC1 α* gene and stimulates its transcription. As the level and activity of SIRT1 are also increased during this period of nutrient demand, PGC-1 α is deacetylated allowing it to interact with FoxO1 and hepatic necrosis factor *tipo 4 α* to further enhance the transcription of gluconeogenic genes. Furthermore, high glucocorticoid levels during fasting promote transcription of gluconeogenic genes *via* binding of the GR to the corresponding promoter regions. This GR-mediated transcription also requires various HNFs to maximize transcriptional activation of gluconeogenic genes. In contrast, during feeding when the insulin level is high, the attenuation of PKA signaling combines with high protein phosphatase 1 activity to promote the dephosphorylation and transcriptional inactivation of CREB. Insulin signaling through Akt/PKB drives the phosphorylation and nuclear exclusion of CRTC2/TORC2 and FoxO1. The nuclear exclusion of CRTC2/TORC2 results in the attenuation of *PGC-1 α* gene transcription and thereby limits PGC-1 α protein abundance. High levels of insulin also decrease the amount and activity of SIRT1, and therefore, promote conversion of PGC-1 α into a transcriptionally inactive (acetylated) form. These events lead to the transcriptional repression of gluconeogenic genes and the suppression of hepatic glucose production (Jitrapakdee, 2012). Hence, GNG is highly dependent on the feeding condition and endocrine milieu for its activation or inhibition.

It is recognized that besides the role of GNG during prolonged starvation, it is also active in other physiological states such as short and medium fasting, stressful conditions and during short-term glycogen-replenishment activity in the liver after food intake. In this context, the endocrine and metabolic parameters controlling GNG play sequential roles during the different

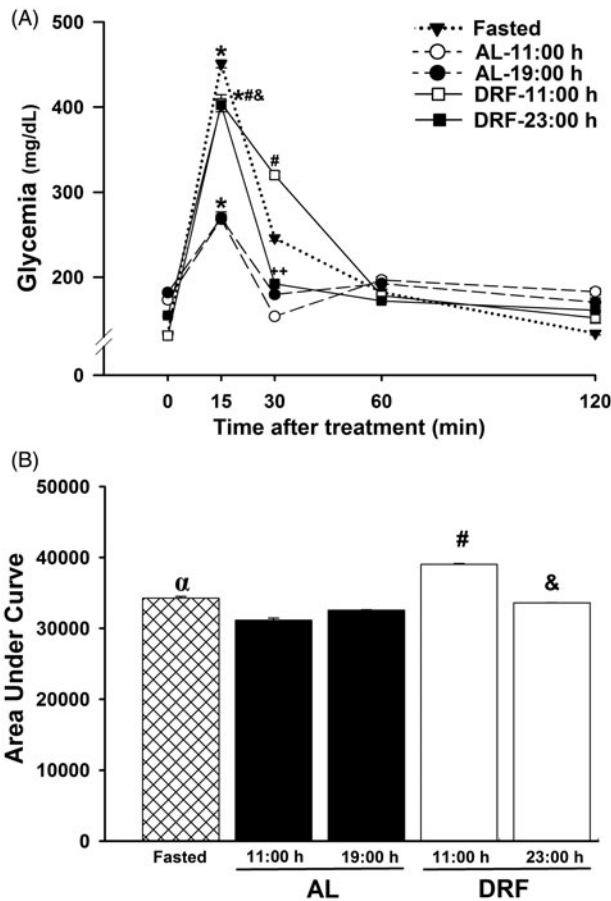


FIGURE 7. Panel A. Glucose tolerance test (GTT) and Panel B. Area under the curve (AUC) of glycemia during GTT. Fasted (black triangle/cross-hatched bar), AL (white circle /black bar, 11:00 h and black circle/black bar 19:00 h) and DRF (white square/white bar, 11:00 h and black square/white bar, 23:00 h). Blood samples were taken from the tail at time 0 (baseline) and 15, 30, 60 and 120 after an i.p. injection of glucose [0.5 g/mL]. Data are expressed as mean \pm SEM ($n=4$). *Significant differences from initial time (one-way ANOVA for each group followed by Bonferroni post hoc test, $p<0.05$). #DRF-11:00 h vs. fasted/AL groups, &DRF-23:00 h vs. fasted/AL groups, ++DRF-23:00 h vs. AL-19:00 h, α Fasted vs. AL groups, time points with a significant difference (two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test, $p<0.05$).

steps involved in the response to metabolic demand or to the lack of nutrients (Finn & Dice, 2006). From this perspective, DRF is an interesting protocol that involves the adaptive distention of the stomach chamber to allow the intake of ~ 20 g of food in only 2 h. This hyperphagia and the slow emptying of the gastric chamber result in the stomach retaining at least some food until a few hours before the next mealtime (coincident with the onset of the FAA). It has been reported that the change of mealtime from nocturnal to diurnal in food-restricted rats has an impact in amount of ingested food: animals with 2 h of diurnal food restriction eat $\sim 25\%$ less food than rats with 2 h of nocturnal food restriction (Lima et al., 1985). As to the gastric food mobilization, it has been reported that unacetylated ghrelin slows the stomach emptying process, and we have data showing that the circulating levels of this hormone are higher in

the DRF group (data not published). Knowing that metabolic factors controlling the cellular energy and lipid handling within the liver, biochemical regulators and mitochondrial activity are profoundly affected during the DRF protocol, it was of interest to determine what kind of adaptation the GNG would show in this experimental condition, which also involves the modification of the circadian physiology (Stephan, 2002).

As to the circadian timing system, the reciprocal effects of the molecular clock and metabolic cues are well established. In conditions of DRF, this relationship is susceptible to a new modulatory status that impacts the circadian physiology of peripheral oscillators (Grimaldi & Sassone-Corsi, 2007). For example, BMAL1 and CRY link the circadian molecular clock with the gluconeogenic response, and they act as permissive factors for this metabolic pathway (Hatori & Panda, 2010; Rudic et al., 2004). At the same time, the pro-gluconeogenic factors PPAR- α and PGC-1 α directly modulate the timing system by interacting with clock genes (Bechtold et al., 2010; Masri & Sassone-Corsi, 2013). It is in this context that we explored the adaptations of gluconeogenic activity and related parameters promoted by a feeding protocol with food access for 2 h in the middle of the light period.

DRF increases the gluconeogenic response

As a whole, our results indicate a concerted response of endocrine and metabolic factors that favor enhanced GNG in the daily pattern shown by rats under DRF: (1) serum corticosterone and glucagon levels, especially before and during food access, but also at the transition between the light and the dark periods (corticosterone) (Figure 6A and B); (2) overall, serum insulin was reduced in spite of the large peak elicited at mealtime (Figure 6C), the larger insulin secretion had been reported previously in similar food-restriction protocol (Philippens et al., 1977); (3) SIRT1 was also increased before food access and PGC-1 α was similar before and during food access, and also in the first part of the dark period (SIRT1 at 23:00 h) (Figure 8); (4) all these pro-gluconeogenic conditions were associated with higher PEPC activity, a marker enzyme for GNG (Figure 1B); (5) the output of the gluconeogenic activity, the glycemia profile and the liver glycogen content, are not conclusive (because of glycogen metabolism and the prolonged nutrient assimilation after the hyperphagia), but they are suggestive of an enhanced GNG; (6) nevertheless, there is a global hypoglycemia, DRF rats showed a continuous, positive slope in the glycemic profile for 18 h (from 20:00 h to 14:00 h; Figure 4A); and (7) in spite of the limited time for food access, liver glycogen level was higher than in the AL group (Figure 5A).

DRF modifies the daily rhythmicity of GNG

Our data also indicate changes in the 24-h rhythmicity in several GNG-related parameters, strongly suggesting that the DRF protocol influences and modulates the

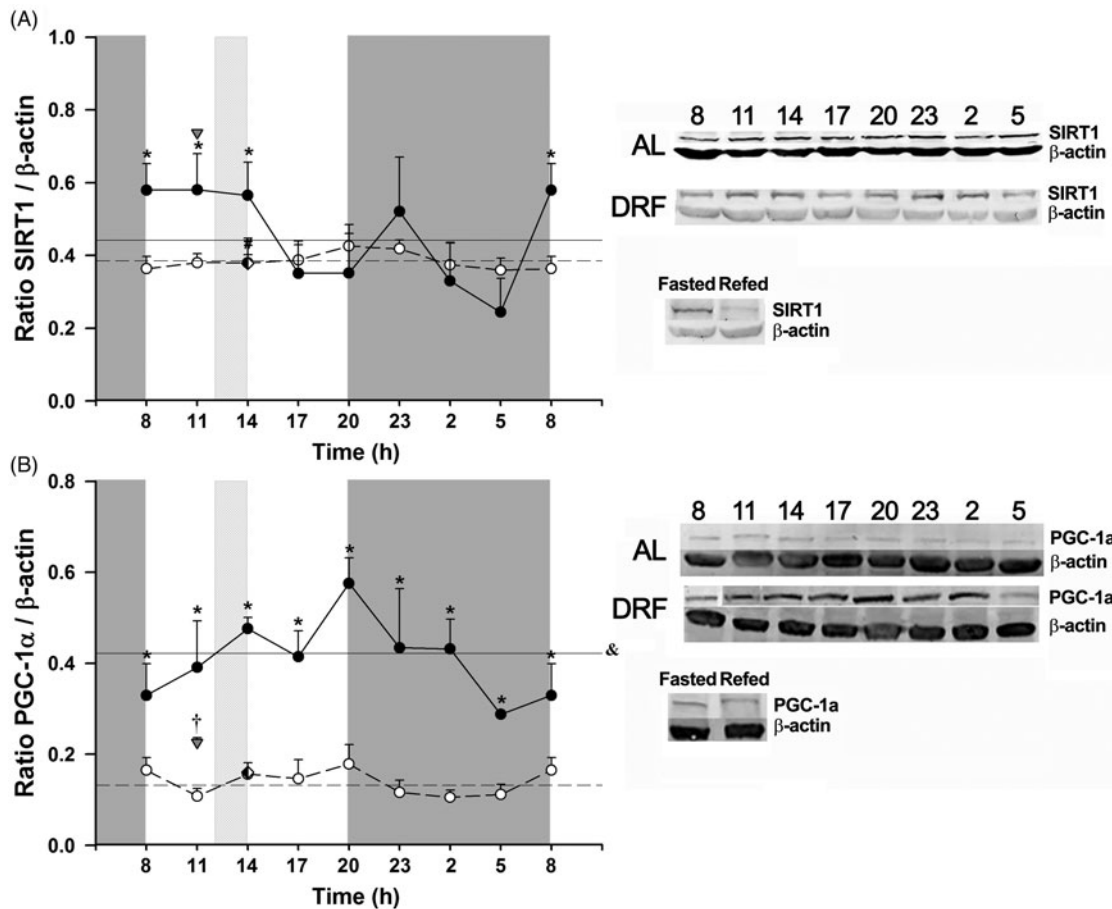


FIGURE 8. Daily variations of liver SIRT1 and PGC-1 α under the protocol of daytime restricted feeding (DRF). Panel A, SIRT1, and panel B, PGC-1 α . AL (white circles), DRF (filled circles), fasting (gray triangle) and re-fed groups (black-white rhombus). Each value was normalized using the housekeeping protein actin as reference, and a representative western blot for each condition is shown. Light on at 08:00 h and off at 20:00 h. Hatched bars indicate mealtime (12:00 h–14:00 h). Western blots were done with the cytosol fraction for SIRT1 and PGC-1 α . Data are expressed as mean \pm SEM of at least four independent observations. #Significant difference between fasting vs. re-feeding (Student's *t* test, $p < 0.001$). †Significant difference between groups before food access, DRF vs. fasting (11:00 h) (Student's *t* test, $p < 0.001$). *Time points with a significant difference between AL and DRF groups (two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test, $p < 0.05$). &Significant difference in the 24-h mean between DRF and AL groups (Student's *t* test, $p < 0.05$).

interaction between the components of the molecular clock and metabolic effectors. A phase shift was observed in the daily pattern of glycemia, G6Pase activity and protein, the peak of PEPCK activity at the light–dark transition, and the amount of GS. The peak levels of all parameters, except PEPCK, were different at the beginning of the dark period (17:00–20:00 h) from those at the time of food access (11:00 h). The daily rhythms of the three hormones studied in the DRF protocol changed: corticosterone became bimodal; for glucagon the valley lasted for 6 h (from 17:00 to 23:00 h) while the control AL group showed a single low point (at 14:00 h); insulin showed an expected peak after feeding in the DRF group, whereas AL rats showed a discreet valley at the beginning of the dark period. The pattern of phosphorylated GS also changed from one peak in AL to two peaks in the DRF protocol. Furthermore, the glycogen content profile in DRF promoted a phase shift of 12 h in comparison with the AL group. DRF promoted a bimodal rhythmicity in the amounts of

SIRT1 and PGC-1 α , whereas they showed no 24-h variation in AL rats (Table 1).

DRF and endocrine responses

The DRF protocol/FEO expression promotes adaptive adjustments in the endocrine milieu that have influence on the circadian molecular clocks of peripheral organs. Some hormones such as corticosterone, glucagon, glucagon-like peptide 1 and ghrelin show increased levels before the mealtime, whereas others such as insulin and leptin show a marked response after food intake (Luna-Moreno et al., 2009; Patton & Mistlberger, 2013 and references within). From this information, it is suggested that the event of mealtime associated to restricted feeding schedules could be playing a dual role to communicate temporal cues to the circadian system: before food access with an increment of glycogen degradation, GNG, urea cycle and lipolysis; after food access with an enhanced synthesis of glycogen

(including a gluconeogenic source) and triacylglycerides as well as reduction of urea cycle (Blum et al., 2012 and references within).

DRF and FEO

To define the nature and anatomical location of the FEO has been an elusive task. Polemic arguments have arisen among groups studying brain areas and the mechanisms that allow time estimation when food is offered in a restricted protocol (Mistlberger, 2011). In general, there are two points of view to explain the foundations of the FEO: (1) one view considers the presence of multiple systems whose circadian rhythmicity can be adjusted to the mealtime, each of them being an individual FEO (i.e. ghrelin-secreting oxyntic cells in the gastric mucosa constitute one FEO, among many others) (Silver & Balsam, 2010). The second opinion, which we favor, considers that the FEO is an emergent property that involves many aspects of metabolic and physiological adaptations in the whole organism when food access is restricted to daytime. These adjustments entail a new category of interactions between the molecular clock and the metabolic networks in the peripheral oscillators, as well as new ways of coordination among organs (brain, liver, adipose tissue, pancreas, adrenals, etc.). The integrative and rheostatic characteristics involved in this concept of FEO expression have been developed in several reports (Aguilar-Roblero & Díaz-Muñoz, 2010; Báez-Ruiz et al., 2013; Carneiro & Araujo, 2009). From this perspective, one way to consider the emergence of new properties in biological systems is the concept of rheostasis (Mrosovsky, 1990), which is a term used in the theory of physiological control to describe regulation around shifting set-points. In contrast to homeostasis, rheostasis triggers associations in situations with potentially adjustable settings (Aguilar-Roblero & Díaz-Muñoz, 2010). In this context, expression of the FEO could involve a novel rheostatic adaptation in conditions in which two contradictory environmental temporal clues, light–dark cycle and DRF are coexisting.

So far, it is not possible to assign a mechanistic role in the onset or installation of the FEO for the changes in the gluconeogenic response recorded in this project. Other experimental maneuvers are needed to define accurately the metabolic and/or circadian adaptations elicited by the DRF protocol.

Food access during daytime could be considered as an uncoupling factor for the circadian timing system, as it has been established in protocols of night shift working that promote metabolic disruption and desynchrony in transcriptional activity (Salgado-Delgado et al., 2013). However, a brief period of feeding (2–4 h) during daytime conveys two characteristics that avoid the harmful consequences: It is a strong daily synchronizing cue and involves a lower caloric intake (Aguilar-Roblero & Díaz-Muñoz, 2010; Mistlberger, 2011). Both features have been proved to be protective against metabolic disturbances (Tahara & Shibata, 2013).

Perspectives

Because of the complexity of metabolic and cellular regulation of hepatic GNG, some of our findings associated with the protocol of DRF/FEO expression deserve further inquiry: (1) lack of agreement between PEPCK expression and activity, (2) switch between periportal and pericentral zonation for PEPCK, (3) hypoglycemic pattern, (4) control of synthesis, hydrolysis and exchange of glycogen, (5) constitutive expression of PGC-1 α , (7) induced rhythmicity in the presence of SIRT1 and (8) altered rhythmicity of the three hormones studied (corticosterone, glucagon and insulin).

CONCLUSION

DRF bestows properties on the gluconeogenic response that are not observed in the group fed AL or in the rats with acute fasting for \sim 1 day. DRF promotes an enhanced GNG that is maintained by the coordinated response to hormonal and transcriptional factors. At the end, GNG ameliorated and reversed the insulin-induced hypoglycemia, and it contributed to replenishing the glycogen content of the liver. Further studies are needed to define the mechanistic relationship between these findings and expression of the FEO.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr. Dorothy Pless for her assistance with the English version of this manuscript and to Dr. Olivia Vázquez-Martínez, Ms. Lorena López, Lic en Nut. Fernando López-Barrera and Rubí E. Sandoval-Santoyo for technical support.

DECLARATION OF INTEREST

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (project U-49047) and Dirección General de Asuntos del Personal Académico: Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (project IN201209). MP-M is a PhD student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México and received fellowship 215711 from CONACYT.

REFERENCES

- Aguilar-Delfín I, López-Barrera F, Hernández-Muñoz R. (1996). Selective enhancement of lipid peroxidation in plasma membrane in two experimental models of liver regeneration: Partial hepatectomy and acute CC14 administration. *Hepatology*. 24: 657–62.
- Aguilar-Roblero R, Díaz-Muñoz M. (2010). Chronostatic adaptations in the liver to restricted feeding: The FEO as an emergent oscillator. *Sleep Biol Rhythm*. 8:9–17.

- Ángeles-Castellanos M, Mendoza J, Díaz-Muñoz M, Escobar C. (2005). Food entrainment modifies the c-Fos expression pattern in brain stem nuclei of rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 688:R678–84.
- Bechtold DA, Gibbs JE, Loudon AS. (2010). Circadian dysfunction in disease. *Trends Pharmacol Sci.* 31:191–8.
- Báez-Ruiz A, Cázares-Gómez K, Vázquez-Martínez O, et al. (2013). Diurnal and nutritional adjustments of intracellular Ca²⁺ release channels and Ca²⁺ ATPases associated with restricted feeding schedules in the rat liver. *J Circadian Rhythms.* 11:8 (1–17).
- Blum ID, Lamont EW, Abizaid A. (2012). Competing clocks: Metabolic status moderates signals from the master circadian pacemaker. *Neurosci Biobehav Rev.* 36:254–70.
- Caldelas I, Tejadilla D, González B, et al. (2007). Diurnal pattern of clock gene expression in the hypothalamus of the newborn rabbit. *Neuroscience.* 144:395–401.
- Carneiro BTS, Araujo JB. (2009). The food-entrainable oscillator: A network of interconnected brain structures entrained by humoral signals? *Chronobiol Int.* 26:1273–89.
- Díaz-Muñoz M, Vázquez-Martínez O, Aguilar-Roblero R, Escobar C. (2000). Anticipatory changes in liver metabolism and entrainment of glucagon, insulin and corticosterone in food-restricted rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 279: R2048–59.
- Díaz-Muñoz M, Vázquez-Martínez O, Báez-Ruiz A, et al. (2010). Daytime food restriction alters liver glycogen, triacylglycerols, and cell size. A histochemical, morphometric, and ultrastructural study. *Comp Hepatol.* 9:5–10.
- Escobar C, Díaz-Muñoz M, Encinas F, Aguilar-Roblero R. (1998). Persistence of metabolic rhythmicity during fasting and its entrainment by restricted feeding schedules in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 274:R1309–16.
- Escobar C, Martínez-Merlos MT, Ángeles-Castellanos M, et al. (2007). Unpredictable feeding schedules unmask a system for daily resetting of behavioural and metabolic food entrainment. *Eur J Neurosci.* 26:2804–14.
- Finn PF, Dice F. (2006). Proteolytic and lipolytic responses to starvation. *Nutrition.* 22:830–44.
- Fuchs G. (2011). Alternative pathways of carbon dioxide fixation: insights into the early evolution of life? *Annu Rev Microbiol.* 65: 631–58.
- GraphPad Prism. Versión 5.00 para Windows, GraphPad Software. San Diego, CA. Available at: www.graphpad.com.
- Grimaldi B, Sassone-Corsi P. (2007). Circadian rhythms: metabolic clockwork. *Nature.* 447:386–7.
- Hatori M, Panda S. (2010). CRY links the circadian clock and CREB-mediated gluconeogenesis. *Cell Res.* 20:1285–8.
- Jitrapakdee S. (2012). Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 44:33–45.
- Landry GJ, Kent BA, Patton DF, et al. (2011). Evidence for time-of-day dependent effect of neurotoxic dorsomedial hypothalamic lesions on food anticipatory circadian rhythms in rats. *PLoS One.* 6:e24187.
- Lima FB, Hell NS, Timo-Iaria C. (1985). Carbohydrate metabolism and food intake in food-restricted rats. Relationship between the metabolic events during the meal and the degree of food intake. *Physiol Behav.* 35:695–700.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265–75.
- Luna M, Rodríguez-Méndez AJ, Berumen L, et al. (2008). Immune growth hormone (GH): Localization of GH and GH mRNA in the bursa of Fabricius. *Dev Comp Immunol.* 32:1313–25.
- Luna-Moreno D, Aguilar-Roblero R, Díaz-Muñoz M. (2009). Restricted feeding entrains rhythms of inflammation-related factors without promoting an acute-phase response. *Chronobiol Int.* 26:1409–29.
- Luna-Moreno D, Ayala-García B, Díaz-Muñoz M. (2012). Daytime restricted feeding modifies 24 h rhythmicity and subcellular distribution of liver glucocorticoid receptor and the urea cycle in rat liver. *Br J Nutr.* 108:2002–13.
- Martínez-Merlos MT, Ángeles-Castellanos M, Díaz-Muñoz M, et al. (2004). Dissociation between adipose tissue signals, behavior and the food-entrained oscillator. *J Endocrinol.* 181:53–63.
- Masri S, Sassone-Corsi P. (2013). The circadian clock: A framework linking metabolism, epigenetics and neuronal function. *Nat Rev Neurosci.* 14:69–75.
- Mendoza J. (2007). Circadian clocks: Setting time by food. *J Neuroendocrinol.* 19:127–37.
- Mistlberger RE. (2009). Food-anticipatory circadian rhythms: Concepts and methods. *Eur J Neurosci.* 30:1718–29.
- Mistlberger RE. (2011). Neurobiology of food anticipatory circadian rhythms. *Physiol Behav.* 104:535–45.
- Mrosovsky N. (1990). *Rheostasis: The physiology of change.* New York, NY: Oxford University Press, Inc.
- Nordlie RC, Arion WJ. (1966). Glucose-6-phosphatase. *Methods Enzymol.* 9:619–25.
- Opie LH, Newsholme EA. (1967). The activities of fructose 1,6-diphosphatase, phosphofructokinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in white muscle and red muscle. *Biochem J.* 103:391–9.
- Patton DF, Mistlberger RE. (2013). Circadian adaptations to meal timing: Neuroendocrine mechanisms. *Front Neurosci.* 7:1–14.
- Philippens KM, von Mayersbach H, Scheving LE. (1977). Effects of the scheduling of meal-feeding at different phases of the circadian system in rats. *J Nutr.* 107:176–93.
- Portaluppi F, Smolensky MH, Touitou Y. (2010). Ethics and methods for biological rhythm research on animals and human beings. *Chronobiol Int.* 27:1911–29.
- Reiners JJ, Busch H. (1980). Transcriptional and posttranscriptional modulation of cytoplasmic ribonucleic acids in regenerating liver and Novikoff hepatoma. *Biochemistry.* 19:833–41.
- Rivera-Zavala JB, Báez-Ruiz GA, Díaz-Muñoz M. (2011). Changes in the 24-h rhythmicity of liver PPARs and peroxisomal markers when feeding is restricted to two daytime hours. *PPAR Res.* 2011:1–11.
- Roden M, Bernroider E. (2003). Hepatic glucose metabolism in humans – Its role in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 17:365–83.
- Rudic RD, McNamara P, Curtis A, et al. (2004). BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biol.* 2:1893–9.
- Salgado-Delgado R, Saderi N, Basualdo Mdel C, et al. (2013). Shift work or food intake during the rest phase promotes metabolic disruption and desynchrony of liver genes in male rats. *PLoS One.* 8:e60052.
- Silver R, Balsam P. (2010). Oscillators entrained by food and the emergence of anticipatory timing behaviors. *Sleep Biol Rhythms.* 8:120–36.
- Stephan FK. (2002). The “other” circadian system: food as a Zeitgeber. *J Biol Rhythms.* 17:284–92.
- Tahara Y, Shibata S. (2013). Chronobiology and nutrition. *Neuroscience.* 253:78–88.

7. DISCUSIÓN

Marcadores de sincronización.

Está bien establecido que el horario restringido de alimentación (HRA) favorece cambios en varios parámetros tanto conductuales como fisiológicos asociados al periodo de alimentación el cual es favorecido por la influencia de un oscilador sincronizado por el alimento (OSA) el cual es responsable de cambios: CAA (Mistlberger, 1994), AGL y CC (Escobar et al. 1998), Corticosterona, Insulina, Glucagon, AGL y Estado Redox Oxidado (Krieger, 1974; Honma et al. 1984; Curi and Hell, 1986, Díaz-Muñoz et al. 2000), Corticosterona *in vitro* (Stokkan et al. 2001), genes reloj *e.g.* mPer1, Rev-erb α (Balsalobre et al. 2000), vaciamiento gástrico lento y leptina (Martínez-Merlos et al. 2004), ATP (Báez-Ruiz et al. 2005), Glucosa (Ángeles-Castellanos et al. 2005), Glucógeno y TAG Hepáticos (Díaz-Muñoz et al. 2010). En nuestro estudio, el marcador de sincronización (corticosterona) se ajustó al tiempo de presentación al alimento (12:00-14:00 h; igual a datos en Luna-Moreno et al. 2009). Estos datos concuerdan con resultados previos (Krieger, 1974; Balsalobre et al. 2000; Damiola et al. 2000; Díaz-Muñoz et al. 2000; Stokkan et al. 2001).

Glucemia.

Niveles de AGL, CC, ATP, estado redox oxidado y de glucógeno se encuentran elevados a excepción de la Glucosa (algunos puntos temporales bajo HRA; Ángeles-Castellanos et al. 2005) antes de acceder al alimento en los animales bajo HRA (11:00) (Escobar et al. 1998; Díaz-Muñoz et al. 2000; Díaz-Muñoz et al. 2010), procedimos a medir el nivel de glucemia en todos los grupos (Ayuno simple de ~1 día, Realimentado ~1 día, AL y HRA). De hecho, durante el HRA, antes de acceder al alimento (11:00), los animales presentaron un nivel más elevado de glucemia que el ayuno agudo. Este nivel elevado de glucemia puede explicarse por la cronostasis fisiológica que los animales adoptan para usar el alimento entre las siguientes horas (22 h) que no tienen acceso al alimento. Esta consideración se hace tomando en cuenta un trabajo donde se ha medido el vaciamiento gástrico, donde los resultados demostraron que este vaciamiento gástrico fue lento durante la alimentación bajo un HRA (Martínez-Merlos et al. 2004). Además, se sabe que la oxidación de los AGL puede controlar la ingesta de alimento disminuyéndola y reduce el vaciamiento gástrico (St-Onge y Jones, 2002; Jambor de Sousa et al. 2003), de forma similar lo observó

Martínez-Merlos et al (2004) bajo un protocolo con HRA. Esto ha sido demostrado usando inhibidores que inciden sobre la oxidación de los AGL como el mercaptoacetato (MA) y el metilpalmoixirato (MP) observando que al inhibirla o disminuirla, provoca un aumento en la ingesta de alimento (Friedman et al. 1999). Por lo tanto, el “constante alimento” gástrico, los altos niveles de lípidos (AGL) y de moléculas de ATP en el HRA sugieren que el estatus energético favorecido por uso de los AGL como combustible mantiene la glucemia y los niveles de glucógeno elevados en comparación con el ayuno agudo (~1 día). Esto se demostró en nuestro estudio, donde el HRA promovió que los niveles de glucemia fueran mayores que los grupos de ayuno agudo (~1 día) y que mantuvieran una media total dentro del perfil temporal de 24 h similar a la condición con alimento *ad libitum*.

Actividad de G6Pasa y PEPCK.

Con el dato de la glucemia nos dedicamos a ver si los niveles de glucosa en los grupos de HRA se debían a la participación gluconeogénica ya que los antecedentes nos sugerían que muy probablemente estaría participando poco, al tener un nivel elevado de glucógeno antes de acceder al alimento (11:00 h). Lo que nos llevó a explorar las enzimas gluconeogénicas en el hígado. Los resultados indican que tanto la actividad enzimática de la G6Pasa y de la PEPCK muestran niveles inferiores bajo un HRA al compararlos con el grupo en ayuno agudo (~1 día). Sin embargo, la media total de la actividad enzimática de la PEPCK fue superior a la presentada por los animales con alimento *ad libitum*, no así la actividad de la G6Pasa, fortaleciendo con esto nuestra hipótesis de trabajo, sugiriendo fuertemente que la gluconeogénesis se encuentra elevada dentro del perfil diario de 24 h en los animales bajo este protocolo de HRA contra el grupo AL. Algo similar se ha visto en varios trabajos donde se ha medido la actividad de la G6Pasa y de la PEPCK, estando incrementadas en condiciones de ayuno y con ritmicidad diferente, actuando conjuntamente para mantener los niveles de glucemia (Peret et al. 1976; Van Remmen y Ward, 1994; Nordlie et al. 1999; Saltiel y Khan, 2001; Azzout-Marniche et al. 2007; Cailotto et al. 2008) y se ha visto una relación directa de los AGL, CC, ATP y niveles de glucógeno elevados sobre las enzimas gluconeogénicas hepáticas, disminuyendo la actividad de la G6Pasa e incrementando la actividad de la PEPCK, la cual a su vez conjuntamente con el ATP y los AGL favorecen la acción de glucógeno sintasa, formando glucógeno en esta condición sin acceso al alimento (Katz et al. 1979; Lam et al. 2003; Leonhardt y Langhans, 2004). Sin embargo, recientemente ha salido

un trabajo donde miden sólo la expresión de *Pepck* tanto en AL como en HRA (Schmutz et al. 2010).

Prueba de tolerancia a alanina y a glucosa.

Adicionalmente, para determinar la gluconeogénesis global *in vivo* se utilizó la prueba de tolerancia a alanina. Cabe mencionar que dependiendo de las necesidades del organismo, la gluconeogénesis puede actuar para: 1) mantener los niveles de glucosa circulantes ya que el nivel de glucógeno está depletado, como en el caso del ayuno agudo (~1 día) y 2) se sugiere fuertemente para reponer los niveles de glucógeno cuando los niveles de glucemia se encuentren elevados y seguir manteniendo ese nivel de glucosa circulante. La cual al ser un precursor gluconeogénico, es convertida a glucosa (postabsortiva) principalmente cuando hay escases de glucosa circulante o en cambio, cuando hay suficiente glucosa circulante, favoreciendo el incremento de la glucosa-6-fosfato (G6P) y que sea utilizado por la glucógeno sintetasa para formar glucógeno (absortiva). Lo que encontramos fue un nivel superior de glucemia en los animales bajo un HRA antes de acceder al alimento contra el ayuno agudo (~1 día). Sin embargo, es posible que este nivel de glucemia se deba a la poca utilización de la glucosa, promovida por el lento vaciamiento gástrico o a un tipo de resistencia a la glucosa sugerido por la prueba de tolerancia a la glucosa, aunque no pareció incrementar la glucemia, tampoco bajo, es decir se mantuvo constante y con una insulina baja. Además, provocado por los niveles circulantes de los AGL, los cuales pueden ser una fuente importante de combustible al ser oxidados y favorecer el incremento de Acetil-CoA, el cual favorece alostéricamente la actividad de la PEPCK. Sin embargo, el grupo con HRA (11:00 h) no respondió con la administración de la alanina, al igual que el grupo AL (19:00 h). En cambio, el grupo bajo HRA (23:00 h) y el grupo ayuno agudo (~1 día) si lo hicieron, incrementando su nivel de glucosa. Sugiriendo nuevamente la participación de la vía gluconeogénica con la enzima PEPCK en el incremento de las reservas de glucógeno, ya observado en el glucógeno medido. Por lo pronto nuestros datos sugieren, que la gluconeogénesis hepática se encuentra aumentada bajo un HRA durante el perfil diurno de 24 h, y disminuía antes de acceder al alimento, esto al compararse con su respectivo control alimenticio (AL y Ayuno agudo).

Niveles de glucagon e insulina circulantes.

Los niveles circulantes tanto de insulina como de glucagon fueron similares a los datos reportados por Díaz-Muñoz et al. 2000, completándose los puntos temporales faltantes para completar las 24 h. El nivel de glucagon elevado y el de insulina disminuído durante las 24 h en el grupo HRA al compararlo con el grupo AL, favorece la gluconeogénesis hepática. Aunque, en la literatura se conoce bien que también favorece la glucogenólisis (formación de glucosa por parte del glucógeno), en nuestro grupo bajo HRA parece no hacerlo (Díaz-Muñoz et al. 2010), a pesar de que hay una ligera disminución del glucógeno antes de acceder al alimento (11:00 h) debido a los demás factores involucrados como la elevación de AGL (Escobar et al. 1998), glucemia (Martínez-Merlos et al. 2004), y una relación disminuída de insulina-glucagon (Díaz-Muñoz et al. 2000). Además, se presenta otra elevación de glucagon al inicio de la fase de oscuridad (23:00 h). En este punto temporal, el grupo HRA incrementa su nivel de glucemia, coincidiendo con otros resultados como el nivel más bajo de insulina y glucagon, y con un aumento de la PEPCK, la G6Pasa y de glucemia, cabe señalar que será importante conocer el glucógeno hepático en este punto temporal y así seguir favoreciendo nuestra hipótesis de que la gluconeogénesis hepática está contribuyendo con la síntesis de glucógeno bajo este protocolo experimental.

Inmunohistoquímica de la proteína PEPCK.

La distribución hepática de la proteína PEPCK se conoce bien por los trabajos de Jungermann and Kietzmann (1996) y de Rajas (2007), donde se establece que la hay una proporción de la PEPCK, donde fue mayor en la región PP que en la PC para el caso del ayuno y similar para el caso de la alimentación. Sin embargo, en nuestros resultados se encontraron algunas diferencias, presentándose una relación mayor en la PP en casi todas las condiciones alimenticias, excepto para el caso del grupo HRA. En este grupo, la proporción sólo cambió cuando se tuvo acceso al alimento e incrementó casi 9 h después, favoreciendo la región PC. Lo que nos hace sugerir, que la gluconeogénesis hepática contribuye en la producción de glucógeno antes de tener acceso al alimento (11:00 h) y en la producción de glucosa al inicio de la fase de oscuridad (23:00 h). Falta hacer más experimentos para corroborar esta hipótesis.

Presencia de la proteína glucógeno sintasa total (GYS), la forma fosforilada (pGYS) y el contenido de glucógeno hepático.

La presencia de la proteína GS total en el grupo AL fue aumentando conforme avanzaban las horas durante la fase de luz, teniendo el punto más alto desde el inicio a la mitad de la oscuridad (20:00-2:00 h). Esto se puede deber principalmente al incremento de la gluconeogénesis que favorecerá el incremento de la glucosa-6-fosfato (G6P) siendo un activador alostérico de la glucógeno sintasa y que al tener actividad los animales en la fase de oscuridad, el alimento proporciona el G6P incrementando su actividad y participando en la formación de glucógeno. En cambio, en el grupo experimental bajo HRA, su nivel alto fue antes y hasta después de comer (14:00 h), debido al incremento de la G6P por parte de la actividad gluconeogénica (PEPCK) y por parte del alimento, disminuyendo su presencia al mismo tiempo que disminuía la glucosa y la insulina circulante. Nuevamente se incrementó posterior al inicio de la oscuridad (23:00 h), debido al incremento momentáneo de la gluconeogénesis (PEPCK). El nivel promedio del perfil temporal para el grupo HRA fue mayor (45%) significativamente ($p < 0.05$) al del grupo AL. Así como la presencia de la proteína fosforilada, la pGYS (Ser641), la cual es la forma inactiva. Dicha proteína en el grupo AL conservó una cantidad similar hasta principio de la oscuridad (23:00 h), haciendo sentido con el incremento de la GYS total cuando la proteína pGYS va disminuyendo y resultando en un aumento en el contenido de glucógeno hepático. En cambio, en el grupo HRA, conservó un perfil más constante durante las 24 h y un nivel mayor que el grupo AL. Sin embargo, también conservó una relación entre los valores de la proteína GYS y el aumento del contenido de glucógeno hepático. Aunque los datos aquí mostrados no demuestran el por qué del aumento de la proteína pGYS en el grupo HRA, en otro estudio, relacionan la participación de la proteína PER2 como una posible implicada en el aumento de la proteína pGYS en un protocolo con ratones deficientes del gen *Per2* con alimentación restringida a un horario durante el día (Zani et al., 2013). Con relación al contenido de glucógeno hepático, otro grupo de trabajo encontró una relación con la proteína PER2 sobre la regulación del almacenamiento del mismo (Schmutz et al., 2010).

Presencia de SIRT1 y PGC1 α .

La presencia elevada de la proteína SIRT1 no significa que está muy activa la enzima, ya que se sabe que es dependiente del NAD⁺. Se sabe también que SIRT1 y PGC-1 α se incrementan en condiciones de ayuno, bajo restricción calórica y en protocolos de alimentación restringida temporalmente (Rodgers et al. 2005, Diaz-Muñoz et al. 2000). Por lo que, la actividad de la proteína SIRT1 y de la PGC-1 α antes de acceder al alimento en el grupo HRA (11:00) pueda estar favoreciendo la gluconeogénesis (ya que la SIRT1 puede desacetilar a PGC-1 α , traslocar juntos al núcleo y favorecer un complejo transcripcional que actúa sobre los genes gluconeogénicos) al mantener elevados los niveles de las enzimas gluconeogénicas, la PEPCK y la G6Pasa y por ello entre otros metabolitos favorecer el mantenimiento del glucógeno y la glucosa.

Como se ha mencionado en varios protocolos de restricción temporal al alimento, el hígado forma parte esencial del oscilador sincronizado por alimento tanto por ser un órgano encargado del manejo y procesamiento de micro y macronutrientes, capaz de responder a situaciones circadianas presentando una anticipación metabólica y fisiológica, entre algunos otros criterios que se sabe el hígado cumple (Silver y Balsam, 2010). También, se ha mencionado que el OSA puede estar formado por múltiples estructuras hipotalámicas como de diferentes órganos periféricos (estómago, páncreas, intestino delgado, tejido adiposo e hígado) con capacidad de responder y sincronizarse por el alimento (Aguilar-Roblero y Díaz-Muñoz, 2010; Blum et al., 2011). Por tal motivo en este proyecto nos hemos enfocado en seguir contribuyendo en cómo se da esta comunicación y qué adaptaciones presenta durante la restricción temporal al alimento, generando un entendimiento de la cronostasis que presenta el hígado dentro del metabolismo de glucosa.

La alimentación durante el día restringido confiere propiedades en la respuesta de la gluconeogénesis que no se observó en el grupo alimentado AL o en las ratas con ayuno agudo para ~1 día. HRA promovió una GNG mejorada que sea mantenida por la respuesta coordinada a los factores hormonales y la transcripción. Al final, GNG mejoró y revirtió la hipoglucemia inducida por la insulina, y contribuyó a reponer el contenido de glucógeno del hígado. Se necesitan más estudios para definir la relación mecanicista entre estos hallazgos

y la expresión del OSA. Por lo que proponemos un modelo de cómo se puede estar presentando la gluconeogénesis bajo el protocolo de horario restringido de alimentación durante la expresión del oscilador sincronizado por alimento (Figura 5).

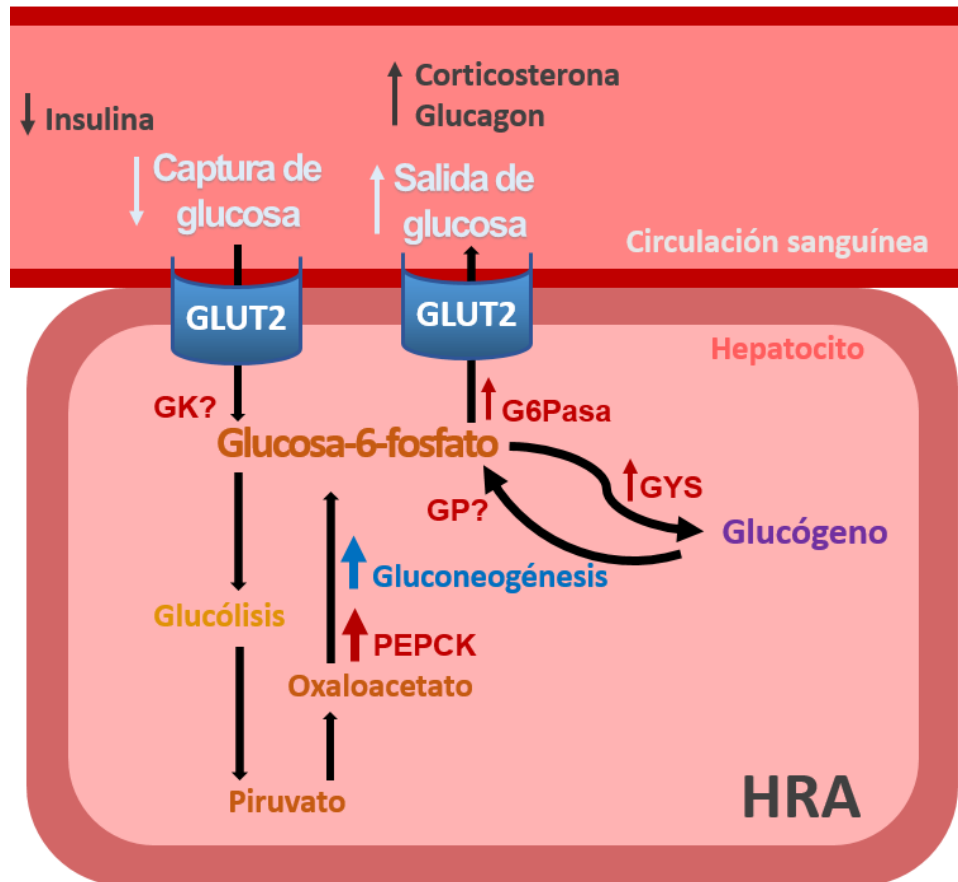


Figura 5. Vía gluconeogénica hepática bajo el protocolo del horario restringido de alimentación (HRA) durante la expresión del oscilador sincronizado por el alimento (OSA).

8. CONCLUSIONES

Los datos sugieren un efecto adaptativo por parte de los animales bajo un HRA, favoreciendo otro mecanismo compensatorio de obtención de energía, como la b-oxidación por parte de los AGL, los cuales se encuentran incrementados antes de acceder al alimento (11:00 h; Escobar et al. 1998; Díaz-Muñoz et al. 2000; Martínez-Merlos et al. 2004), sugiriendo una acción gluconeogénica del hígado hacia la formación de glucógeno y que posteriormente servirá como fuente de glucosa manteniendo sus niveles circulantes a lo largo del perfil temporal. Adicionalmente, el papel que adopta el hígado para manejar los nutrientes como del metabolismo de lípidos que ya ha sido probado y sugerido en otros trabajos, contribuye a que el manejo en el metabolismo de carbohidratos se comporte diferente al de un animal con libre acceso al alimento y al de un animal bajo ayuno agudo de 1 día, optimizando los nutrientes disponibles y manejándolos de forma moderada, manifestado por un vaciamiento gástrico lento como se sugiere en un trabajo de Martínez-Merlos y colaboradores (2004).

Perfil Temporal

- Hipoglucemia.
- Hubo un cambio de acrofase por parte de las actividades enzimáticas G6Pasa y PEPCK, presentándose antes del tiempo de acceso al alimento.
- Actividad de la G6Pasa similar (promedio) al grupo AL.
- Actividad de la PEPCK se incrementó vs AL con una ritmicidad cercana a las 12 h.
- Presencia de la SIRT1 y el PGC-1a estuvieron elevados antes y después de tener acceso al alimento (11:00-14:00 h) y al inicio de la oscuridad (23:00 y 20:00 h, respectivamente).
- Presencia de la GS (total) se comportó similar a la SIRT1, elevándose antes y después acceder al alimento (11:00-14:00 h) y a media fase de oscuridad (2:00 h) pero con mayor presencia de la proteína antes de acceder al alimento.

Gluconeogénesis a partir de alanina (ATT)

- Procesamiento similar de la alanina al grupo con libre acceso al alimento (11:00 h).
- Producción de glucosa en la fase nocturna del grupo bajo HRA (23:00 h).

Tolerancia a glucosa (GTT)

- Procesamiento similar de la glucosa (HRA-23h) que el grupo de ayuno 1 día (11:00 h) e intolerancia de glucosa (HRA-11h).

Zonación hepática

- PEPCCK está distribuida PP>PC (11:00 h) y cambia a PC>PP (23:00 h).

Perfil Hormonal

- Todas las hormonas presentaron un ritmicidad dual (cerca a las 12 h).
- Corticosterona cambió de acrofase (11:00 h) e incrementó su nivel temporal.
- Glucagon cambió de acrofase (11:00 h) y aumentó su nivel temporal.
- Insulina cambió de acrofase (14:00 h) y disminuyó su nivel temporal.

9. PERSPECTIVAS

Como se mencionó anteriormente, hace falta conocer más los mecanismos que involucran la adaptación del hígado bajo este protocolo, como entender:

- El recambio de glucosa, es decir, la actividad de las proteínas involucradas en la captura y su fosforilación que puede ser usada por varias rutas metabólicas (glucólisis, pentosas y producción de glucógeno).
- Determinar los receptores de glucosa en el hígado como GLUT2.
- Caracterizar el papel que juega la ruta de las pentosas en el flujo de la glucosa fosforilada (G6P).
- Determinar que tanto puede estar aportando el glicerol liberado por la lipólisis de los triacilglicéridos, ya que se sabe que aumentan los ácidos grasos, por lo que el glicerol debe estar aumentado, siendo una fuente de materia prima para la ruta gluconeogénica.
- Siguiendo con el punto anterior, sería importante medir a la fructosa-1,6-bifosfatasa, la glicerol kinasa, la glicerol fosfato deshidrogenasa y triosa fosfato isomerasa.
- Descartar el papel del NSQ que pueda estar jugando en la producción de glucosa por vagotomía hepática y ver realmente el efecto de la sincronización y el oscilador del alimento sobre este metabolismo de glucosa.

10. REFERENCIAS

- Aceves, C., Escobar, C., Rojas-Huidobro, R., Vázquez-Martínez, O., Martínez-Merlos, T., Aguilar-Roblero, R. y Díaz-Muñoz, M. (2003) *J. Endocrinol.* **179**, 91-96.
- Aguilar-Delfín I, López-Barrera F, Hernández-Muñoz R. (1996). Selective enhancement of lipid peroxidation in plasma membrane in two experimental models of liver regeneration: partial hepatectomy and acute CC14 administration. *Hepatology* 24:657–662.
- Aguilar-Roblero R. (2007). Cronostasia: más allá del modelo de los dos procesos en la regulación del sueño. *Avances de la Medicina del Sueño en Latinoamérica* 1(3):5-10.
- Aguilar-Roblero R, Díaz-Muñoz M. (2010). Chronostatic adaptations in the liver to restricted feeding: The FEO as an emergent oscillator. *Sleep and Biological Rhythms* 8:9-17.
- Ángeles-Castellanos M, Mendoza J, Díaz-Muñoz M, Escobar C. (2005). Food entrainment modifies the c-Fos expression pattern in brain stem nuclei of rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 688:R678-R684.
- Arellanes-Licea Edel C, Báez-Ruiz A, Carranza ME, Arámburo C, Luna M, Díaz-Muñoz M. (2014). Daily patterns and adaptation of the ghrelin, growth hormone and insulin-like growth factor-1 system under daytime food synchronisation in rats. *J Neuroendocrinol* 26(5):282-95.
- Aronoff, S. L., Berkowitz, K., Shreiner, B. y Want, L. (2004) *Diabetes Spec.* **17**,183-190.
- Azzout B, Bois-Joyeux B, Chanez M, Peret J. (1987). Development of gluconeogenesis from various precursors in isolated rat hepatocytes during starvation or after feeding a high protein, carbohydrate-free diet. *J Nutr* 117:164-169.
- Azzout-Marniche D, Gaudichon C, Blouet C, Bos C, Mathé V, Huneau JF, Tomé D. (2007). Liver glyconeogenesis- a pathway to cope with postprandial amino acid excess in high-protein fed rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 292:1400-1407.
- Báez-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.

- Báez-Ruiz A, Cázares-Gómez K, Vázquez-Martínez O, Aguilar-Roblero R, and Díaz-Muñoz M. (2013). Diurnal and nutritional adjustments of intracellular Ca²⁺ release channels and Ca²⁺ ATPases associated with restricted feeding schedules in the rat liver. *J Circadian Rhythms* 11:8.
- Balsalobre A. (2002). Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell Tissue Res.* **309**:193-199.
- Bass J, Takahashi JS (2010) Circadian Integration of Metabolism and Energetics. *Science* 330: 1349-1354.
- Bass J. (2012). Circadian topology of metabolism. *Nature.* 491:348-356.
- Bechtold DA, Gibbs JE, Loudon AS. (2010). Circadian dysfunction in disease. *Trends Pharmacol Sci* 31:191-198.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L. y Stryer, L. (2002) *Biochemistry.* 5th edition. New York: WH Freeman.
- Browning JD, Weis B, Davis J, Satapati S, Merritt M, Malloy CR, Burgess SC (2009) Alterations in hepatic glucose and energy metabolism as a result of calorie and carbohydrate restriction. *Hepatology* 48: 1487-1496.
- Burke ZD and Tosh D (2006) The Wnt/ β -catenin pathway: master regulator of liver zonation? *BioEssays* 28: 1072-1077.
- Blum ID, Lamont EW, Abizaid A. (2012). Competing clocks: Metabolic status moderates signals from the master circadian pacemaker. *Neurosci Biobehav Rev* 36:254-270.
- Broberger C, Hökfelt T. (2001). Hypothalamic and vagal neuropeptide circuitries regulating food intake. *Physiol. Behav.* 74, 669-682.
- Cailotto C, van Heijningen C, van der Vliet J, van der Plasse G, Habold C, Kalsbeek A, Pévet P, Buijs RM. (2008). Daily rhythms in metabolic liver enzymes and plasma glucose require a balance in the autonomic output to the liver. *Endocrinology* 149:1914-1925.
- Cannon WB. (1929). Organization for physiological homeostasis. *Physiol Rev* 9:399–431.

- Caldelas I, Tejadilla D, González B, Montúfar R, Hudson R. (2007). Diurnal pattern of clock gene expression in the hypothalamus of the newborn rabbit. *Neurosci* 144:395–401.
- Cardinali DP, Golombek DA. (1994). Naturaleza y propiedades de los ritmos biológicos. Análisis de los ritmos circadianos. Cap. 1: 15-26. En: *Introducción a la Cronobiología: fisiología de los ritmos biológicos*. Cardenali DP, Jordá CJJ, Sánchez BEJ. Universidad de Cantabria, Caja Cantabria.
- Carneiro BTS, Araujo JB. (2009). The Food-Entrainable Oscillator: A Network of Interconnected Brain Structures Entrained by Humoral Signals? *Chronobiology International* 26:1273–1289.
- Capel, J. Lozano R., Martínez-Zapater, J.M. y Jarillo, J.A. 2002. Ritmos y relojes circadianos de las plantas. *Ecosistemas* 2003(1):1-9.
- Chakravarty K, Cassuto H, Reshef L and Hanson R W (2005) Factors that control the tissue-specific transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase-c. *Crit. Rev. Biochem.Mol. Biol.* 40:129–154.
- Chakravarty K and Hanson RW (2008) Insulin Regulation of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase-C Gene Transcription: The Role of Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c. *Nut. Rev.* 65:S47-S56.
- Challet, E. y Pévet, P. (2003) *Front. Biosci.* 8, 246-257.
- Choudhury, M., Qadri, I., Rahman, S.M., Schroeder-Gloeckler, J., Janssen, R.C., Friedman, J.E. (2011) C/EBP β is a AMP kinase sensitive and up-regulates PEPCK in response to ER stress in hepatoma cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 331: 102-108.
- Curi R, Hell NS. (1986). Metabolic changes of twenty weeks food-restriction schedule in rats. *Physiology and Behavior.* 36:239-243.
- Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, Schibler U (2000) Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* 14: 2950-2961.
- Davidson AJ, 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 AJ, Poole AS, Yamazaki S, Menaker M. (2003). Is the food-entrainable oscillator in the digestive system? *Genes Brain Behav.* 2: 32-39.
- Davidson AJ. (2006). Search for the feeding-entrainable circadian oscillator: A complex proposition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290: R1524-R1526.
- Davidson A. (2009). Lesion studies targeting food-anticipatory activity. *Eur J Neurosci* 30:1658-1664.
- Díaz-Muñoz M, Vázquez-Martínez O, Aguilar-Roblero R, Escobar C. (2000). Anticipatory changes in liver metabolism and entrainment of glucagon, insulin and corticosterone in food-restricted rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279:R2048-R2059.
- Díaz-Muñoz M, Vázquez-Martínez O, Báez-Ruiz A, Martínez-Cabrera V, Soto-Abraham MV, Ávila-Casado MC, Larriva-Sahd J. (2010). Daytime food restriction alters liver glycogen, triacylglycerols, and cell size. A histochemical, morphometric, and ultrastructural study. *Comp Hepatol* 9:5-10.
- Escobar C, Díaz-Muñoz M, Encinas F, Aguilar-Roblero R. (1998). Persistence of metabolic rhythmicity during fasting and its entrainment by restricted feeding schedules in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 274:R1309-R1316.
- Escobar C, Martínez-Merlos MT, Ángeles-Castellanos M, del Carmen Miñana M, Buijs RM. (2007). Unpredictable feeding schedules unmask a system for daily resetting of behavioural and metabolic food entrainment. *Eur J Neurosci* 26:2804-2814.
- Finn PF, Dice F. (2006). Proteolytic and lipolytic responses to starvation. *Nutrition* 22:830-844.
- Friedman MI, Harris RB, Ji H, Ramirez I, Tordoff MG. (1999). Fatty acid oxidation affects food intake by altering hepatic energy status. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 276:1046-1053.
- Friedman MI, Horn CC, Ji H. (2005). Peripheral signal in the control of feeding behavior. *Chem. Senses* 30:i182-i183.
- Fuchs G. (2011). Alternative pathways of carbon dioxide fixation: insights into the early evolution of life? *Annu Rev Microbiol* 65:631-658.
- Glossop, N.R.J. y Hardin, P.E. (2002). Central and peripheral circadian oscillator mechanisms in flies and mammals. *J. Cell Sci.* 115, 3369-3377.

- GraphPad Prism versión 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com
- Gray TS, O'Donohue TL, Magnuson DJ. (1986). Neuropeptide Y innervation of amygdaloid and hypothalamic neurons that project to the dorsal vagal complex in rat. *Peptides* 7:341-349.
- Grimaldi B, Sassone-Corsi P. (2007). Circadian rhythms: metabolic clockwork. *Nature* 447:386-387.
- Hanson RW and Reshef L (1997) Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annu. Rev. Biochem.* 66: 581-611.
- Hara R, Wan K, Wakamatsu H, Aida R, Moriya T, Akiyama M, Shibata S. (2001). Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells.* 6:268-279.
- Hatori M, Panda S. (2010). CRY links the circadian clock and CREB-mediated gluconeogenesis. *Cell Research* 20:1285-1288.
- Herzog ED, Tosini G. 2001. The mammalian circadian clock shop. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 12:295–303.
- Honma K, Honma S, Hiroshige T. (1984). American Physiological Society. R721-R726.
- Jambor de Sousa UJ, Leonhardt M, Langhans W. (2003). Effect of hepatic portal vein (HPV) caprilic acid (CA) infusion on saccharin preference en gastric emptying in male rats. *Appetite* 40:A338-9.
- Jitrapakdee S. (2012). Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44:33–45.
- Jungermann K, Kietzmann T. (1996). Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annu Rev Nutr* 16:179-203.
- Katz J., Golden S. and Wals PA. (1979). Glycogen synthesis by rat hepatocytes. *Biochem. J.* 180, 389-402.
- Katz NR (1992) Metabolic Heterogeneity of Hepatocytes across the Liver Acinus. *J. Nutr.* 122: 843-849.
- Katz, J. y Tayek, J. A. (1998). Gluconeogenesis and the Cori cycle in 12-, 20-, and 40-h-fasted humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 275, E537-E542.

- Kennaway DJ, Owens JA, Voultzios A, Boden MJ, Varcoe TJ (2007) Metabolic homeostasis in mice with disrupted *Clock* gene expression in peripheral tissues. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293: 1528-1537.
- Kerndt PR, Naughton MD, Driscoll CE, Loxterkamp DA. (1982). Fasting: the history, pathophysiology and complications. *Western J Med* 170:379-399.
- Kramer A, Mellow M. (2013). *Circadian Clocks*. Ed. Springer. New York, USA.
- Krieger DT. (1974). Food and water restriction shifts corticosterone, temperature, activity and brain amine periodicity. *Endocrinology.* 95:1195-1201.
- Konner AC, Klockener T, Bruning JC. (2009). Control of energy homeostasis by insulin and leptin: targeting the arcuate nucleus and beyond. *Physiol. Behav.* 97, 632-638.
- Koukkari WL, Sothorn RB. (2006). *Introducing Biological Rhythms. A Primer on the Temporal Organization of Life, with Implications for Health, Society, Reproduction and the Natural Environment*. Ed. Springer. New York, USA.
- Lam TKT, Carpentier A, Lewis GF, van de Werve G, Fantus G, Giacca A. (2003). Mechanisms of the free fatty acid-induced increase in hepatic glucose production. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284:863-873.
- Landry GJ, Simon MM, Webb IC, Mistlberger RE. (2006). Persistence of a behavioral food-anticipatory circadian rhythm following dorsomedial hypothalamic ablation in rats. *Am J Regul Integr Comp Physiol* 290:R1527-R1534.
- Landry GJ, Kent BA, Patton DF, Jaholkowski M, Marchant EG, Mistlberger RE. (2011). Evidence for Time-of-Day Dependent Effect of Neurotoxic Dorsomedial Hypothalamic Lesions on Food Anticipatory Circadian Rhythms in Rats. *PLoS One* 6:e24187.
- Leonhardt M, Langhans W. (2004). Fatty acid oxidation and control of food intake. *Physiology & Behavior* 83:645– 651.
- Lima FB, Hell NS, timo-Iaria C. (1985). Carbohydrate metabolism and food intake in food-restricted rats. Relationship between the metabolic events during the meal and the degree of food intake. *Physiol Behav.* 35:695-700.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.

- Luna M, Rodríguez-Méndez AJ, Berumen L, Carranza M, Riesgo-Escovar J, Baudet ML, Harvey S, Arámburo C. (2008). Immune growth hormone (GH): Localization of GH and GH mRNA in the bursa of Fabricius. *Dev Comp Immunol* 32:1313–1325.
- Luna-Moreno D, Vázquez-Martínez O, Báez-Ruiz A, Ramírez J, Díaz-Muñoz M. (2007). Food restricted schedules promote differential lipoperoxidative activity in rat hepatic subcellular fractions. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 146(4):632-43.
- Luna-Moreno D, Aguilar-Roblero R, Díaz-Muñoz M. (2009). Restricted feeding entrains rhythms of inflammation-related factors without promoting an acute-phase response. *Chronobiol Int* 26(7):1409–1429.
- Luna-Moreno D, Ayala-García B, Díaz-Muñoz M. (2012). Daytime restricted feeding modifies 24 h rhythmicity and subcellular distribution of liver glucocorticoid receptor and the urea cycle in rat liver. *British Journal of Nutrition* 108:2002–2013.
- Macfarlane DP, Forbes S, Walker BR. (2008). Glucocorticoids and fatty acid metabolism in humans: fuelling fat redistribution in the metabolic syndrome. *J Endocrinol* 197:189–204.
- Martínez-Merlos MT, Ángeles-Castellanos M, Díaz-Muñoz M, Aguilar-Roblero R, Mendoza J, Escobar C. (2004). Dissociation between adipose tissue signals, behavior and the food-entrained oscillator. *J. Endocrinol* 181:53-63.
- Masri S, Sassone-Corsi P. (2013). The circadian clock: a framework linking metabolism, epigenetics and neuronal function. *Nat Rev Neurosci* 14:69-75.
- McEwen BS, Wingfield JC. (2003). The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and Behavior* 43:2-15.
- Mendoza J. (2007). Circadian clocks: setting time by food. *J Neuroendocrinol* 19:127-137.
- 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. *European Journal of Neuroscience* 30:1718–1729
- Mistlberger RE. (2011). Neurobiology of food anticipatory circadian rhythms. *Physiol Behav* 104:535-545.

- Mohawk JA, Green CB, Takahashi JS. (2012). Central and Peripheral Circadian Clocks in Mammals. *Annu. Rev. Neurosci.* 35:445–62.
- Moller, D.E. (2001). New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature* 414: 821-827.
- Moore RY, Eichler VB. (1972). *Brain. Res.* 42:201.
- Mrosovsky N. (1990). *Rheostasis: the physiology of change.* New York, NY: Oxford University Press, Inc.
- Nordlie RC, Arion WJ. (1966). Glucose-6-phosphatase. *Methods Enzymol* 9:619–625.
- Nordlie RC, Foster JD, Lange AJ. (1999). Regulation of glucose production by the liver. *Annu Rev Nutr* 19:379-406.
- Nuttall, F.Q., Ngo, A., Gannon, M.C. (2008) Regulation of hepatic glucose production and the role of gluconeogenesis in humans: is the rate of gluconeogenesis constant? *Diabetes Metab. Res. Rev.* 24: 438-458.
- Oliver, O. E. (2005) *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 33, 246 –251.
- Opie LH, Newsholme EA. (1967). The Activities of Fructose 1,6-Diphosphatase, Phosphofructokinase and Phosphoenolpyruvate Carboxykinase in White Muscle and Red Muscle. *Biochem J* 103:391-399.
- Patton DF, Mistberger RE. (2013). Circadian adaptations to meal timing: neuroendocrine mechanisms. *Front Neurosci* 7:1-14.
- Pedersen KB, Zhang P, Doumen C, Charbonnet M, Lu D, Newgard CB, Haycock JW, Lange AJ and Scott DK (2007) The promoter for the gene encoding the catalytic subunit of rat glucose-6-phosphatase contains two distinct glucose-responsive regions. *Am. J. Physiol.Endocrinol. Metab.* 292: E788–E801.
- Peret J, Chanez M. (1976). Influence of diet, cortisol and insulin on the activity of pyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in the rat liver. *J Nutr* 106: 103-110.
- Pérez-Mendoza M, De Ita-Pérez D, Díaz-Muñoz M. (2012). Gluconeogénesis, una visión contemporánea de una vía metabólica antigua. *REB* 31:10-20.
- Pérez-Mendoza M, Rivera-Zavala J, Valdés-Fuentes M, Vázquez-Martínez O, Díaz-Muñoz M. (2013). El acceso restringido a la alimentación como un sistema experimental

para estudiar la regulación circadiana del metabolismo durante el ciclo de ayuno-realimentación. Mensaje Bioquímico (TAB), Vol. XXXVII, 41 – 68.

- http://bioq9c1.fmedic.unam.mx/tab2013/TAB2013/Mensaje_Bioquimico.html
- Philippens KM, von Mayersbach H, Scheving LE. (1977). Effects of the scheduling of meal-feeding at different phases of the circadian system in rats. *J Nutr.* 107:176-93.
- Pittendrigh CS. (1965). Biological Clocks, the Functions, Ancient and Modern, of Circadian Oscillations. En: *Science in the Sixties, Proceedings of the 1965 Cloudcroft Symposium*, Air Force Office of Scientific Research. 96-111.
- Portaluppi et al. (2010). Ethics and Methods for Biological Rhythm Research on Animals and Human Beings. *Chronobiology International* 27:1911–1929.
- Rajas F, Jourdan-Pineau H, Stefanutti A, Abou Mrad E, Iynedjian PB, Mithieux G (2007) Immunocytochemical localization of glucose 6-phosphatase and cytosolic phosphoenopyruvate carboxykinase in gluconeogenic tissues reveals unsuspected metabolic zonation. *Histochem. Cell. Biol.* 127: 555-565.
- Reddy AB, Maywood ES, Karp NA. (2007). Glucocorticoid signaling synchronizes the liver circadian transcriptome. *Hepatology* 45:1478-1488.
- Reinberg A, Smolensky MH. (1993) Introduction to chronobiology. En: A. Reinberg and M. Smolensky (Eds.) *Biological Rhythms and Medicine*. Ed. Springer, NY, USA. 1-21.
- Reiners JJ, Busch H. (1980). Transcriptional and posttranscriptional modulation of cytoplasmic ribonucleic acids in regenerating liver and Novikoff hepatoma. *Biochemistry* 19:833–841.
- Rivera-Zavala JB, Báez-Ruíz GA, Díaz-Muñoz M. (2011). Changes in the 24 h Rhythmicity of Liver PPARs and Peroxisomal Markers When Feeding Is Restricted to Two Daytime Hours. *PPAR Research* 2011:1-11.
- Roden M, Bernroider E. (2003). Hepatic glucose metabolism in humans--its role in health and disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism.* 17:365–383.
- Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 434:113-118.

- Rodríguez de Romo AC. (2007). Claude Bernard, el hombre y el científico. *Anales Médicos* 52(2):90-96.
- Rudic RD, McNamara P, Curtis A, Boston RC, Panda S. (2004). BMAL1 and CLOCK, Two Essential Components of the Circadian Clock, Are Involved in Glucose Homeostasis. *PLoS Biology* 2:1893-1899.
- Salgado-Delgado R, Saderi N, Basualdo Mdel C, Guerrero-Vargas NN, Escobar C, Buijs RM. (2013). Shift Work or Food Intake during the Rest Phase Promotes Metabolic Disruption and Desynchrony of Liver Genes in Male Rats. *PLoS One* 8:e60052.
- Sattler AR, Kahn CR. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 414: 799-806.
- Schmutz I, Ripperger JA, Baeriswyl-Aebischer S, Albrecht U. (2010). The mammalian clock component PERIOD2 coordinates circadian output by interaction with nuclear receptors. *Genes Dev.* 2010 24: 345-357.
- Schneider JE, Watts AG. (2002). *Hormon. Brain Behav.* 1st. Ed. Elsevier Inc. Academic Press.
- Schwartz GJ. (2000). The role of gastrointestinal vagal afferents in the control of food intake. *Nutrition* 16:866-873.
- Shibata, S., Tahara, Y. y Hirao, A. (2010) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62, 918-927.
- Silver R, Balsam P. (2010). Oscillators entrained by food and the emergence of anticipatory timing behaviors. *Sleep Biol Rhythms* 8:120-136.
- Stenvers DJ, Jonkers CF, Fliers E, Bisschop P, Kalsbeek A. (2001). Nutrition and the circadian timing system. *Prog Brain Res* 199:359-376.
- Stephan FK, Zucker I. (1972). Circadian Rhythms in Drinking Behavior and Locomotor Activity of Rats Are Eliminated by Hypothalamic Lesions. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 69(6):1583-1586.
- Stephan FK. (1992). Resetting of a feeding-entrainable circadian clock in the rat. *Physiol. Behav.* 52, 997-1008.
- Stephan FK. (2002). The “other” circadian system: food as a Zeitgeber. *J Biol Rhythms* 17:284-292.
- 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.

- St-Onge MP, Jones PJH. (2002). Physiological effects of medium-chain triglycerides. potential agents in the prevention of obesity. *J Nutr* 132:329–32.
- Tahara Y, Shibata S. (2013). Chronobiology and nutrition. *Neuroscience* 253:78-88.
- Turek FW, Allada R. (2002). Liver has a rhythm. *Hepatology* 35:743-745.
- Van Remmen H, Ward WF. (1994). Effect of age on induction of hepatic PEPCCK by fasting. *Am J Physiol* 267: G195-G200.
- Vaughan M, Berger JE, Steinberg D. (1964). Hormone-sensitive lipase and monoglyceride lipase activities in adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 239:401-409.
- Vogt MC, Bruning JC. (2013). CNS insulin signaling in the control of energy homeostasis and glucose metabolism - from embryo to old age. *Trends Endocrinol Metab* 24(2):76-84.
- Williamson R, McNeilly A, Sutherland C. (2012). Insulin resistance in the brain: an old-age or new-age problem? *Biochem Pharmacol* 84:737-745.
- Xu C, Chakravarty K, Kong X, Tuy TT, Arinze IJ, Bone F and Massillon D (2007) Several Transcription Factors Are Recruited to the Glucose-6-Phosphatase Gene Promoter in Response to Palmitate in Rat Hepatocytes and H4IIE Cells. *J. Nutr.* 137: 554–559.
- Yabaluri N and Bashyam MD (2010) Hormonal regulation of gluconeogenic gene transcription in the liver. *J. Biosci.* 35:473-484.
- Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block GD, Sakaki Y, Menaker M, Tei H. (2000). Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 28:682-685.
- Yin L, Wu N, Lazar MA. (2010). Nuclear receptor Rev-erba: a heme receptor that coordinates circadian rhythm and metabolism. *NRS* 8:1-6.
- Zani F, Breasson L, Becattini B, Vukolic A, Montani JP, Albrecht U, Provenzani A, Ripperger JA, Solinas G. (2013). PER2 promotes glucose storage to liver glycogen during feeding and acute fasting by inducing Gys2 PTG and G L expression. *Mol Metab* 2(3):292-305.
- Zhang EE, Liu Y, Dentin R, Pongsawakul PY, Liu AC, Hirota T, Nusinow DA, Sun X, Landais S, Kodama Y, Brenner DA, Montminy M, Kay SA (2010) Cryptochrome

mediates circadian regulation of cAMP signaling and hepatic gluconeogenesis. *Nat. Med.* 16:1152–1156.