



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, CAMPUS JURQUILLA**

**REGULACIÓN DE LA BETA OXIDACIÓN MITOCONDRIAL DURANTE LA
EXPRESIÓN DEL OSCILADOR SINCRONIZADO POR ALIMENTO**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

JULIETA BERENICE RIVERA ZAVALA

TUTOR

**DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**DR. ROLANDO E. HERNÁNDEZ MUÑOZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**DR. MANUEL MIRANDA ANAYA
UMDI-FACULTAD DE CIENCIAS**

CD.MX., NOVIEMBRE DE 2017



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.

DEDICATORIAS

A mi padre Juan Antonio; por ser mi pilar en el conocimiento, por enseñarme el amor hacia mi carrera, pero sobre todo por indicarme el camino a ser un mejor ser humano y esforzarme en realizar todos mis sueños.

A mi madre María de los Ángeles; por estar conmigo en cada paso de mi vida profesional y personal, por jalarme las orejas en los momentos de desesperación. A ellos que son la principal fuente de orgullo y pasión de mis acciones.

A mi razón de vivir, soñar, pero, sobre todo, la razón de seguir adelante en este camino, a mi Sophie Maureen Molina Rivera Princesa (Pachi). Por qué cada mañana me motivas a llevar una sonrisa en el momento en el que veo tu cara. Te amo mi cielo.

A mi compañero de parranda Christian Molina, aventuras, tristezas, enojos, alegrías. Te amo, por qué me diste el regalo más hermoso de mi vida, y por qué cuando tengo en mi mente cosas del laboratorio, eres el único que me dices: “Ponte a leer más” jajaja. Te amo

A mi hermana Angela Sarahí; porque eres mi compañera, amiga y confidente, logramos una comunicación tan impresionante que cada una sabía lo que la otra quería con solo una mirada, porque siempre pude apoyarme en ti en cada instante académico y personal.

A mi hermano Juan Antonio; porque te convertiste en mi amigo inseparable de alegrías, desvelos y tristezas, mi mejor confidente, porque nos volvimos uno solo en cada momento de mi carrera y mi vida. Porque gracias a ti, sé que uno más uno no es dos.....

A mi abuelita Clara; porque se convirtió en mi defensora, mi amiga, el ser que a pesar de todo siempre estaba ahí con su cariño y apoyo. Por decirme siempre: “Tu lo vas a lograr, estoy muy orgullosa de ti”. Muchas gracias a mi angelita.

A mis abuelitos Medardo y Lucha; por qué me apoyaron con sus consejos.

Al Dr. Mauricio; por permitirme entrar a este mundo del conocimiento que me impresionó, por su apoyo, por siempre tener el tiempo de escuchar y enseñar, por su maravilloso corazón científico y humano.

ÍNDICE

	Página
Resumen	6
Summary	8
Índice de Tablas	9
Índice de Figuras	10
1. ANTECEDENTES	12
1.1 Hígado y Metabolismo	12
1.2 Metabolismo de lípidos	13
1.3 Transporte de lípidos (Lipoproteínas)	14
1.4 Eje maestro regulador de metabolismo de lípidos	19
1.4.1 Cinasa dependiente de AMP α (AMPK α)	19
1.4.2 Sirtuina 1	21
1.4.3 Coactivador de PPAR γ 1 α (PGC-1 α)	22
1.4.4 Carnitina palmitoil transferasa 1 α (CPT-1 α)	24
1.4.5 Oxidación de ácidos grasos	25
1.5 Ritmos biológicos	26
1.6 Ritmos circadianos	27
1.7 Reloj Molecular	27
1.8 Oscilador Sincronizado por Alimento	29
1.9 Metabolismo de lípidos durante la expresión del Oscilador Sincronizado por Alimento	31

2. Planteamiento del problema	33
3. Hipótesis	34
4. Objetivos generales y particulares	35
5. METODOLOGÍA	37
5.1 Animales	37
5.2 Diseño experimental	37
5.3 Obtención del suero	38
5.4 Cuantificación de Malonil CoA en hígado	38
5.5 Cuantificación de cuerpos cetónicos en suero	38
5.6 Cuantificación del perfil lipídico	38
5.7 Fraccionamiento subcelular	39
5.8 Western Blot	39
5.9 Inmunohistoquímica	40
5.10 Oxidación de ácidos grasos U-[¹⁴ C]Palmitoil CoA	41
5.11 Estadística	42
6. RESULTADOS	35
7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	53
8. BIBLIOGRAFÍA	63

RESUMEN

La restricción diurna de alimento (2 h de acceso a los alimentos de 12:00 a 14:00 h durante 3 semanas) es un protocolo experimental que modifica la relación entre las vías metabólicas y el reloj circadiano molecular. La estructura anatómica precisa que controla las adaptaciones fisiológicas y bioquímicas para optimizar el uso de nutrientes es desconocido. Exploramos los cambios en la oxidación de lípidos en el hígado, tales como la β -oxidación y su regulación, así como las adaptaciones en el perfil de lipoproteínas. Se encontró que la restricción diurna de alimento promovió durante el día una elevación de los cuerpos cetónicos antes de la hora de comer, una alterada ritmicidad diaria de la producción de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de ácido palmítico radioactivo, y una sobre regulación de los activadores de la oxidación de ácidos grasos, la subunidad α de la cinasa dependiente de AMP, la deacetilasa sirtuina 1 y el coactivador de $\text{PPAR}\gamma 1\alpha$. También se observó un aumento en la distribución de la cinasa dependiente de AMP subunidad α fosforilada en los hepatocitos de la zona periportal. La lipasa C, importante para la transformación de lipoproteínas, mostró un cambio durante la fase diurna, con un pico en el momento de acceso a los alimentos. En el suero, hubo un aumento de la lipoproteína de baja densidad, que fue responsable de una elevación neta de colesterol circulante. Concluimos que nuestros resultados indican un aumento de la respuesta de ayuno en el hígado, durante la sincronización diaria para acceso a los alimentos, lo que implica un estado metabólico alterado en la oxidación de ácidos grasos, así como una elevación significativa de las lipoproteínas de baja densidad en suero. Estas adaptaciones pueden ser parte de la entrada metabólica que subyace a la expresión del oscilador sincronizado por alimento.

Palabras clave: restricción diurna de alimento, oxidación de ácidos grasos, AMPK, SIRT, PGC-1 α y lipoproteínas.

SUMMARY

Daytime restricted feeding (2 h of food access from 12:00 to 14:00 h for 3 weeks) is an experimental protocol that modifies the relationship between metabolic networks and the circadian molecular clock. The precise anatomical locus that controls the biochemical and physiological adaptations to optimize nutrient use is unknown. We explored the changes in liver oxidative lipid handling such as β -oxidation and its regulation, as well as the adaptations in the lipoprotein profile. It was found that daytime restricted feeding promoted an elevation of ketone bodies before mealtime, an altered daily rhythmicity of $^{14}\text{CO}_2$ production from radioactive palmitic acid, and an up-regulation of the fatty acid oxidation activators, the α -subunit of AMP-activated protein kinase, the deacetylase sirtuin 1, and the ppar gamma coactivator 1α . An increased localization of phosphorylated α -subunit of AMP-activated protein kinase in the periportal hepatocytes was also observed. Lipase C, important for lipoprotein transformation, showed a change of daily phase, with a peak at the time of food access. In serum, there was an increase of low density lipoprotein, which was responsible for a net elevation of circulating cholesterol. We conclude that our results indicate an increased fasting response in the liver during daily synchronization to food access, which involves altered metabolic of fatty acid oxidation as well a significant elevation of serum low density lipoprotein. These adaptations could be part of the metabolic input that underlies the expression of the food-entrained oscillator.

Key words: daytime restricted feeding fatty acid oxidation, AMPK, sirtuina 1, PGC- 1α and lipoproteins.

Índice de Tablas

Tabla	Página
1. Principales componentes lipídicos y apolipoproteínas.	16
2. Principales apolipoproteínas y sus funciones.	18
3. Microarreglos de genes implicados en el metabolismo de lípidos	52

Índice de Figuras

Figura	Página
1. Estructura y zonación de las vías metabólicas en el hígado.	13
2. Estructura de las lipoproteínas.	14
3. Clasificación de las lipoproteínas.	16
4. Metabolismo de lipoproteínas.	18
5. Estructura y activación de AMPK.	19
6. Regulación de sirtuina 1 en el metabolismo.	21
7. Eje maestro regulador del metabolismo de lípidos.	20
8. Oxidación de ácidos grasos libres en la mitocondria.	25
9. Reloj molecular y metabolismo.	29
10. Oscilador Sincronizado por Luz y Oscilador Sincronizado por Alimento.	30
11. Efecto de la restricción diurna de alimento en las variaciones diarias en la oxidación de ácidos grasos.	44
12. Efecto de la restricción diurna de alimento en las variaciones diarias de la cinasa dependiente de AMPK subunidad alfa fosforilada (pAMPK α).	46
13. Distribución nuclear hepática de la cinasa dependiente de AMP α fosforilada (pAMPK) en la zona pericentral (PC) y periportal (PP).	47
14. Efecto de la restricción diurna de alimento en las variaciones diarias de sirtuina 1 (SIRT1).	48

15. Efecto de la restricción diurna de alimento en las variaciones diarias del coactivador de PPAR γ 1 α (PGC-1 α).	49
16. Efecto de la restricción diurna de alimento en las variaciones diarias del perfil lipídico y lipasa C.	51
17. Cambios en los reguladores de la oxidación de ácidos grasos y el metabolismo de lipoproteínas, colesterol y TAG durante la actividad anticipatoria al alimento.	61

1. ANTECEDENTES

1.1 Hígado y Metabolismo

El hígado es un órgano que lleva a cabo funciones vitales como el manejo de nutrientes, el metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos. La arquitectura del hígado está compuesta por lóbulos. Cada lóbulo está dividido en zonas con funciones específicas, donde las funciones dependen del flujo de la sangre rica en nutrientes provenientes del intestino a través del sistema porta-hepático (Birchmeier, 2016). La arteria hepática está localizada cerca de la vena porta, que junto con el ducto biliar componen la tríada hepática, las cuales proveen al hígado de sangre rica en oxígeno. Este flujo determina la organización del parénquima hepático. El flujo de la sangre va de la vena portal y la arteria hepática a la vena central. Por otro lado, la bilis se mueve de la zona central a la zona portal. Jungermann y Kietzmann, (1996) propusieron el concepto de zonación, el cuál propone que vías metabólicas opuestas o complementarias se llevan a cabo en diversas regiones del lóbulo para mantener la homeostasis del organismo (Figura 1A).

No todos los procesos en el hígado presentan zonación. En la figura 1B, el hígado exhibe una zonación metabólica; el flujo del oxígeno, la gluconeogénesis y la oxidación de ácidos grasos son predominantes en la zona periportal, mientras que la glucólisis, la lipogénesis, la cetogénesis y la síntesis de triacilglicéridos se presentan en la zona pericentral (Birchmeier, 2016).

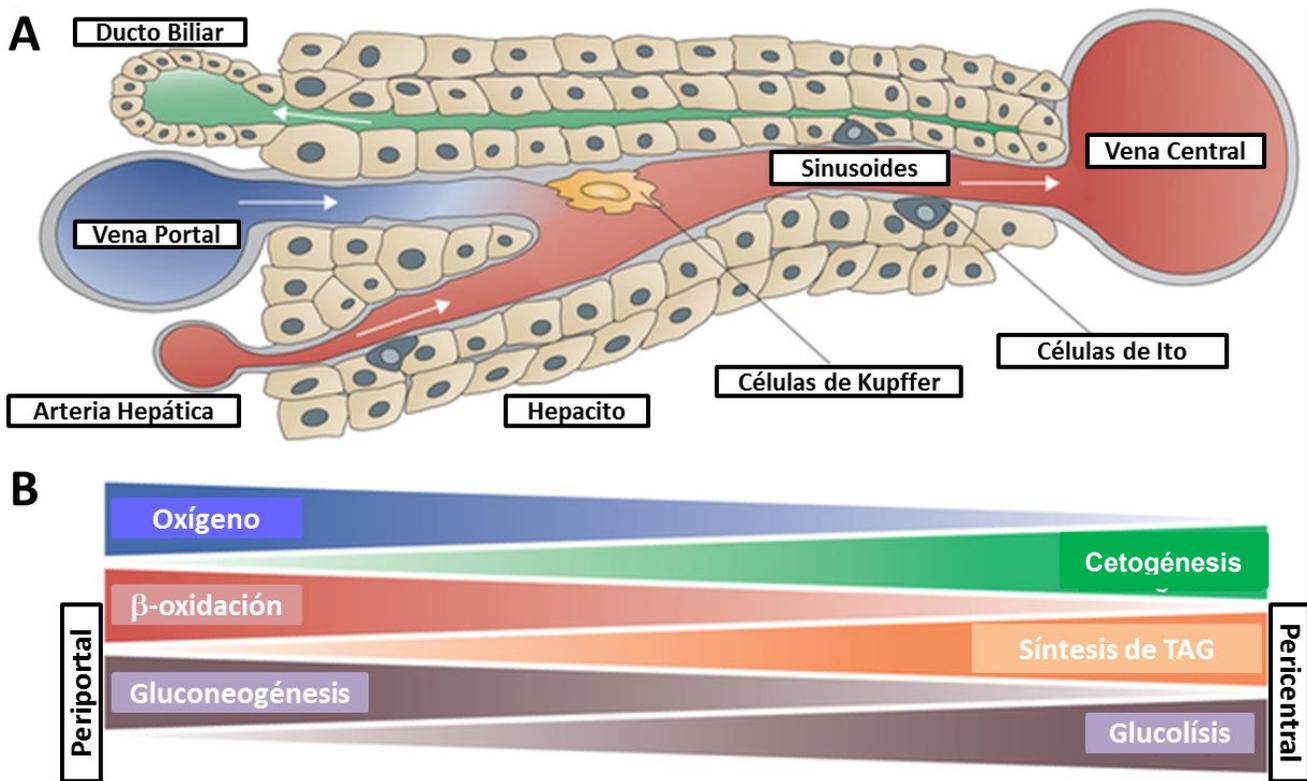


Figura 1. Estructura y zonación de las vías metabólicas en el hígado. A) Se muestra la estructura del lóbulo hepático, conformado por la tríada hepática (ducto biliar, vena portal y la arteria hepática) Panel A (izquierda). La vena central, los sinusoides que se disponen entre las hileras de los hepatocitos, las células de Kupffer y células de Ito. B) La estructura del hígado contiene zonas metabólicas que llevan a cabo funciones como la β -oxidación y gluconeogénesis (zona periportal), glucólisis y lipogénesis (zona pericentral). Modificado de Birchmeier, 2016.

1.2 Metabolismo de lípidos

El alimento se digiere en el tracto gastrointestinal: los lípidos (ácidos grasos con 14 o más átomos de carbono), son re-sintetizados en los enterocitos y pasan a la circulación linfática. Los ácidos grasos de cadenas inferiores a 14 carbonos, entran directamente en el sistema de la vena porta y son transportados hacia el hígado. En el estado postprandial la glucosa es convertida en glucógeno y en aminoácidos o ácidos grasos en el hígado. Los ácidos grasos se esterifican con el glicerol-3-fosfato para generar triacilglicéridos. Los triacilglicéridos son almacenados en el hígado o liberados hacia la circulación en

partículas especializadas, llamadas lipoproteínas cuyo destino final son tejidos extrahepáticos como almacén o fuente de energía.

Durante la etapa de ayuno o ejercicio, la glucosa y los triacilglicéridos se liberan del tejido adiposo hacia la circulación y son metabolizados por tejidos extrahepáticos. El tejido adiposo responde a señales hormonales (p.e. glucagón y adrenalina), libera ácidos no esterificados y glicerol, vía hidrólisis de triacilglicéridos. Los ácidos grasos provenientes del tejido adiposo son oxidados en las mitocondrias hepáticas a través de la beta oxidación y generan cuerpos cetónicos, los cuales proveen de energía a tejidos extrahepáticos en condiciones de ayuno prolongado.

1.3 Transporte de lípidos (Lipoproteínas)

Los lípidos de los alimentos son emulsificados e hidrolizados en el tracto digestivo por ácidos biliares y lipasas respectivamente en el hígado. Los ácidos grasos de cadena larga y mono acil-glicéridos resultantes son absorbidos a nivel duodenal y viajan por el sistema linfático en forma de quilomicrones. Estos complejos son lipoproteínas en su naturaleza,

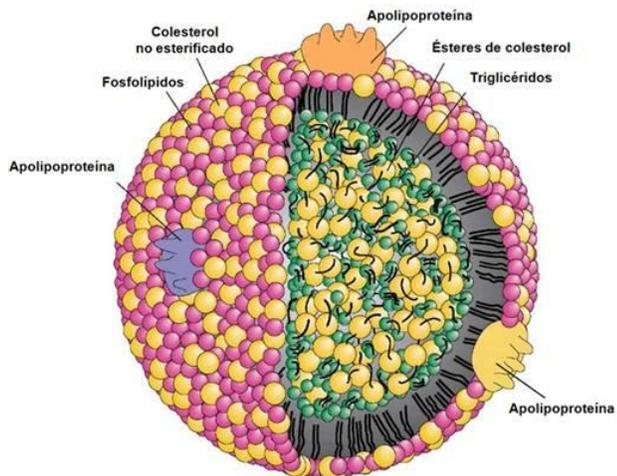


Figura 2. Estructura de las lipoproteínas. La imagen muestra los fosfolípidos, colesterol no esterificado y apolipoproteínas de la capa externa; triacilglicéridos y ésteres de colesterol en el núcleo de una lipoproteína. Imagen tomada y modificada de Nelson y Cox, 2004.

formadas por una parte peptídica (apoproteína) y una parte conjugada (material lipídico). Los quilomicrones entran a la circulación hemática por la vena subclavia y son captados

principalmente por el tejido adiposo y el tejido muscular, en donde descargan la mayor parte de su material lipídico. El tejido adiposo responde a la alimentación como principal órgano de almacenamiento del material graso (como triacilglicéridos), mientras que en el ayuno hidroliza ese material y lo libera a la circulación (como ácidos grasos libres y glicerol). Los remanentes de los quilomicrones son posteriormente captados por el hígado para su procesamiento y transformación. Otros ácidos grasos, de cadena corta o regular, llegan al hígado directamente al ser transportados por la vena porta (Nelson y Cox, 2004). Es en el hígado donde se sintetizan y se ensamblan las lipoproteínas de muy baja densidad y lipoproteínas de baja densidad, y son captadas las lipoproteínas de alta densidad.

Lipoproteínas

Las lipoproteínas, cuya estructura se ilustra en la Figura 2, están compuestas por un centro hidrófobo que contiene colesterol esterificado y triacilglicéridos, rodeado de una capa de lípidos anfipáticos con colesterol libre, diversas clases de fosfolípidos y partículas de naturaleza proteica denominadas apolipoproteínas (Beisiegel, 1998). Las lipoproteínas se clasifican de acuerdo a su coeficiente de flotación (densidad) y al contenido de sus componentes lipídicos (triacilglicéridos, colesterol y fosfolípidos) y de las apolipoproteínas presentes (Tabla 1).

La Figura 3 representa la clasificación de los principales tipos de lipoproteínas, la cual se basa en el valor de densidad obtenido por ultracentrifugación analítica; los quilomicrones, las lipoproteínas de muy baja densidad, las lipoproteínas de baja densidad, lipoproteínas de densidad intermedia y las lipoproteínas de alta densidad (Jairam y cols. 2012). El reconocimiento de estas lipoproteínas por receptores específicos

localizados en diversos tejidos que participan en el metabolismo de lípidos se realiza por las apolipoproteínas, cuya función es principal está en el transporte de material lipídico entre los diversos tejidos y órganos (Tabla 2).

Tabla 1. Principales componentes lípidicos y apolipoproteínas que forman parte de la estructura de las apolipoproteínas.

Lipoproteínas	Componentes lípidicos	Apolipoproteínas
QM	Triacilglicéridos	A-I, A-II, A-IV, B-48, C-I, C-II, C-III, E
Remanentes de QM	Triacilglicéridos, fosfolípidos y colesterol	B-48, E
VLDL	Triacilglicéridos	B-100, C-I, C-II, C-III
IDL	Triacilglicéridos y colesterol	B-100, E
LDL	Colesterol	B-100
HDL	Fosfolípidos y colesterol	A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III, D, E

QM, quilomicrones; rQM, remanentes de quilomicrones; VLDL, lipoproteína de muy baja densidad; IDL, lipoproteínas de intermedia densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; HDL, lipoproteína de alta densidad.

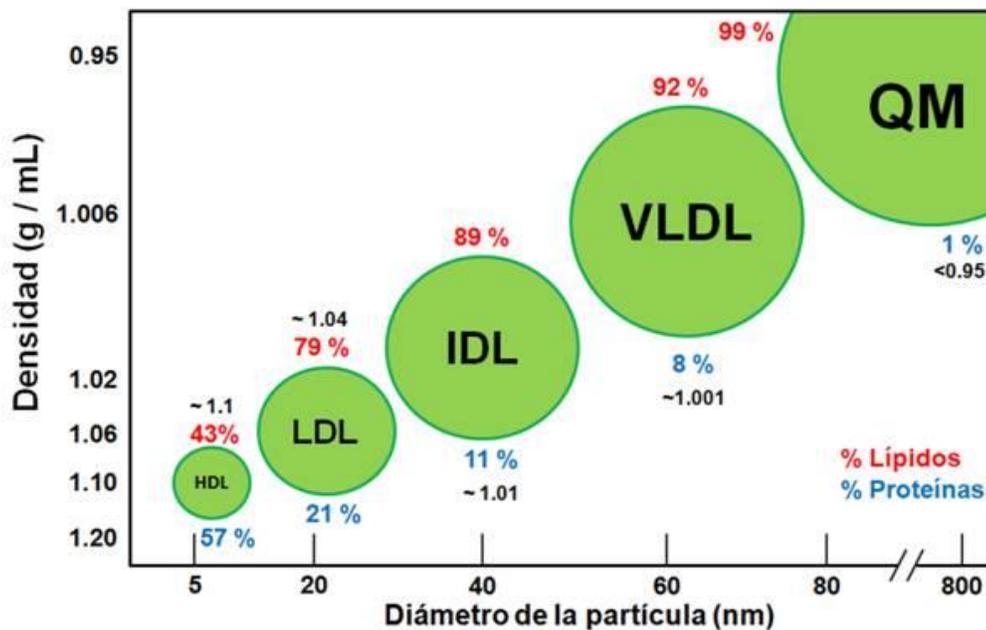


Figura 3 Clasificación de las lipoproteínas. La clasificación de las lipoproteínas se basa en su densidad. El rango de densidad se representa en porcentaje de lípidos (rojo) y proteínas (azul). Imagen tomada y modificada de Jairam y cols. 2012.

El manejo y metabolismo de las lipoproteínas (Figura 4) inicia en los enterocitos, donde se sintetizan los quilomicrones, éstos pasan a través de los vasos capilares donde

dejan parte de su contenido en tejidos como las glándulas mamarias, tejido adiposo, músculo y otros. Los quilomicrones se convierten en remanentes de quilomicrones por medio de la acción de la lipoproteína lipasa, enzima encargada de hidrolizar los triacilglicéridos de los quilomicrones y las lipoproteínas de muy baja densidad; posteriormente los quilomicrones se degradan en el hígado. Las lipoproteínas de muy baja densidad se sintetizan en el hígado, su síntesis esta regulada por la formación de la apolipoproteína B100 y por los triacilglicéridos sintetizados en el hígado. Las lipoproteínas de muy baja densidad son hidrolizadas en los tejidos extrahepáticos, y también dejan parte de su contenido allí. Las lipoproteínas de muy baja densidad toman dos rutas: 1) se convierten en remanentes y se degradan en el hígado, 2) por catabolismo se convierten en lipoproteínas de baja densidad. Las lipoproteínas de baja densidad, son lipoproteínas ricas en colesterol libre y esterificado y son principalmente captadas a nivel hepático. Los receptores localizados en las diversas células (apolipoproteína E), permiten que las lipoproteínas de baja densidad se internalicen e inicien su catabolismo celular, liberando colesterol libre que inhibe a la hidroximetilglutaril CoA reductasa, enzima clave para la síntesis de colesterol (Beisiegel, 1998).

Las lipoproteínas de alta densidad se generan por: 1) secreción de lipoproteínas de alta densidad nacientes de origen hepático e intestinal, 2) lipólisis de las lipoproteínas de muy baja densidad y quilomicrones. Las lipoproteínas de alta densidad recogen, transportan y esterifican el colesterol a través de la enzima lecitina colesterol aciltransferasa en los tejidos extrahepáticos, y lo conducen al hígado donde se degrada. Este transporte se conoce como “transporte reverso del colesterol”. Los mamíferos disponen de colesterol gracias a 2 vías: la exógena a través de los alimentos y la

endógena en la que se sintetiza colesterol en el hígado por medio de una compleja vía que incluye a la enzima reguladora hidroximetilglutaril CoA reductasa (Beisiegel, 1998).

Tabla 2. Principales apolipoproteínas y sus funciones.

Apolipoproteínas	Principales funciones
Apo A-I	Activa a la enzima LCAT.
Apo A-II	Segunda apolipoproteína más abundante en la HDL.
Apo A-IV	Activador de la enzima LPL y LCAT.
Apo B-48	Proteína estructural de los quilomicrones.
Apo B-100	Componente primario para la formación de las LDL y proteína estructural de las VLDL
Apo C-I	Activa a la enzima LCAT.
Apo C-III	Activa a la enzima LPL en los capilares.
Apo D	Componente de las HDL.
Apo E	Interacciona con el receptor LDL y receptor de Apo E.

Apo, apolipoproteínas; VLDL, lipoproteína de muy baja densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; HDL, lipoproteína de alta densidad; LCAT, Lecitin Colesterol Acil Transferasa; LPL, Lipoproteína lipasa.

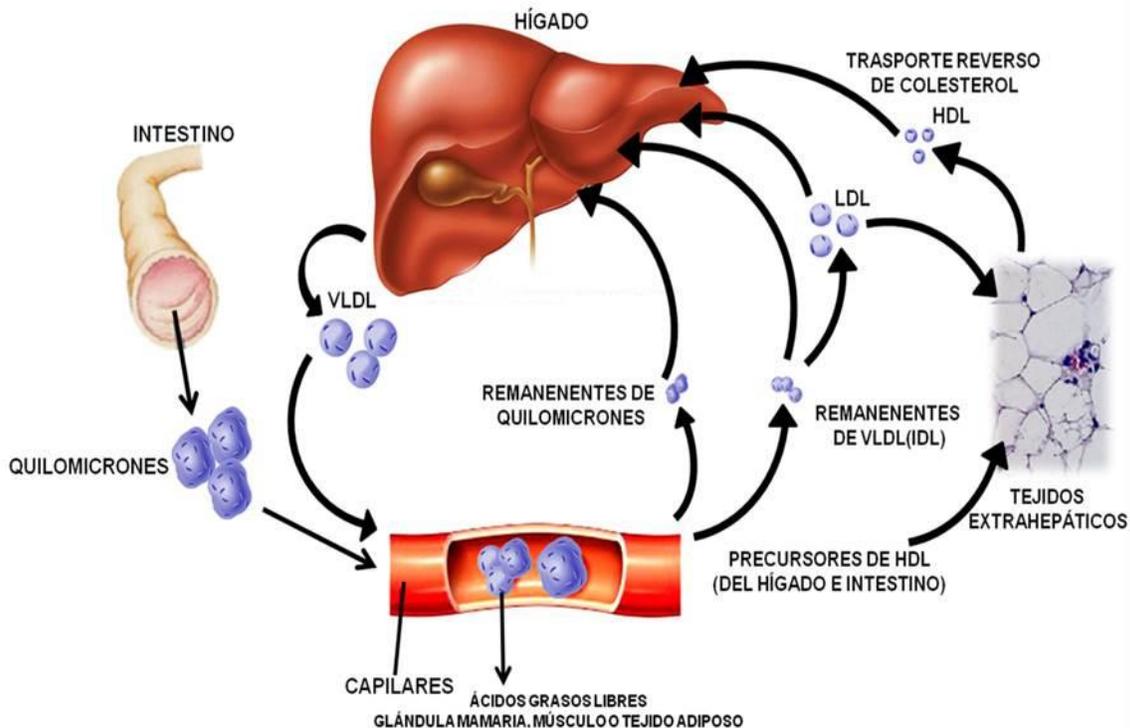


Figura 4. Metabolismo de lipoproteínas. La síntesis y degradación de las lipoproteínas es la interacción de tejidos como el intestino, hígado adiposo y músculo. Imagen tomada y modificada de Nelson y Lehninger, 2004. VLDL, lipoproteína de muy baja densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; HDL, lipoproteína de alta densidad.

1.4 Eje maestro regulador de metabolismo de lípidos

El eje que regula el metabolismo de lípidos responde al estado energético del organismo. Ya sea en condiciones de ayuno, restricción calórica o ejercicio. Los factores que forman este eje son: la cinasa dependiente de AMP, el coactivador de PPAR γ 1 α , la enzima sirtuina 1 y el receptor activado por proliferadores de peroxisomas α .

1.4.1 Cinasa dependiente de AMP (AMPK)

La cinasa dependiente de AMP es un heterotrímero formado por una subunidad catalítica α y dos subunidades regulatorias β y γ (Carling, 2004). Cuando la relación AMP/ATP aumenta, el AMP semiactiva a la cinasa dependiente de cinasa dependiente de AMP α , es necesario la fosforilación en la treonina 172 de la cinasa dependiente de AMP α para cambiar a un estado de actividad máxima (Figura 5). Una vez activada la cinasa dependiente de AMP α , promueve la producción de ATP por el incremento en la actividad o expresión de proteínas involucradas en el catabolismo (Kyriakis, 2003).

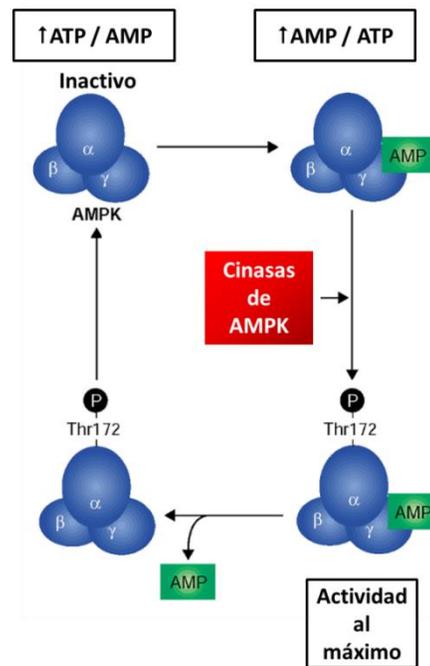


Figura 5. Estructura y activación de AMPK. La enzima AMPK se activa cuando la relación de AMP/ATP se incrementa y llega a su máxima fosforilación. La AMPK vuelve a su estado inactivo cuando la relación ATP/AMP incrementa. Modificado de Kyriakis, 2003. Cinasa dependiente de AMP (AMPK).

La cinasa dependiente de AMP α tiene un papel central en la adaptación metabólica en respuesta a estresores nutricionales agudos y crónicos, ejercicio e inhibe procesos anabólicos y glucolíticos.

En el hígado, la cinasa dependiente de AMP se activa por cambios metabólicos posterior a 24 h de ayuno o dietas de restricción calórica. Otros activadores de cinasa dependiente de AMP en el hígado son: los glucocorticoides y la adiponectina, y los inhibidores: la grelina, los endocannabinoides y la resistina (Kola y cols., 2005 y Yamauchi y cols., 2002).

La adiponectina activa a la cinasa dependiente de AMP α en el hígado durante el ayuno, e inactiva las enzimas involucradas en la síntesis de lípidos: fosforila a la enzima acetil CoA carboxilasa, enzima limitante de la síntesis de ácidos grasos elevando la oxidación de ácidos grasos, reduciendo la lipogénesis y la gluconeogénesis (Yamauchi y cols., 2002 y Velasco cols., 1997). A su vez inhibe a la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa, enzima limitante de la síntesis del colesterol.

La fosforilación de acetil CoA carboxilasa por la cinasa dependiente de AMP α presenta ritmicidad circadiana en hígado de roedores, lo que está asociado a los tiempos de alimentación (Davies cols., 1992). El vínculo de cinasa dependiente de AMP α con los ritmos circadianos se ha reportado de manera más específica en hígado de roedores, con la localización nuclear y actividad rítmica de cinasa dependiente de AMP α , que correlaciona a la inversa con los niveles de criptocromo en núcleo. La fosforilación en criptocromo 1 por cinasa dependiente de AMP α permite la transducción de señales de nutrientes a los relojes circadianos en órganos periféricos. Además, la falta de cinasa

dependiente de AMP α se ha asociado a alteraciones en el reloj molecular de los órganos periféricos (Lamia y cols., 2009).

1.4.2 Sirtuina 1 (Sirt1)

La sirtuina 1 es una enzima nuclear, que cataliza la deacetilación en los residuos de lisina dependiente de NAD⁺ a través del cual se genera nicotinamida y O-

acetil-ADP ribosa (Landry Y cols., 2000 y Tanner y cols.,

2000). Se ha vinculado a la sirtuina 1 con la deacetilación de histonas, además de regular el metabolismo de lípidos y carbohidratos mediante la interacción con múltiples factores transcripcionales, incluyendo a el coactivador de PPAR γ 1 α , la proteína Fox (FoxO1) y el receptor nuclear del hígado (Motta y cols., 2004; Rodgers y cols., 2005; Li y cols., 2007).

La expresión de la sirtuina 1 responde a cambios en las condiciones fisiológicas (ayuno e inanición), mientras que las dietas altas en grasa la reducen. En condiciones de ayuno y restricción calórica (Figura 6), la sirtuina 1 actúa sobre el coactivador de PPAR γ 1 α , la proteína Fox y el receptor activado por proliferadores de peroxisomas α , e inducen la gluconeogénesis, la oxidación de ácidos grasos e inhibe la glucólisis en hígado (Rodgers y cols., 2005).

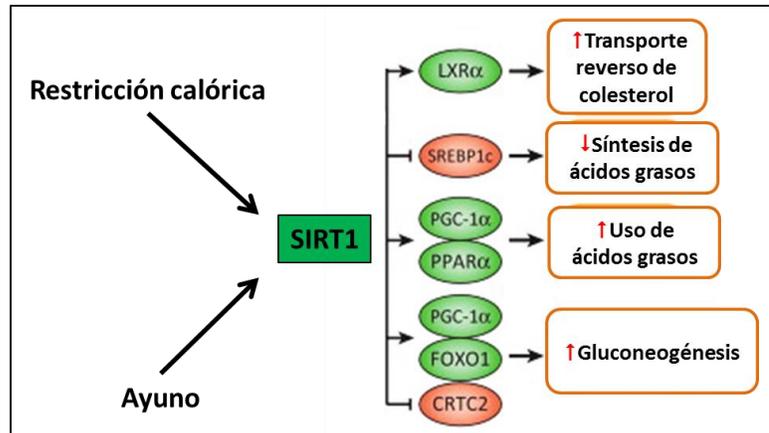


Figura 6. Regulación de Sirtuina 1 en el metabolismo. La Sirtuina 1 actúa sobre factores de transcripción que inducen cambios en el metabolismo de colesterol, lípidos y glucosa en respuesta a la restricción calórica y ayuno.

Asher y colaboradores mostraron que la sirtuina 1 en hígado de ratones es requerida para la transcripción de varios genes reloj incluyendo al *Receptor nuclear translocador de aril hidrocarburos en cerebro y músculo (Bmal1)*, *Period 2 (Per2)*, *Receptor huérfano asociado a RAR- γ (Ror γ)* y *Cry*. La sirtuina 1 se une al dímero Circadian Locomotor Output Cycles Kaput-Receptor nuclear translocador de aril hidrocarburos en cerebro y músculo de una manera circadiana y promueve la deacetilación y degradación de Periodo2; como la sirtuina 1 depende de Nicotinamida adenina dinucleótido en su forma oxidada (NAD⁺) esto demuestra la fuerte relación del metabolismo con el reloj molecular.

1.4.3 Coactivador de PPAR γ 1 α (PGC-1 α)

El coactivador de PPAR γ 1 α , es un coactivador transcripcional que interacciona con una amplia variedad de factores de transcripción que están involucrados en procesos metabólicos: termogénesis, biogénesis mitocondrial, metabolismo de lípidos y glúcidos (Puigserver and Spiegelman, 2003). El coactivador de PPAR γ 1 α , se expresa en tejidos con alta capacidad oxidativa (hígado, corazón, músculo, esquelético, tejido adiposo y cerebro). El aumento en la expresión del coactivador de PPAR γ 1 α induce la oxidación de ácidos grasos, la cetogénesis y la gluconeogénesis en hígado.

Durante el ayuno, el coactivador de PPAR γ 1 α es activado por el glucagón y las catecolaminas vía estimulación del factor de transcripción del elemento de unión de respuesta al cAMP (Herzig y cols., 2001). El coactivador de PPAR γ 1 α , actúa sobre el factor nuclear hepático 4, el receptor a glucocorticoides y la proteína Fox; factores de transcripción que promueven la transcripción de genes gluconeogénicos como la

fosfoenolpiruvato carboxilasa y la glucosa-6-fosfatasa (Yoon y cols., 2001). El ayuno incrementa la expresión de receptor activado por proliferadores de peroxisomas α , quien es coactivado por el coactivador de PPAR γ 1 α induciendo la expresión de genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos en el hígado (Vega y cols., 2000).

Chang y cols., 2007, mostraron que el coactivador de PPAR γ 1 α puede oscilar y se sincroniza a procesos metabólicos en hígado de ratones, este coactivador integra señales del reloj molecular con el metabolismo.

Eje maestro

Cuando hay una disminución en el estado energético del organismo (Figura 7), el incremento en la relación AMP / ATP incrementa y activa a la cinasa dependiente de AMP, la cinasa dependiente de AMP fosforila al coactivador de PPAR γ 1 α ; a la par la relación \uparrow NAD $^{+}$ / NADH aumenta, lo que propicia que el coactivador de PPAR γ 1 α pierda el grupo acetilo por medio de la sirtuina 1. El coactivador de PPAR γ 1 α forma un complejo con diversas proteínas y coactivadores, que actúan sobre el heterodímero receptor a retinoide X-receptor activador por proliferadores de peroxisomas α en respuesta al incremento de los ácidos grasos libres (ligandos de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas). El complejo receptor a retinoide X- receptor activado por proliferadores de peroxisomas α -el coactivador de PPAR γ 1 α se une a elemento de respuesta de proliferación peroxisomal, y el cual induce la transcripción de genes que actúan en la oxidación de ácidos grasos, como la carnitina palmitoil transferasa 1 α .

1.4.4 Carnitina palmitoil transferasa 1 α (CPT-1 α)

La enzima carnitina palmitoil transferasa I, es la enzima central en la oxidación de ácidos grasos de la mitocondria, de la cual existen tres isoformas, una en el hígado (CPT-1_L) conocida también como CPT-1 α , una en el músculo (CPT-1_M) y actualmente se conoce otra isoforma localizada en el cerebro (CPT-1_C) (McGarry y Brown, 1997; Price y cols., 2002).

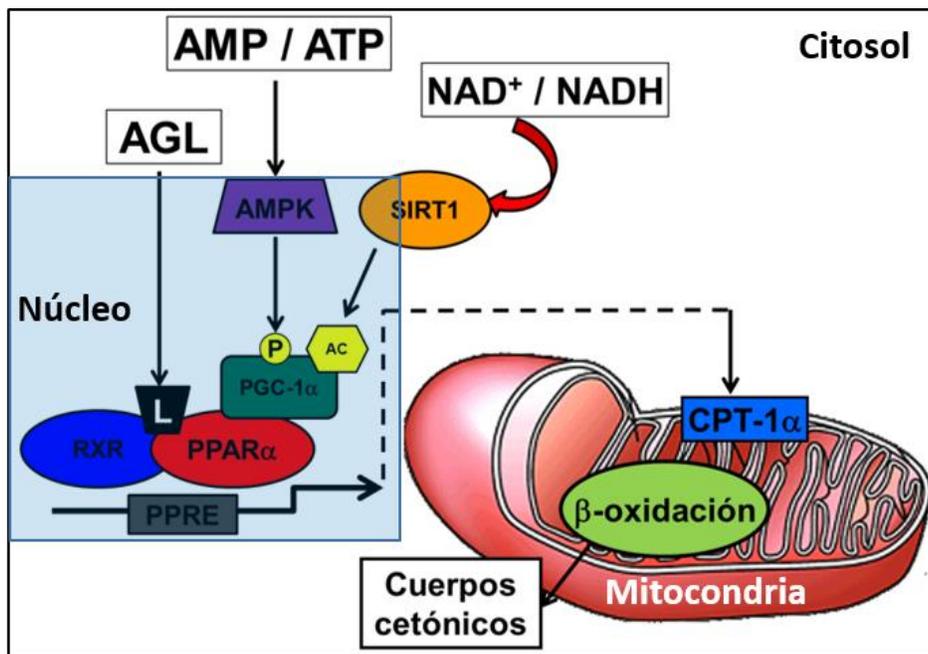


Figura 7. Eje maestro regulador del metabolismo de lípidos. En respuesta al estado energético del organismo (AMP/ATP y NAD⁺/NADH); la cinasa dependiente AMP α , la sirtuina 1, el coactivador PPAR γ y el receptor activado por proliferadores de peroxisomas α , regulan la transcripción de carnitina palmitoil transferasa 1 α , enzima limitante de la oxidación de ácidos grasos mitocondrial.

La carnitina palmitoil transferasa 1 α , está anclada en la membrana externa de la mitocondria y actúa en asociación con la acil-coenzima A sintetasa y la carnitina-acilcarnitina translocasa, en la transferencia de ácidos grasos de cadena larga del citosol a la matriz mitocondrial (Figura 8.), donde ocurre la oxidación de los ácidos grasos (Bieber, 1988). La carnitina palmitoil transferasa 1 α se inhibe por el incremento de malonil

CoA, en respuesta al estado postprandial del organismo y regula la entrada de los ácidos grasos de cadena larga hacia el interior de la mitocondria, la oxidación de ácidos grasos hepática y la cetogénesis (McGarry y Mannaerts, 1977).

1.4.5 Oxidación de ácidos grasos

Durante el proceso de oxidación de ácidos grasos; el ácido graso activado (acil-CoA) pasa por cuatro procesos: 1) oxidación, por la enzima acil CoA deshidrogenasa, 2) hidratación, por la enzima enoil-CoA hidratasa, 3) oxidación, por la enzima hidroxiacil CoA deshidrogenasa y 4) tiólisis, por la enzima tiolasa, dando como producto una molécula de acetil CoA y una de acil CoA con dos carbonos menos (Mannaerts y cols., 1979). La acil CoA entra nuevamente al ciclo de oxidación y el incremento de acetil CoA se metaboliza para la formación de cuerpos cetónicos (acetoacetato y β -hidroxiburitato) (Krebs y cols., 1969).

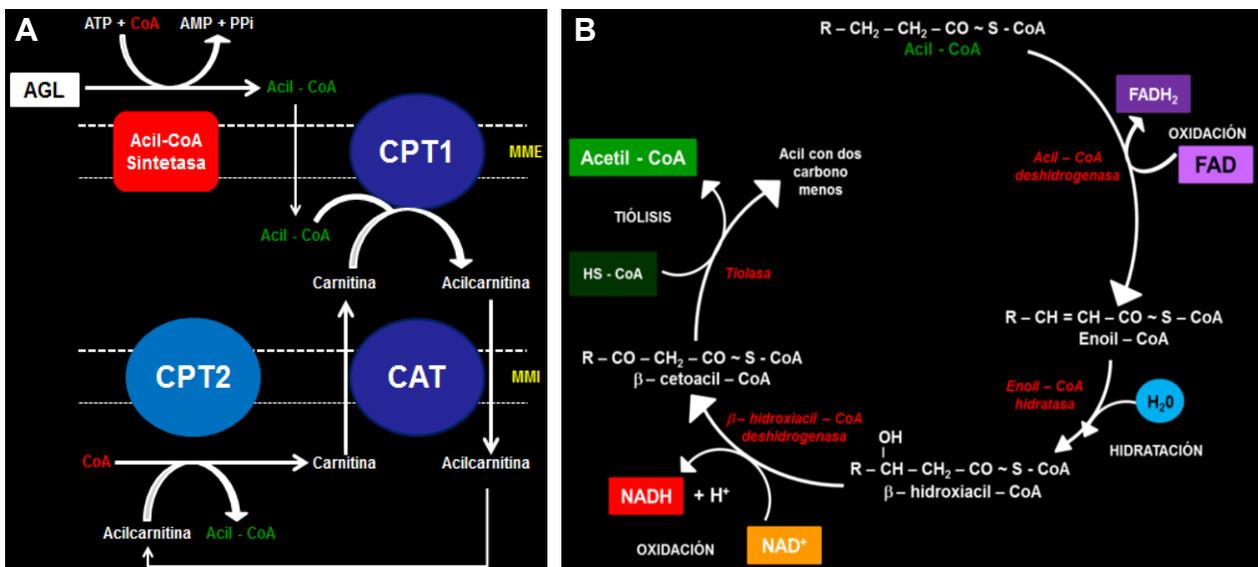


Figura 8. Oxidación de ácidos grasos libres en la mitocondria. A) Los ácidos grasos son activados por la carnitina palmitoil transferasa 1 α . B) Los ácidos grasos activados, pasan por 4 reacciones enzimáticas, para su obtención de acetil CoA.

1.5 Ritmos Biológicos

Un ritmo biológico es la recurrencia de eventos fisiológicos, bioquímicos y moleculares que ocurren a intervalos regulares de tiempo. Los ritmos biológicos son formas en que los organismos se adaptan a su entorno, como consecuencia del movimiento de la tierra sobre su propio eje, alrededor del sol y el movimiento de la luna alrededor de la tierra. Se presentan a lo largo de la escala filogenética (desde bacterias hasta mamíferos) de manera conservada, permitiendo a los organismos predecir y anticipar cambios geofísicos de su medio (Sharma, 2003; Tauber y cols., 2004).

Los periodos de oscilación de los ritmos biológicos van desde los *ms* hasta los ritmos estacionales y se pueden clasificar en tres tipos de acuerdo a su frecuencia (número de ciclos por día): 1) ultradianos, con frecuencia inferior a 20 h (latido cardíaco, secreción de algunas hormonas, 2) los infradianos, con frecuencia mayor a 28 h (ciclo menstrual) y los circadianos, con una frecuencia alrededor de las 24 h, son los más ubicuos en la naturaleza (ciclo sueño-vigilia) (Kokkari y Sothern, 2006). La expresión de los ritmos biológicos depende de relojes endógenos, los cuales confieren al organismo un orden temporal.

La cronobiología es la ciencia encargada del estudio de relojes biológicos, su funcionamiento y sus implicaciones en los sistemas de organización de la vida (Refinetti, 2006). Los ritmos cuya frecuencia es cercana a las 24 h, denominados circadianos, son los mejor estudiados.

1.6 Ritmos Circadianos

Los ritmos circadianos son los ritmos biológicos más estudiados, estos presentan un periodo cercano a las 24 h. En mamíferos los ritmos circadianos son regulados por una estructura par llamada núcleo supraquiasmático, localizada en la región ventral del hipotálamo. El núcleo supraquiasmático se sincroniza a señales externas de luz-oscuridad a través de aferencias directas de la retina, es conocido como reloj endógeno-marcapasos, ya que en condiciones *in vitro* persiste su ritmicidad (Moore y Klein, 1974). Animales con lesiones en el núcleo supraquiasmático, presentan patrones arrítmicos en la actividad locomotriz (Moore y Eichler, 1972; Stephan y Zucker, 1972). El núcleo supraquiasmático, sincroniza tejidos periféricos (conocidos como osciladores periféricos) a través de señales humorales y neuronales.

Las neuronas del núcleo supraquiasmático, presentan una maquinaria del reloj molecular, pero un hallazgo trascendente de los últimos años fue que los genes-reloj también se expresan en otras zonas del cerebro y en órganos periféricos como el hígado, riñón, corazón y otros (Damiola y cols., 2000). La visión actual de la fisiología circadiana es que el organismo está conformado por una población de osciladores, siendo el núcleo supraquiasmático el principal, y que funge como coordinador del resto de los osciladores circadianos, (Damiola y cols., 2000; Reghunandanan y Reghunandanan, 2006).

1.7 Reloj Molecular

Los ritmos circadianos se generan por un mecanismo molecular constituido por genes y proteínas “reloj” que conforman el llamado “reloj molecular”. Este sistema permite

la medición del tiempo en los organismos, así como en cada una de sus células, tejidos y órganos. Su funcionamiento se basa en un conjunto de asas de transcripción-traducción con retroalimentación positiva y negativa. El asa positiva está formada por los genes *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput* y *receptor nuclear translocador de aril hidrocarburos en cerebro y músculo*; y el asa negativa por los genes *Period* y *Criptocromo*, otros genes que participan en la regulación del reloj molecular son el *receptor nuclear subfamilia 1 (Rev-Erb α - γ)*, *Rora* (Ko y Takahashi, 2006). La maquinaria del reloj molecular es susceptible de regulación por varios factores, pero entre los más importantes se encuentra el estado energético celular (Figura 9), el cual está íntimamente ligado a las reacciones anabólicas y catabólicas que forman el entramado metabólico celular (Aguilar-Roblero y Díaz-Muñoz, 2010). En condiciones de ayuno, restricción calórica o ejercicio los niveles en la relación $NAD^+/NADH$ y AMP/ATP incrementan, lo que propicia que factores que responden a la disminución del estado energético del organismo se activen regulando la síntesis de factores de transcripción (PPARs) y coactivadores que participan en el metabolismo de lípidos y glucosa (Huang y cols., 2011).

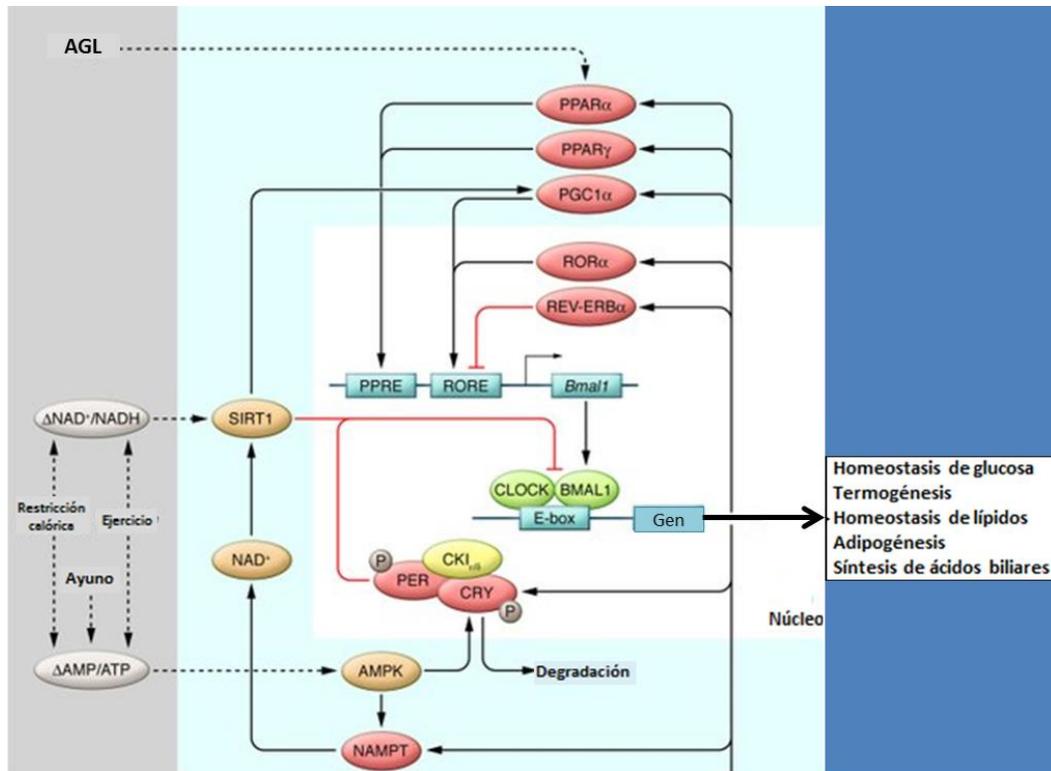


Figura 9. Reloj molecular y metabolismo. El reloj molecular está conformado por asas de retroalimentación positiva (CLOCK:BMAL) y negativa (PER:CRY). Incremento en la relación de $NAD^+/NADH$ y AMP/ATP que incide en la regulación de reloj molecular y factores metabólicos que actúan en el metabolismo de glucosa y lípidos. AGL: ácidos grasos libres; $PPAR_{\alpha-\gamma}$: receptor activado por proliferadores de peroxisomas $\alpha-\gamma$, AMPK: Cinasa dependiente de AMP; $PGC-1\alpha$: Coactivador de $PPAR_{\gamma} 1\alpha$; NAMPT: nicotinamida fosforibosil transferasa. CLOCK: Circadian Locomotor Output Cycles Kaput; BMAL1: receptor nuclear translocador de aril hidrocarburos en cerebro y músculo; PER1: Periodo; CRY: Criptocromo. Modificada de Huang cols., 2011.

1.8 Oscilador Sincronizado por Alimento (OSA)

Se ha postulado la presencia de un oscilador independiente al núcleo supraquiasmático, llamado Oscilador Sincronizado por Alimento, este oscilador se manifiesta cuando se restringe el alimento diariamente por 2 h, por un lapso de 3 semanas durante la fase de luz, conocido como restricción diurna de alimento. Durante la expresión del Oscilador Sincronizado por Alimento, se presenta una conducta conocida como actividad anticipatoria al alimento, la cual se caracteriza por el incremento en la

actividad locomotriz de la rata, esta anticipación se presenta cerca de 2 a 4 h antes del acceso a la comida (Richter, 1922 y Mistlberger, 1994). Esta conducta actúa en paralelo con el incremento de temperatura, secreción de corticosterona, motilidad gastrointestinal, actividad en las enzimas digestivas e incremento en la actividad y presencia de factores de transcripción, enzimas y proteínas asociados a un estado catabólico (Aguilar-Roblero y Díaz-Muñoz, 2010).

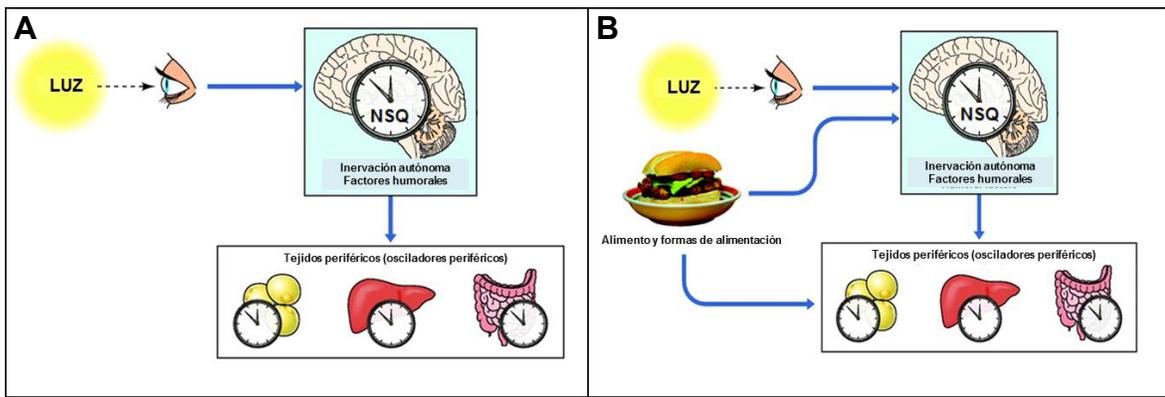


Figura 10. Oscilador Sincronizado por Luz y Oscilador Sincronizado por Alimento. A) El núcleo supraquiasmático sincroniza a tejidos periféricos en respuesta a señales de luz. B) Cuando se restringe el alimento o se imponen formas de alimentación, el alimento actúa como sincronizador de los tejidos periféricos.

Los cambios generados a nivel conductual y fisiológicos por la restricción diurna de alimento, ocurren independiente a los ciclos de luz-oscuridad, en luz constante y en animales con lesión en el núcleo supraquiasmático (Stephan y cols., 1979; Mistlberger, 1994). Por lo tanto, en el sistema circadiano de mamíferos se reconocen dos principales sistemas oscilatorios (Figura 10), uno sincronizado por la luz y otro por el alimento.

Damiola y cols., 2012, mostraron que, en ratones con alimentación durante la fase de luz, la expresión de *Periodo1-2* incrementó, indicando que los genes reloj en hígado se sincronizan a la restricción de alimento durante el día. De manera similar el perfil de

24 h de receptor nuclear translocador de aril hidrocarburos en cerebro y músculo, se modifica en respuesta a la restricción diurna de alimento (Arellanes-Licea y cols., 2014).

La estructura o región donde se localiza el Oscilador Sincronizado por Alimento hasta el momento es incierta. Se ha estudiado la participación de núcleos hipotalámicos que participan en procesos de balance energético, hambre y saciedad; sin embargo, la lesión de estas estructuras no impide la sincronización por alimento (Mistlberger y Rechtschaffen, 1984). Pardini y Kaefer (2006) han planteado que este reloj circadiano está constituido por un sistema distribuido formado por asas de retroalimentación, donde participan varias estructuras del sistema nervioso central, las cuales interaccionan con órganos periféricos de integración metabólica como el hígado, páncreas y estómago los cuales son reguladores del estado de balance energético. Este oscilador se manifiesta únicamente bajo condiciones catabólicas (ayuno y restricción de alimento).

1.9 Metabolismo de lípidos durante la expresión del Oscilador Sincronizado por Alimento

Durante la actividad anticipatoria (antes de la ingesta de alimento), el tejido adiposo presenta un pico de actividad lipolítica que se traduce en un incremento importante (~4 veces) en los niveles de ácidos grasos circulantes en el tiempo previo al acceso al alimento (Rivera-Zavala y cols. 2011). El hígado capta los ácidos grasos y los activa como ligandos para la acción de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas α , y como sustratos energéticos al ser oxidados por peroxisomas y mitocondrias (Rivera-Zavala y cols. 2011).

A pesar del aporte incrementado de ácidos grasos al hígado, no se genera hígado graso, al contrario, durante la expresión del Oscilador Sincronizado por Alimento disminuyen los niveles de triacilglicéridos hepáticos (Díaz-Muñoz y cols. 2010). Este evento se ve acompañado por un incremento importante en los niveles de cuerpos cetónicos circulantes, lo que se interpreta como un aumento en la actividad de la β -oxidación mitocondrial (Díaz-Muñoz y cols. 2000). El hígado muestra un incremento en el potencial protón-motriz de la mitocondria, así como niveles superiores de ATP (Báez-Ruíz y cols. 2005). De manera paradójica, durante la expresión del Oscilador Sincronizado por Alimento no se detecta una disminución del glucógeno hepático, aún en los tiempos previos al acceso al alimento. Lo anterior se interpreta en el sentido que, durante la expresión del Oscilador Sincronizado por Alimento, el metabolismo de lípidos es más activo que el metabolismo de glúcidos, y representa una de las adaptaciones reostáticas que sirven de plataforma para el cambio en la fisiología circadiana en que se basa la expresión del Oscilador Sincronizado por Alimento (Aguilar-Roblero y Díaz-Muñoz, 2009).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante la expresión del Oscilador Sincronizado por Alimento, se presenta una forma distintiva de regulación metabólica en el organismo, y particularmente en el hígado, que promueve adaptaciones de carácter reostático en la dinámica de lípidos y en el funcionamiento mitocondrial. En este contexto, la gran liberación de ácidos grasos por el tejido adiposo promueve un ajuste en el metabolismo del hígado favoreciendo su oxidación, la formación de cuerpos cetónicos y la obtención de energía. De forma paralela, los ácidos grasos actúan también como efectores de factores transcripcionales (por ejemplo, los receptores activados por proliferadores de peroxisomas) que adecuan el metabolismo para optimizar la fisiología hepática en esta condición de manejo prioritario de lípidos que es característica de la expresión del Oscilador Sincronizado por Alimento. Entre las adaptaciones que hemos ya caracterizado en el laboratorio están los cambios que presentan los peroxisomas en su presencia y en su funcionamiento.

Como continuación natural de esta serie de experimentos, en el presente proyecto proponemos complementar los datos ya mencionados con un estudio en donde se explore a profundidad las adaptaciones que presenta la mitocondria durante el manejo incrementado de lípidos que caracteriza la expresión del Oscilador Sincronizado por Alimento. De manera particular caracterizaremos la vía catabólica de los ácidos grasos en este organelo (β -oxidación), así como su regulación cronobiológica a nivel transcripcional y enzimática.

3. HIPÓTESIS

Durante la expresión del Oscilador Sincronizado por Alimento se presentará un aumento en la actividad y presencia de los reguladores de la β -oxidación mitocondrial hepática: la cinasa dependiente de AMP α , la sirtuina 1 y el coactivador de PPAR γ 1 α , así como en la enzima carnitina palmitoil transferasa 1 α antes de la ingesta del alimento.

4. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la regulación de la β -oxidación mitocondrial hepática durante la expresión del Oscilador Sincronizado por Alimento.

1. OBJETIVOS PARTICULARES

Cuantificar el perfil de 24 h de:

1. La presencia del coactivador de PPAR γ 1 α en núcleo.
2. La presencia de la sirtuina 1 en núcleo.
3. La presencia de la cinasa dependiente de AMP α fosforilada en citosol y núcleo.
4. La presencia de carnitina palmitoil transferasa 1 α en mitocondria.
5. La producción de [14 C]CO $_2$ a partir de [14 C]-ácido palmítico.
6. Los niveles en suero de cuerpos cetónicos.
7. Los niveles en hígado de malonil CoA.

2. OBJETIVOS PARTICULARES

Cuantificar el perfil de 24 h en suero de:

1. Colesterol.
2. Triacilglicéridos.

3. Lipoproteínas de alta densidad.
4. Lipoproteínas de baja densidad.
5. Lipoproteínas de muy alta densidad.

5. MÉTODOLÓGÍA

5.1 Animales

Ratas macho de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus*) con peso de 200 ± 20 g fueron mantenidos en ciclos de luz-oscuridad de 12:12 (encendido de la luz a las 08:00 h) y a una temperatura constante (22 ± 1 °C). La intensidad luminosa en la superficie de las cajas fue de 350 lux. Los animales se colocaron en grupos de 4, en cajas de acrílico transparente (40 x 50 x 20 cm) con libre acceso al agua. Todos los experimentos fueron aprobados y llevados de acuerdo a la Guía de Cuidado y Uso Institucional de Animales para Uso Biomédico (UNAM).

5.2 Diseño Experimental

Las ratas se asignaron a cuatro condiciones: 1) Ratas bajo alimentación *ad libitum*, durante tres semanas y sacrificadas cada tres horas hasta cubrir un día completo, iniciando a las 8:00 h; 2) Ratas expuestas a una restricción diurna de alimento con acceso a comida de 12:00 a 14:00 h durante tres semanas y sacrificadas al igual que las *ad libitum*; 3) Ratas ayunadas por 21 horas y 4) Ratas que fueron ayunadas 22 horas y realimentadas por 2 horas. Las ratas ayunadas y realimentadas sirvieron como control de condición para los grupos sacrificados de 11:00 y 14:00 h bajo la condición de restricción diurna de alimento respectivamente (Luna-Moreno y cols., 2012).

5.3 Obtención de suero

La sangre (arterial y venosa) se colectó en tubos vacutainer y centrifugados a 5,000 rpm por 5 minutos.

5.4 Cuantificación de Malonil CoA en hígado

Se homogenizó 1 mg de hígado en 1 mL de buffer de fosfatos (PBST). La muestra se trató de acuerdo a las instrucciones del kit Rat Malonyl Coenzyme A ELISA Kit, (MyBioSource, San Diego, CA). El ensayo emplea la inhibición competitiva de una enzima por inmunoensayo, en una reacción colorimétrica. El rango de detección es de 1.25 ng/mL-20 ng/mL.

5.5 Cuantificación de cuerpos cetónicos en suero

La concentración de cuerpos cetónicos se cuantificó de acuerdo a las instrucciones del kit comercial. La reacción se basa en la reacción de 3-hidroxiacetil-CoA dehidrogenasa, donde el cambio en la absorbancia de NADH, cuantificado a 340 nm es directamente relacionado a las concentraciones de ácido acetoacético y ácido 3-hidroxiacetil-CoA.

5.6 Cuantificación del perfil lipídico

Se utilizó el kit SPINREACT (Lab Center de México S.A. de C.V), para la cuantificación colorimétrica del colesterol, TAG, HDL y VLDL en muestras de suero.

La concentración de VLDL y LDL fue calculada de acuerdo a las instrucciones del kit.

$VLDL = TAG / 5.$

$LDL = \text{Colesterol Total} - HDL - VLDL.$

5.7 Fraccionamiento Subcelular

Las ratas fueron decapitadas y seccionadas para la obtención de hígado (~5 g). El fraccionamiento celular fue llevado a cabo de acuerdo al reporte de Aguilar-Delfín y col, 1996. El hígado se homogenizó en un buffer: sacarosa 225 mM, EGTA 0.3 mM, DTT 1 mM y Tris-HCL 10mM (pH 7.4; 1:10 peso/volumen), suplementado con inhibidores de proteasas (PMSF 0.1 mM, Benzamidina 0.1 mM, Pepstatina A 10 μ l, Aprotina 1 μ g/mL, O-fenantrolina 1 μ g/mL y Leupeptina 10 μ g/mL de) e inhibidores de fosfatasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) El homogenado se centrifugó a 1500 g por 15 min, y el pellet se utilizó para aislar la fracción nuclear. El sobrenadante se centrifugó a 10,000 g por 20 min para sedimentar la fracción mitocondrial. El nuevo sobrenadante se ultracentrifugó a 100,000 g por 60 minutos para obtener la fracción citosólica. La fracción nuclear fue preparada del primer pellet. La cantidad de proteína se determinó por el método Bradford.

5.8 Western Blot

Las fracciones celulares fueron suspendidas en un buffer de dodecilsulfato sódico (SDS) en condiciones reductoras, descritas por Laemmli (electroforesis) e incubadas a 80°C por 1 minuto. Las proteínas fueron separadas en dos diferentes geles de

electroforesis: (sodio-dodecil sulfato-poliacrilamida) al 7.5%. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa y bloqueadas con buffer fosfato salino (PBS) con leche desgrasada al 5% y Tween al 0.1 % por 1 h. Las membranas fueron incubadas toda la noche con anticuerpo primario Anti-AMPK (abcam®) 1:500 en la fracción de citosol, Anti-PGC-1^a (abcam®) 1:000, Anti-Phospho AMPK α (Cell Signaling TECHNOLOGY®) 1:1000, Anti-Sirtuina 1 (abcam®) 1:1000 en la fracción de núcleo, y Anti-CPT1 (Cell Signaling TECHNOLOGY®) 1:1000 en la fracción de mitocondria. Respectivos controles de carga: a) para la fracción de citosol: Anti-Tubulina 1:2000 (abcam®); b) para la fracción de núcleo: Anti-Laminina β 1 (abcam®) 1:1000 y c) para la fracción de mitocondria: Anti-VDAC1/Porina (abcam®) 1:1000. Las membranas fueron lavadas y dejadas en anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina en una concentración 1:5000, por 2 horas. La relación entre la cantidad de los controles de carga y la señal de las proteínas fue utilizada para la presentación de los resultados.

5.9 Inmunohistoquímica

El hígado fue fijado por 1 semana en formalina 10% a 4 °C, se hicieron cambios de formalina cada 2 días. Después de la fijación, el tejido se embebió en parafina y se seccionó en rebanadas de 7-8 μ m. Las muestras se desparafinaron toda la noche a 60°C en un horno. Las rebanadas se hidrataron en una serie de solventes: xilol 100 % (10 min), etanol 100% (5 min), etanol 96% (5 min), etanol 80% (5 min), y agua desionizada (10 min). Para exponer el antígeno se colocó en buffer de citratos 1X (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), en baño María a 80°C por 25 min, seguido de buffer PBS con 1% de leche

sin grasa para bloquear por 1 h. Las secciones fueron lavadas 3 veces por 5 min con 0.5% PBST e incubadas toda la noche a temperatura ambiente con anticuerpo primario Phospho-AMPK (Thr 172) 40H9 (Cell Signaling TECHNOLOGY) a una concentración 1:100. Al siguiente día las secciones fueron lavadas 3 veces por 5 min con 0.5% PBST e incubadas con anticuerpo secundario Alexa Flour® 488 de burro anti conejo IgG (H+L), Thermo Scientific a una concentración 1:400. La cuantificación se hizo en las primeras 5 hileras de células de la zona pericentral y portal periportal. Para definir la zonación, se hizo una relación de la cuantificación de la zona pericentral / periportal: zonación pericentral (relación <1), zonación periportal (relación >1), sin zonación (relación 0.8-1.2). La señal por fluorescencia se visualizó en el programa Image Pro Plus Versión 6.1.

5.10 Oxidación de ácidos grasos U-[¹⁴C]Palmitoil CoA

Se lavó 1.5 g de hígado en solución salina, y se homogenizó en 2 mL de buffer con manitol: D-manitol 300mM, HEPES 10mM y EDTA 1mM, pH 7.2. El homogenado se centrifugó a 3,500 rpm por 10 min, se obtuvo el sobrenadante. En un matraz de 25 mL se colocaron 2 mL de la solución de incubación: D-manitol 13mM, NaCl 40mM, MgCl₂ 5 mM, Tris-HCl 78 mM, K₂HPO₄ 10mM, KCl 2 mM y EDTA 1mM, a la cual se le añadió en fresco: L-carnitina 1mM, ATP 5 mM, NAD 1 mM, ADP 5 mM, FAD 0.06 mM y CoA 100 μM, pH 7.2. A la solución de incubación se le añadieron 2 mg de proteína y 50 μl de la solución madre de ácido palmítico 2 mM y U-[¹⁴C]Palmitoil CoA (6 μCi), el matraz se tapó con un tapón de hule rígido el cual llevó insertado en la parte de en medio un clip que sostuvo en un tubo de 600 μL (canastilla) conteniendo 100 μL de KOH al 10%. Se colocó un

matraz en las mismas condiciones, al cual se le añadió 0.3 mL de ácido perclórico al 70%, para tener la muestra blanco.

El matraz se colocó en baño María a 37° por 90 minutos. Se le añadió 0.3 mL de ácido perclórico al 70% e inmediatamente se colocó en hielo por 60 minutos. El contenido de la canastilla se colocó en viales que contenían 10 mL de tritosol. Los viales se llevaron a un contador de centelleo y cada muestra se leyó por 2 minutos.

5.11 Estadística

Los datos fueron agrupados por condición experimental y tiempo (valor promedio \pm error estándar). Los valores se analizaron por medio de la prueba ANOVA de 2 vías, con un factor por grupo (2 niveles) y un factor de tiempo (8 niveles). Para efectos temporales significativos se utilizó la prueba ANOVA de 1 vía. Las ANOVAs fueron seguidas por una prueba Bonferroni post hoc con una $p < 0.05$. Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa GraphPad Prism (version 5.0 for Windows; GraphPad Software, US). Todas las gráficas fueron realizadas usando el programa Sigma plot (Jandel Scientific, US).

6. RESULTADOS

Oxidación de ácidos grasos

Los cuerpos cetónicos y el CO₂ son productos de la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria del hígado. La carnitina palmitoil transferasa 1 α , es la enzima limitante de lo oxidación de ácidos grasos, la cual puede ser inhibida por el metabolito malonil CoA, en respuesta al estado metabólico (ayuno-alimentación).

En la figura 11A, el grupo *ad libitum* presenta niveles constantes en suero de los cuerpos cetónicos. El grupo restricción diurna de alimento presentó un incremento significativo ~50% antes (11:00 h) y ~30% después (14:00 h) de la ingesta de alimento contra el grupo *ad libitum*. En el periodo de luz el grupo de restricción diurna de alimento presentó un incremento del ~23% contra el periodo de oscuridad. El grupo de condición alimenticia (ayuno de 1 día), presentó un incremento significativo ~4 veces contra el grupo de restricción diurna de alimento (11:00 h). Mientras que el grupo de realimentación de 1 día, presentó una disminución significativa ~35% contra el grupo de restricción diurna de alimento (14:00 h). Como se esperaba el ayuno de 1 día presentó un incremento significativo ~80% contra el grupo realimentación de 1 día.

La figura 1B muestra el perfil diario de la producción de U-[¹⁴C]CO₂ a partir del U-[¹⁴C]Palmitoil-CoA; ambos grupos presentaron un perfil con ritmicidad. El grupo *ad libitum* presentó un pico en la transición luz-oscuridad (20:00 h). Mientras que el grupo de restricción diurna de alimento presentó un avance de fase de más de 3 horas, con dos picos [(17:00 h) y otro pico con menor magnitud (02:00 h), que también se presenta en el

grupo *ad libitum*]. En el grupo de restricción diurna de alimento el periodo de luz presentó un incremento significativo de ~32% contra el periodo de oscuridad. El grupo de condición alimenticia presentó un incremento significativo ~50% contra el grupo de restricción diurna de alimento (11:00 h).

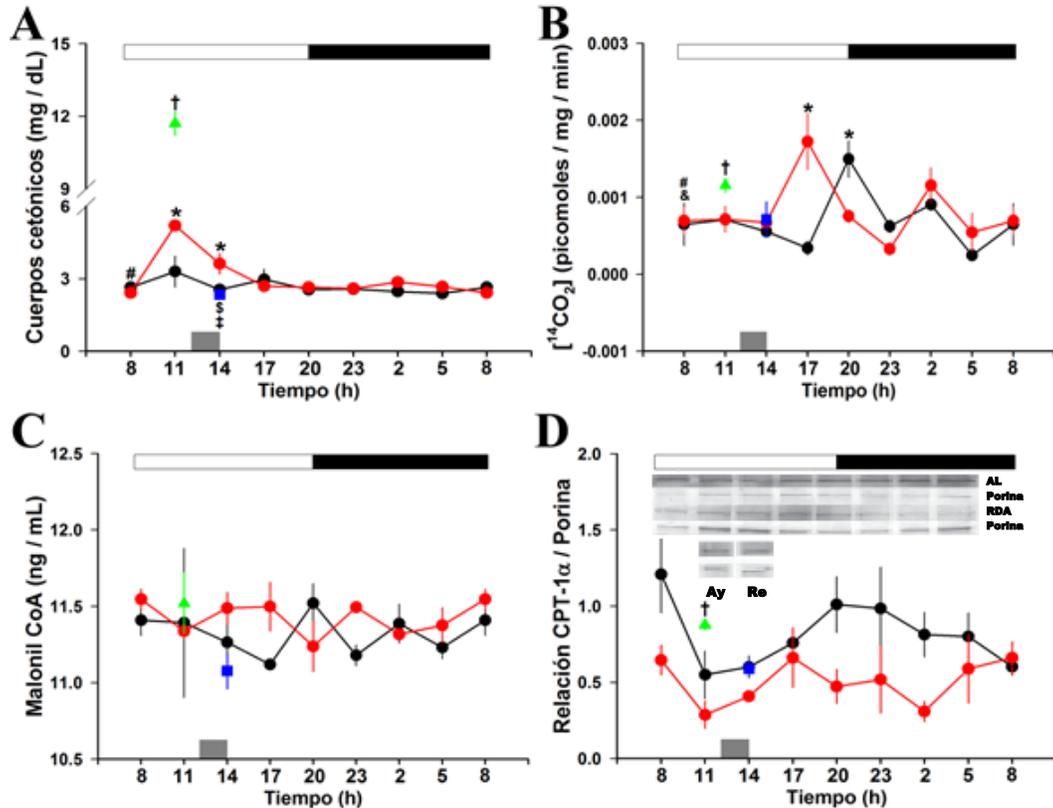


Figura 11. Efecto de la restricción diurna de alimento en las variaciones diarias en la oxidación de ácidos grasos. A) Cuerpos cetónicos, B) U-[¹⁴C]CO₂, Malonil CoA y Carnitina palmitoil transferasa 1α (CPT-1α). Grupo con alimentación *ad libitum* (AL) (●) y grupo con restricción diurna de alimento (RDA) (●). La barra blanca y negra representa el periodo de luz-oscuridad (12 h-12 h), el rectángulo gris en el eje de la “x” indica el tiempo de acceso al alimento (12:00-14:00 h). Diferencia significativa dentro del grupo AL y RDA, & y #p < 0.05 respectivamente, ANOVA de una vía. Puntos de tiempo con diferencia significativa entre el grupo AL y el grupo RDA son marcados con un *p < 0.05, ANOVA de 2 vías, prueba post hoc Bonferroni. Diferencia significativa entre el grupo de ayuno de un día y realimentación de 1 día en comparación con el grupo RDA (11:00 y 14:00 h), son marcados con un † y ‡p < 0.05, Prueba “t” de Student. Diferencia significativa entre el grupo de ayuno de un día y realimentación de 1 día son marcados con un \$, p < 0.05, Prueba “t” de Student. Los datos son la representación de la media ± error estándar de una n de 4 individuos.

La presencia de la carnitina palmitoil transferasa 1α y el metabolito malonil CoA (Figura 1C y 1D) presentaron variaciones constantes en ambos grupos *ad libitum* y restricción diurna de alimento. Sin embargo, en la presencia de carnitina palmitoil

transferasa 1 α , el grupo de condición alimenticia ayuno de 1 día, presentó un incremento significativo sobre los grupos restricción diurna de alimento y realimentación de 1 día de ~38% y 35% respectivamente.

Eje maestro de la oxidación de ácidos grasos

La enzima cinasa dependiente de AMP, es semiactivada por AMP en la subunidad α , y totalmente activada por la fosforilación de la cinasa supresor de tumores. La activación de la cinasa dependiente de AMP, promueve la oxidación de ácidos grasos y el transporte de glucosa al hepatocito.

La figura 12, presenta el perfil de la concentración de proteína de la cinasa dependiente de AMP α en citosol. El grupo *ad libitum*, presenta valores constantes (Figura 12A), mientras que el grupo de restricción diurna de alimento presenta un incremento del ~50% al final de la fase oscura (5:00 h), los grupos control de alimentación ayuno de 1 día y realimentación de 1 día, no muestran diferencias contra el grupo de restricción diurna de alimento (11:00 y 14:00, respectivamente), sin embargo, ambos grupos presentan valores inferiores al valor máximo del grupo de restricción diurna de alimento (5:00 h). La presencia de la cinasa dependiente de AMP α fosforilada en el núcleo (Figura 12B), presenta valores constantes en el grupo *ad libitum*, con un retraso en el grupo de restricción diurna de alimento, y un sutil incremento en la transición luz-oscuridad en ambos grupos. Los grupos de ayuno de 1 día y realimentación de 1 día. presentan una disminución del 93 y 96% contra el grupo de restricción diurna de alimento (11:00 y 14:00, respectivamente). Los grupos de ayuno de 1 día y realimentación de 1 día, presentan valores reducidos en comparación al promedio del grupo *ad libitum*. La relación núcleo/

citósol de pAMPK α presenta valores constantes en el grupo AL y restricción diurna de alimento. El grupo de restricción diurna de alimento presenta un sutil incremento en la transición luz-oscuridad, con una disminución al final de la fase oscura (5:00 h) en respuesta al incremento en la fracción de citósol (5:00 h) (Figura 12C).

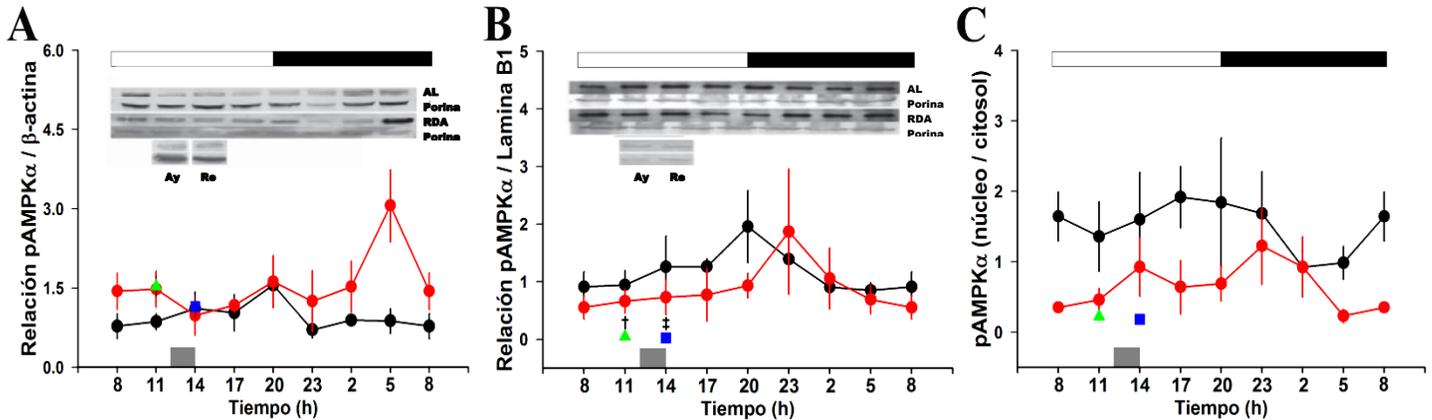


Figura 12. Efecto de la restricción diurna de alimento en las variaciones diarias de la cinasa dependiente de AMP subunidad alfa fosforilada (pAMPK α). A) pAMPK α en citósol, B) pAMPK α en núcleo y C) Relación citósol/núcleo de pAMPK α . Grupo con alimentación *ad libitum* (AL) (●) y grupo con restricción diurna de alimento (RDA) (●). La barra blanca y negra representa el periodo de luz-oscuridad (12 h-12 h), el rectángulo gris en el eje de la “x” indica el tiempo de acceso al alimento (12:00-14:00 h). Diferencia significativa entre el grupo de ayuno de 1 día y realimentación de 1 día en comparación con el grupo RDA (11:00 y 14:00 h), son marcados con un † y ‡ $p < 0.05$, Prueba “t” de Student. Los datos son la representación de la media \pm error estándar de una n de 4 individuos.

Zonación pAMPK

El grupo *ad libitum* (11:00 h) presenta una zonación pericentral (relación 0.37). Por otro lado, el grupo restricción diurna de alimento (14:00 y 5:00 h) presenta una zonación periportal (relación 1.33 y 1.35 respectivamente). En la zona pericentral el grupo de ayuno de 1 día presentó un incremento de ~52 y 47% sobre los grupos restricción diurna de alimento (11:00 h) y realimentación de 1 día respectivamente. El patrón en la zona periportal es muy similar: el grupo de ayuno de 1 día presentó un incremento de ~48 y 50% sobre los grupos restricción diurna de alimento (11:00 h) y realimentación de 1 día

respectivamente. En ambas zonas el grupo de realimentación de 1 día presentó una disminución contra el grupo de restricción diurna de alimento (14:00 h).

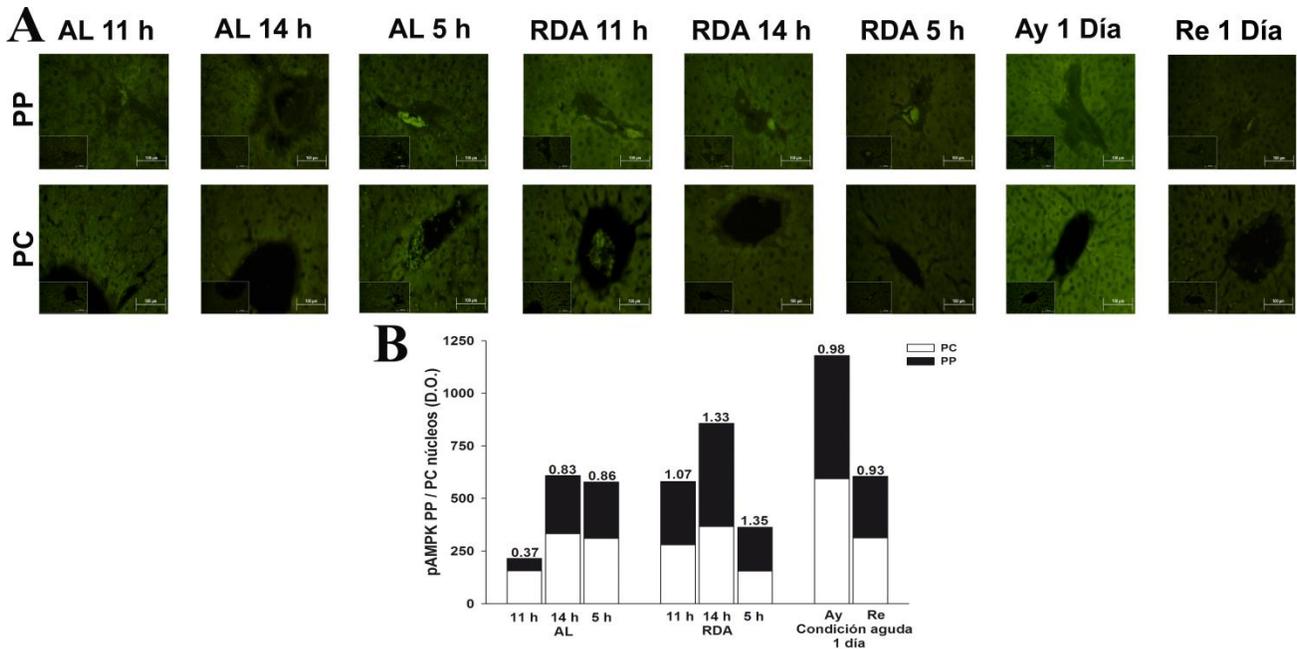


Figura 13. Distribución nuclear hepática de la cinasa dependiente de AMP α fosforilada (pAMPK) en la zona pericentral (PC) y periportal (PP). A) Señal inmunohistoquímica de cinasa dependiente de AMP α fosforilada (pAMPK α) en los grupos *ad libitum* (AL) y restricción diurna de alimento (RDA) (11:00, 14:00 y 5:00 h), grupos de ayuno de 1 día y realimentación de 1 día en la zona PC y PP. Aumento 40X, las escalas son indicadas con las barras blancas. Cada imagen presenta el control representativo de hepatocitos PC y PP sin anticuerpo primario. B) La gráfica de barras muestra la cuantificación de la señal de pAMPK en la zona PP (barras negras) y en la zona PC (barras blancas). La relación entre las señales cuantificadas de los hepatocitos PC y PP se colocó encima de cada barra. La zonación PP/PC se representó PP (> 1), PC (<1) o sin zonación (0.8-1.2). Los datos son la representación de la media de 200 observaciones de núcleos de hepatocitos individuales.

La sirtuina 1 juega un papel fundamental en la respuesta del organismo en condiciones de ayuno o restricción calórica, cuando el estado energético disminuye, actuando sobre factores involucrados en la formación de energía a través de los carbohidratos y lípidos en el hígado.

La figura 14A muestra variaciones constantes del grupo *ad libitum* y restricción diurna de alimento en la presencia de la sirtuina 1 en núcleo en hígado. Sin embargo, los grupos de condición alimenticia ayuno de 1 día y realimentación de 1 día, presentaron un incremento significativo sobre el grupo de restricción diurna de alimento (11:00 y 14:00

h) de ~55% y 35% respectivamente. Como se esperaba el grupo de ayuno de un día presentó un incremento significativo de ~40% sobre el grupo de realimentación de 1 día.

El grupo *ad libitum* presentó variaciones constantes en el perfil diario de la relación núcleo / citosol. Además, el grupo de restricción diurna de alimento ganó ritmicidad, con un pico (05:00 h) al final del periodo de oscuridad sobre el grupo *ad libitum*. Los grupos de condición alimenticia ayuno de un día y realimentación de 1 día presentaron un incremento significativo sobre el grupo de restricción diurna de alimento (11:00 y 14:00 h) de ~55% y 35% respectivamente. El grupo de ayuno de 1 día presentó un incremento significativo de ~40% sobre el grupo de realimentación de 1 día (Figura 3B).

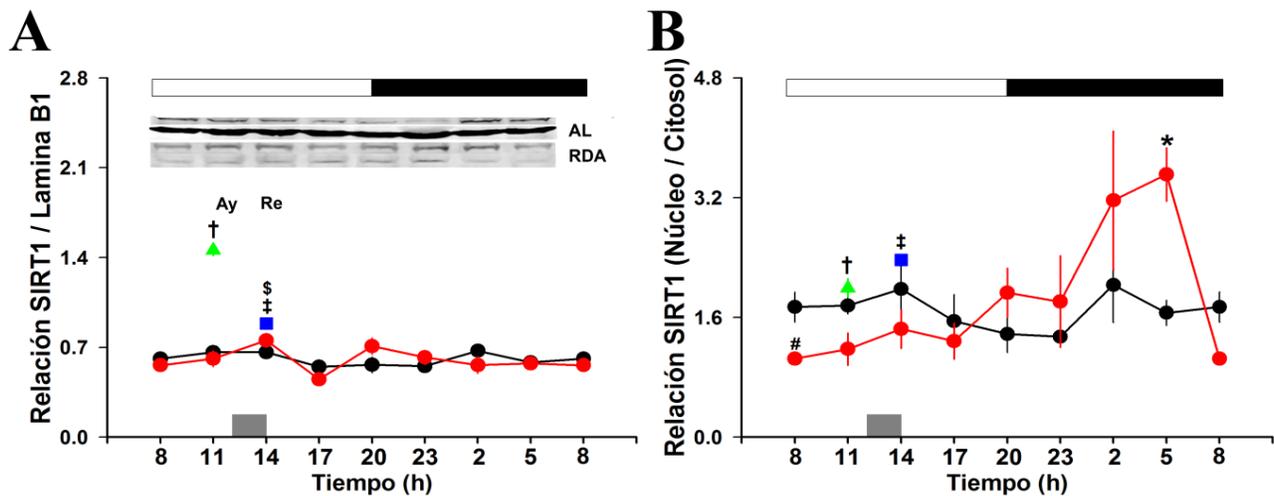


Figura 14. Efecto de la restricción diurna de alimento en las variaciones diarias de sirtuina 1 (SIRT1). A) sirtuina 1 en núcleo, B) Relación de sirtuina 1 núcleo/citosol. Grupo con alimentación *ad libitum* (AL) (●) y grupo con restricción diurna de alimento (RDA) (●). La barra blanca y negra representa el periodo de luz-oscuridad (12 h-12 h), el rectángulo gris en el eje de la “x” indica el tiempo de acceso al alimento (12:00-14:00 h). Diferencia significativa dentro del grupo RDA, #p < 0.05 respectivamente, ANOVA de una vía. Puntos de tiempo con diferencia significativa entre el grupo AL y el grupo RDA son marcados con un *p < 0.05, ANOVA de 2 vías, prueba post hoc Bonferroni. Diferencia significativa entre el grupo de ayuno de 1 día y realimentación de 1 día en comparación con el grupo RDA (11:00 y 14:00 h), son marcados con un † y ‡p < 0.05, Prueba “t” de Student. Diferencia significativa entre el grupo de ayuno de 1 día y realimentación de 1 día son marcados con un \$, p < 0.05, Prueba “t” de Student. Los datos son la representación de la media ± error estándar de una n de 4 individuos.

En la Figura 14A, ambos grupos *ad libitum* y restricción diurna de alimento no presentan variaciones en el perfil de 24 h. La relación núcleo / citosol en el perfil de 24 h

muestra una disminución (~78%) del grupo de restricción diurna de alimento contra el grupo *ad libitum* (Figura 14B). El grupo de restricción diurna de alimento gana ritmicidad (ANOVA 1 vía), con un incremento máximo observado a las 5:00 h.

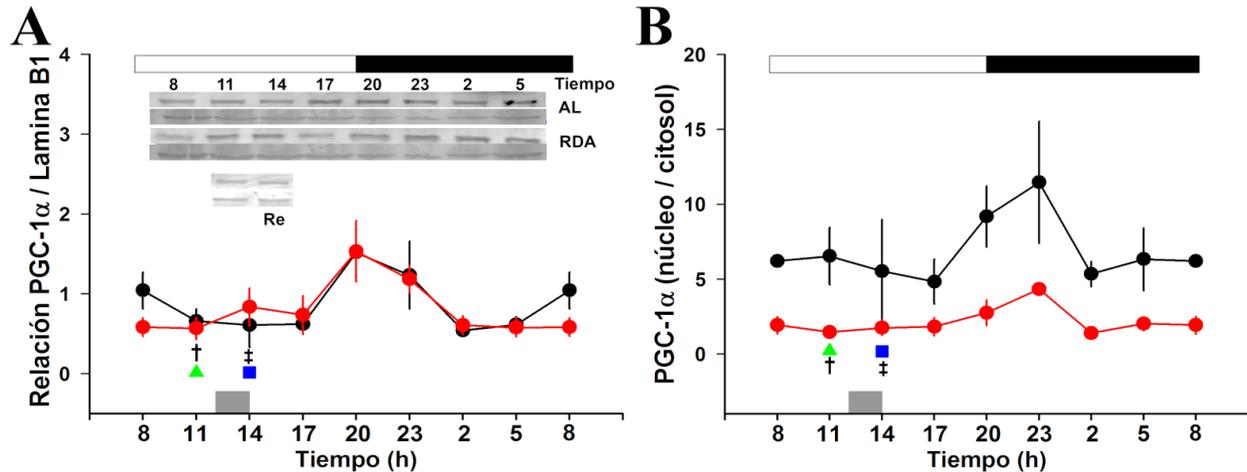


Figura 15. Efecto de la restricción diurna de alimento en las variaciones diarias del coactivador de PPAR γ 1 α (PGC-1 α). A) PGC-1 α en núcleo y C) Relación citosol/núcleo de PGC-1 α . Grupo con alimentación *ad libitum* (AL) (●) y grupo con restricción diurna de alimento (RDA) (●). La barra blanca y negra representa el periodo de luz-oscuridad (12 h-12 h), el rectángulo gris en el eje de la "x" indica el tiempo de acceso al alimento (12:00-14:00 h). Diferencia significativa entre el grupo de ayuno de 1 día y realimentación de 1 día en comparación con el grupo RDA (11:00 y 14:00 h), son marcados con un † y ‡ $p < 0.05$, Prueba "t" de Student. Los datos son la representación de la media \pm error estándar de una n de 4 individuos.

En la figura 15A se presenta el perfil diario del coactivador de PPAR γ 1 α en la fracción de citosol del grupo *ad libitum* y restricción diurna de alimento. Los datos no muestran diferencias entre los dos grupos, pero ambos presentan una tendencia a incrementar los valores en la transición de luz-oscuridad (20:00 h). Datos previamente reportados de nuestro grupo de trabajo (Pérez-Mendoza y cols., 2014), se utilizaron para calcular la distribución de coactivador de PPAR γ 1 α a través de la relación núcleo/citosol (Figura 15B). Ambos grupos de *ad libitum* y restricción diurna de alimento presentan un incremento a las 23:00 h que es significativo en el grupo de restricción diurna de alimento, sin embargo, el valor promedio en el grupo de restricción diurna de alimento, presentó una disminución de ~68% a lo largo del ciclo de 24 h. La disminución en la relación

núcleo/citosol del coactivador de PPAR γ 1 α se explica por la elevación de este factor en la fracción de citosol en el grupo de restricción diurna de alimento.

Perfil lípidico

En la figura 16A se muestran valores constantes en los niveles séricos del colesterol en el perfil de 24 h del grupo *ad libitum*. El grupo de restricción diurna de alimento presentó un incremento significativo ~20% en el periodo de 24 h contra el grupo *ad libitum*. La condición alimenticia no tuvo efecto sobre el colesterol en el suero.

Los niveles en suero de los triacilglicéridos presentaron un perfil rítmico en ambos grupos *ad libitum* y restricción diurna de alimento. Los grupos *ad libitum* y restricción diurna de alimento presentan un valor similar en el promedio, excepto una disminución significativa en el grupo de restricción diurna de alimento a las 11:00 y 02:00 h del ~70 y ~40% respectivamente. El grupo de restricción diurna de alimento (14:00 h) presentó un incremento significativo sobre el grupo de realimentación de 1 día del ~45% (Figura 16B).

En la figura 16C se muestran niveles similares de las lipoproteínas de alta densidad en los grupos *ad libitum* y restricción diurna de alimento. Los niveles del grupo de realimentación de 1 día presentaron una disminución significativa del ~50% en comparación con el grupo de restricción diurna de alimento.

Los niveles séricos de las lipoproteínas de baja densidad (Figura 16D), presentaron un perfil similar al del colesterol. EL perfil de 24 h presentó un incremento significativo del ~50% en comparación con el grupo *ad libitum*. El grupo de restricción diurna de alimento (11:00) presentó un incremento significativo de ~25% contra el grupo de realimentación de 1 día. La condición alimenticia (ayuno de 1 día y realimentación de 1 día) no tuvieron efecto sobre las lipoproteínas de baja densidad.

El perfil de 24 h del índice aterogénico (Figura 16E) presenta valores menores en el grupo de restricción diurna de alimento, con un valle antes de la ingesta de alimento (11:00 h), mientras que el grupo *ad libitum* presenta un incremento a lo largo del día. El grupo de ayuno de 1 día presentó valores similares al máximo valor del grupo *ad libitum*. El grupo de realimentación de 1 día presentó valores similares al grupo de restricción diurna de alimento y menor al grupo de ayuno de un día. La lipasa C (Figura F) presenta un pico a las 23:00 h en el grupo *ad libitum*, con un perfil de 24 h en antifase con el grupo de restricción diurna de alimento (con una meseta durante la fase de luz). El grupo de condición alimenticia (ayuno de 1 día), presenta valores similares al grupo de restricción diurna de alimento (11:00 h), mientras que el grupo de realimentación de 1 día presenta valores superiores al grupo de restricción diurna de alimento (14:00) y ayuno de 1 día.

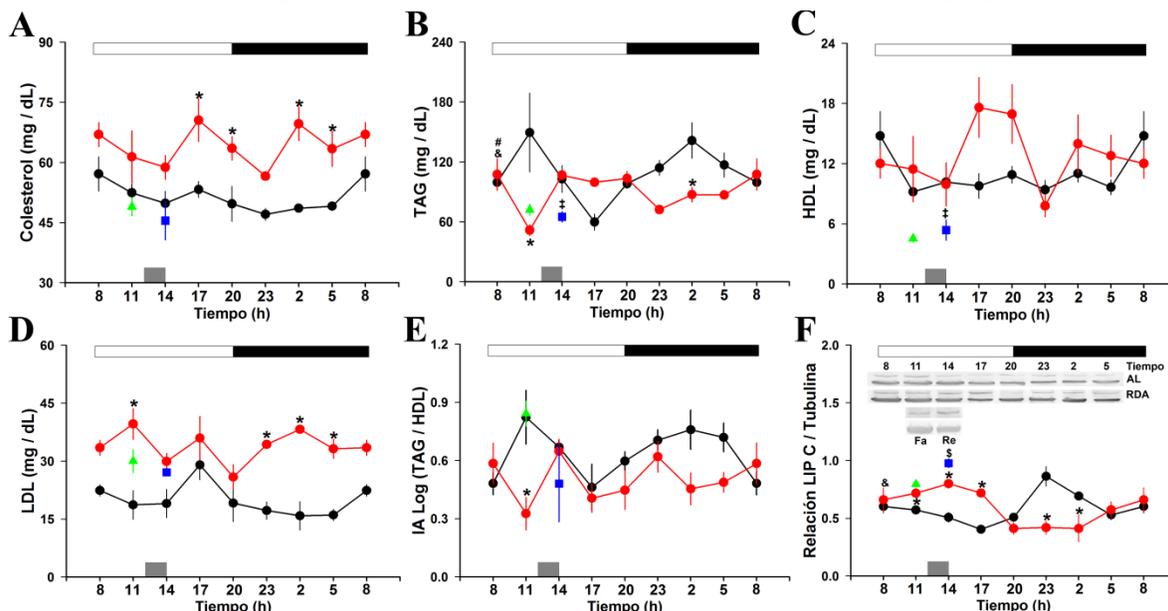


Figura 16. Efecto de la restricción diurna de alimento en las variaciones diarias del perfil lipídico y lipasa C. A) Colesterol, B) Triacilglicéridos (TAG), C) Lipoproteínas de alta densidad (HDL), D) Lipoproteínas de baja densidad (LDL), E) Índice aterogénico (IA) y F) Lipasa C (LIPC). Grupo con alimentación *ad libitum* (AL) (●) y grupo con restricción diurna de alimento (RDA) (●). La barra blanca y negra representa el periodo de luz-oscuridad (12 h-12 h), el rectángulo gris en el eje de la “x” indica el tiempo de acceso al alimento (12:00-14:00 h). Diferencia significativa dentro del grupo AL, & p < 0.05, ANOVA de una vía. Puntos de tiempo con diferencia significativa entre el grupo AL y el grupo restricción diurna de alimento son marcados con un *p < 0.05, ANOVA de 2 vías, prueba post hoc Bonferroni. Diferencia significativa entre el grupo realimentación de 1 día en comparación con el grupo RDA (14:00 h), son marcados con un ‡p < 0.05, Prueba “t” de Student. Diferencia significativa entre el grupo de ayuno de 1 día y realimentación de 1 día son marcados con un \$, p < 0.05, Prueba “t” de Student. Los datos son la representación de la media ± error estándar de una n entre 3 y 8 individuos.

La presencia de la lipasa hepática (Figura 16F) en el grupo *ad libitum* presentó ritmicidad con un pico significativo durante la fase de oscuridad (23:00 h). El patrón de 24 h del grupo de restricción diurna de alimento presentó un incremento significativo durante la fase de luz, en comparación con el grupo *ad libitum*. El grupo de de 1 día presentó un incremento significativo ~20% contra el grupo de restricción diurna de alimento (14:00 h).

Tabla 3. Microarreglos de genes implicados en el metabolismo de lípidos.

Genes implicados en el manejo de lípidos	8:00 h	11:00 h	14:00 h
<i>Apo A-I</i> (HDL)		↑4.8	
<i>Apo A-II</i> (HDL)		↑3.3	
<i>Apo B</i> (QM, VLDL, LDL)		↑6.6	
<i>Apo C-I</i> (QM, VLDL, HDL)		↑4.6	
<i>Apo C-III</i> (QM, VLDL, HDL)		↑4.4	
<i>Apo D</i>			↓2.2
<i>Apo E</i> (receptor LDL)	↓3.8		↓3.2
<i>LPL</i>		↑2.7	↑2.8
<i>Paraoxonasa 1</i>		↑3.6	

Apo, apolipoproteínas; QM, quilomicrones; VLDL, lipoproteína de muy baja densidad; IDL, lipoproteínas de intermedia densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; HDL, lipoproteína de alta densidad. LPL, lipoproteína lipasa.

7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

La restricción de alimento (ayuno y restricción calórica), promueve un estado catabólico. Durante 2 horas de restricción diurna de alimento, el metabolismo y manejo de lípidos por el hígado y el tejido adiposo son modificados: un incremento y llegada de ácidos grasos libres al hígado provenientes del tejido adiposo son asociados con la activación del receptor activado por proliferadores de peroxisomas α (Rivera-Zavala y cols., 2011), el incremento de los cuerpos cetónicos y disminución de los triacilglicéridos sugiere una activación de la oxidación de ácidos grasos en el hígado (Díaz-Muñoz y cols., 2010).

Durante el estado lipolítico, la oxidación de ácidos grasos produce acetyl CoA, esta molécula es convertida en cuerpos cetónicos (acetoacetato y beta-hidroxibutirato) en la mitocondria del hígado (Foster, 2012). Nuestros resultados muestran un incremento de los cuerpos cetónicos en suero en respuesta al estado de ayuno (11:00) en el grupo de restricción diurna de alimento (Escobar y cols., 2000). La síntesis de cuerpos cetónicos responde a la regulación de la relación glucagón/insulina en condiciones de ayuno y restricción calórica (McGarry y Foster, 1977 y Reed, 1984). La acción del glucagón incrementa mientras que la de la insulina disminuye la producción de cuerpos cetónicos. En el grupo de restricción diurna de alimento los niveles en suero de insulina y glucagón presentan una disminución y un incremento antes de la ingesta de alimento respectivamente (Escobar y cols., 2000 y Pérez-Mendoza y cols., 2014). Por otro lado, Fukuda, (1984) muestra que cuando la producción de cuerpos cetónicos incrementa, la liberación de triacilglicéridos disminuye y la producción de lipoproteínas de muy baja

densidad es abolida. Como se esperaba el grupo de ayuno de un día presentó un incremento ~80% contra el grupo de realimentación de 1 día (Figura 1A). La condición alimenticia (ayuno de 1 día), presentó niveles mayores que el grupo de restricción diurna de alimento (11:00 h). Los datos del grupo de restricción diurna de alimento sugieren una adaptación durante las 3 semanas, debido a que los niveles de los cuerpos cetónicos en el grupo de restricción diurna de alimento (11:00 h) no presentan niveles parecidos al grupo de ayuno de 1 día. Los ácidos grasos libres provenientes del tejido adiposo en ayuno o restricción calórica actúan como ligando de una familia de receptores nucleares (receptores activados por proliferadores de peroxisomas) y substrato para la activación de oxidación de ácidos grasos en el hígado. Durante la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria el hígado produce CO₂ (Lodish, 2000). El perfil de 24 h de U-[¹⁴C]-CO₂ en el grupo de restricción diurna de alimento presenta dos picos (17:00 y 2:00 h). Los picos no son coincidentes con los del perfil diario de los niveles en suero de los cuerpos cetónicos, el segundo pico de [¹⁴C]CO₂ (2:00 h) presenta una menor magnitud con respecto al primer pico, lo cual representaría que la producción de acetil CoA no es suficiente para la producción de cuerpos cetónicos (Ontko, 1972).

La regulación de la oxidación de ácidos grasos es determinada por el malonil CoA. Foster, 2012 mostró que el malonil CoA inhibía la oxidación de ácidos grasos y la cetogénesis, el sitio de inhibición es la enzima carnitina palmitoil transferasa 1 α , enzima limitante de la oxidación de ácidos grasos (Zammit, 2008). La presencia carnitina palmitoil transferasa 1 α y los niveles de malonil CoA no presentan diferencias significativas entre los grupos *ad libitum* y la restricción diurna de alimento, el efecto solo se observa en los grupos de condición alimenticia en la presencia de carnitina palmitoil transferasa 1 α . A

pesar no haber diferencias en la presencia de la carnitina palmitoil transferasa 1α , la producción de U-[^{14}C]CO₂ a partir de U-[^{14}C]-Palmitoil CoA en el grupo *ad libitum* en la transición luz-oscuridad en respuesta al estado de ayuno, y en el grupo de restricción diurna de alimento presenta un avance de fase (17:00 h) en respuesta a la producción de cuerpos cetónicos.

Reguladores metabólicos de la Oxidación de ácidos grasos

Las enzimas cinasa dependiente de AMP α , sirtuina 1 y el coactivador de PPAR γ 1α , son reguladores cruciales de la oxidación de ácidos grasos. La AMPK α induce la oxidación de ácidos grasos a través de la inhibición de acetil CoA carboxilasa, mediante la fosforilación de esta enzima (Winder y cols., 1997). La sirtuina 1 interacciona con el receptor activado de proliferadores de peroxisomas α y es requerida para activar al coactivador de PPAR γ 1α para inducir la transcripción de genes que participan en las vías gluconeogénicas y de la oxidación de ácidos grasos (Fulco, 2008).

La deacetilasa sirtuina 1 se activa en respuesta a la relación NAD⁺/NADH, cuando el estado energético del organismo es bajo (ayuno y restricción calórica) (Kwon y Ott, 2008). En el núcleo, la sirtuina 1 actúa sobre diferentes factores de transcripción y coactivadores como la proteína Fox y el coactivador de PPAR γ 1α en la regulación de diversos genes (*glucosa 6 fosfatasa*, *fosfoenolpiruvato carboxilasa* y *carnitina palmitoil transferasa 1 α*). En el hígado la asociación proteína Fox y p53 regula positivamente la transcripción de sirtuina 1. La presencia de sirtuina 1 presenta un incremento antes y después de la ingesta de alimento en ratas con restricción diurna de alimento en la fracción de citosol

(Pérez-Mendoza y cols., 2014); este resultado es relacionado con el incremento de la proteína de fosfoenolpiruvato carboxilasa y glucosa 6 fosfatasa (11:00 h). Sin embargo, la presencia de sirtuina 1 en núcleo no presenta diferencias entre el grupo *ad libitum* y restricción diurna de alimento, pero la relación núcleo/citosol de la sirtuina 1 muestra un incremento al final del periodo de 24 h (5:00 h). Tanno, (2007) mostró que la internalización de sirtuina 1 del citosol al núcleo depende de NAD⁺ en respuesta al estado energético del organismo. La translocación de la sirtuina 1 puede ser asociada a la deacetilación del coactivador de PPAR γ 1 α y la proteína Fox en la regulación de la gluconeogénesis y OAG, en respuesta a esta regulación se presenta un incremento de los cuerpos cetónicos en suero y la presencia de fosfoenolpiruvato carboxilasa en el hígado del grupo de restricción diurna de alimento (Escobar y cols., 2000 y Pérez-Mendoza y cols., 2014).

El coactivador de PPAR γ 1 α regula la transcripción de genes que participan en oxidación de ácidos grasos en la mitocondria, actuando sobre receptor activado por proliferadores de peroxisomas α (Vega y cols., 2000). En condiciones de ayuno, la expresión de *coactivador de PPAR γ 1 α* es inducida sinérgicamente por el glucagón y los glucocorticoides (Yoon y cols., 2001). La restricción diurna de alimento promueve el incremento de estas hormonas en suero es respuesta al ayuno, la acción del glucagón y los glucocorticoides induce la hidrólisis de triacilglicéridos en el tejido adiposo (una disminución ~30%), la regulación de la oxidación de ácidos grasos y la gluconeogénesis (Ahmadian, 2007, Luna-Moreno y cols., 2012 y Pérez-Mendoza y cols., 2014). Los efectos del glucagón y los glucocorticoides, se ve reflejado en el incremento del perfil de 24 h de la presencia del coactivador de PPAR γ 1 α (~40%) en la fracción citosólica en el

grupo de restricción diurna de alimento sobre el grupo *ad libitum* (datos tomados de Pérez-Mendoza y cols., 2014). La presencia de coactivador de PPAR γ 1 α en la fracción nuclear no presentó cambios en el perfil de 24 h de ambos grupos, resultado similar en la presencia de sirtuina 1. Sin embargo, el efecto de PGC-1 α se puede observar en el incremento de la gluconeogénesis y la oxidación de ácidos grasos en condiciones de restricción diurna de alimento (Escobar y cols., 1998 y Pérez-Mendoza y cols., 2014).

Zonación hepática cinasa dependiente de AMP α fosforilada

El hígado presenta una plasticidad metabólica que le permite tener un papel primordial en la homeostasis. El hígado exhibe una zonación metabólica; la fosforilación oxidativa, gluconeogénesis, ureogénesis, cetogénesis y β -oxidación predomina en la zona periportal y la glucólisis y lipogénesis en la zona pericentral (Jungermann, 1988, Jungermann and Kietzmann, 1996). Durante la inanición el hígado es la principal fuente de glucosa y cuerpo cetónicos. En el ayuno, la oxidación de ácidos grasos mitocondrial y cetogénesis predomina en los hepatocitos periportal (Guzmán y cols., 1995). Las hormonas como el glucagón responden al estado nutricional (p.e. ayuno, ejercicio y restricción diurna de alimento) (Berglund, 2010 and Pérez-Mendoza, 2015). Durante el ayuno, el glucagón promueve la activación de la cinasa dependiente de AMP α e incrementa la oxidación de ácidos grasos (Heimberg y cols., 1969). La cinasa dependiente de AMP α es un sensor energético, y es activado en respuesta a estresores metabólicos que disminuyen la energía celular: ejercicio, inanición y restricción calórica. La actividad de la cinasa dependiente de AMP α es elevada y predomina en la zona

periportal, esto es consistente con la presencia del glucagón en esta zona (Witters y cols., 1994). Hawley, 2003 mostró que el cinasa supresor de tumores, STE20-Related Kinase Adaptor α (STRAD α) y MO25 activa a la cinasa dependiente de AMP α , vía fosforilación de la Thr 172 en el hígado, es respuesta al incremento en la relación AMP /ATP (Hawley y cols., 2003; Shaw y cols., 2004; Woods y cols., 2003). La cinasa supresor de tumores tiene un papel clave en la activación de la AMPK α en la regulación del metabolismo de lípidos y glucosa en el hígado (Shaw y cols., 2004).

Perfil Lipídico

El metabolismo de las lipoproteínas responde a los ciclos de ayuno y alimentación. Después de la ingesta de alimentos, la formación y el ensamblaje de las lipoproteínas de muy baja densidad es regulada por la disponibilidad de Apo B100 así como por la formación de triacilglicéridos en el hígado (Fisher and Ginsberg, 2002). Se capturan e hidrolizan las lipoproteínas de muy baja densidad en circulación a lipoproteínas de baja densidad en tejidos extrahepáticos. En el ayuno los triacilglicéridos se hidrolizan en el tejido adiposo para liberar ácidos grasos no insaturados y glicerol en respuesta a hormonas catabólicas (por ejemplo, glucagón, adrenalina y glucocorticoides); finalmente, los ácidos grasos no insaturados se oxidan en el hígado y en los músculos esqueléticos y cardíacos (Rui, 2014). El hígado es el órgano principal que controla la transformación de lipoproteínas de baja densidad. Aproximadamente el 50% de las moléculas de lipoproteínas de baja densidad son degradadas por el hígado en un proceso mediado por Apo B y receptores hepáticos de lipoproteínas de baja densidad (Fisher and Ginsberg,

2002). Los cambios en la expresión de los receptores de lipoproteínas de baja densidad pueden modificar los niveles de lipoproteínas de baja densidad circulante (Goldstein y cols., 1983) y los requisitos de colesterol por diferentes órganos. La apolipoproteína E juega un papel en la remoción del remanente lipoproteínas de baja densidad por el hígado; es necesario para mantener los niveles bajos de colesterol en plasma y participa en el sistema de absorción para lipoproteínas de baja densidad (Kuipers y cols., 1997). Los resultados de los microarreglos (datos no publicados) indican una disminución significativa del ARNm de la *apolipoproteína E* (a las 08:00 y 14:00 h) en hígado del grupo de restricción diurna de alimento (Tabla 3). Por lo tanto, el potencial de disminución de la apolipoproteína E, y la reducción de las lipoproteínas de muy baja densidad en suero podría estar relacionado con los niveles más altos de lipoproteínas de baja densidad (aproximadamente el 50%) y colesterol (aproximadamente el 20%) observado en la condición de restricción diurna de alimento. Una inyección de metilprednisolona en ratas macho Wistar promueve el aumento de las lipoproteínas de baja densidad en el suero (Hazra y cols., 2008); datos obtenidos previamente por nuestro grupo de trabajo presentan un aumento (aproximadamente el 20%) en las 24 horas del perfil de corticosteroides séricos en ratas bajo la restricción diurna de alimento (Luna-Moreno y cols., 2012). La enzima paraoxonasa que previene la formación de lipoproteínas de baja densidad, mostró un aumento (Tabla 2) en el grupo de restricción diurna de alimento (11:00 h). Esto sugiere que el perfil de lipoproteínas cambia en una respuesta coordinada durante el protocolo de restricción diurna de alimento / expresión del Oscilador Sincronizado por Alimento. Aún quedan por explorar las implicaciones, pero es interesante observar una disminución del índice aterógeno en el grupo de restricción diurna de alimento (Figura 16F). Estudios anteriores mostraron una reducción en

circulación y el hígado de los triacilglicéridos, antes del acceso al alimento en el grupo de restricción diurna de alimento (Escobar y cols., 1998 y Díaz-Muñoz y cols., 2010). La lipasa C hidroliza los triacilglicéridos y fosfolípidos, promoviendo la absorción de lipoproteínas de alta densidad por el hígado y convierte las lipoproteínas de densidad intermedia en lipoproteínas de baja densidad (Landin y cols., 1984). En el grupo de restricción diurna de alimento, el aumento de la lipasa C antes de la hora de comer coincide con una reducción de triglicéridos en hígado (Díaz-Muñoz y cols., 2010). Otra enzima, lipoproteína lipasa hidroliza los quilomicrones circulantes y lipoproteínas de muy baja densidad (Murdoch SJ y Breckenridge, 1995). El procesamiento de lipoproteínas de baja densidad por la lipoproteína lipasa da como resultado la formación y colesterol y apolipoproteína E. Resultados de microarreglos (datos no publicados), muestran un aumento de la lipoproteína lipasa en hígado hepático (Tabla 3), antes de la ingesta de alimentos que podría estar asociado con la reducción de suero triacilglicéridos y lipoproteínas de muy baja densidad. Un perfil aterogénico es un factor de riesgo importante para enfermedades coronarias (Dobiášová y Frohlich, 2001). Sin embargo, los cambios en las lipoproteínas séricas no pueden siempre se asocie con dislipidemias. De acuerdo con nuestros resultados, el grupo de restricción diurna de alimento mostró una disminución del índice aterogénico a pesar de los altos niveles de LDL; esto se puede explicar por las bajas concentraciones de triacilglicéridos en el grupo restricción diurna de alimento. Resultado que podría explotar a la restricción diurna de alimento con la capacidad de prevenir enfermedades relacionadas con el metabolismo de lípidos.

En conclusión, los resultados proporcionan evidencia de que la restricción diurna de alimento conduce a la regulación diferencial en el manejo de los lípidos. La relación bidireccional entre un reloj y metabolismo asociada con el Oscilador Sincronizado por alimento pone en relieve la importancia del metabolismo de lípidos (oxidación de ácidos grasos) y sus mecanismos de regulación, así como el perfil de lípidos (colesterol y LDL) en el hígado y los tejidos extrahepáticos (Figura 17).

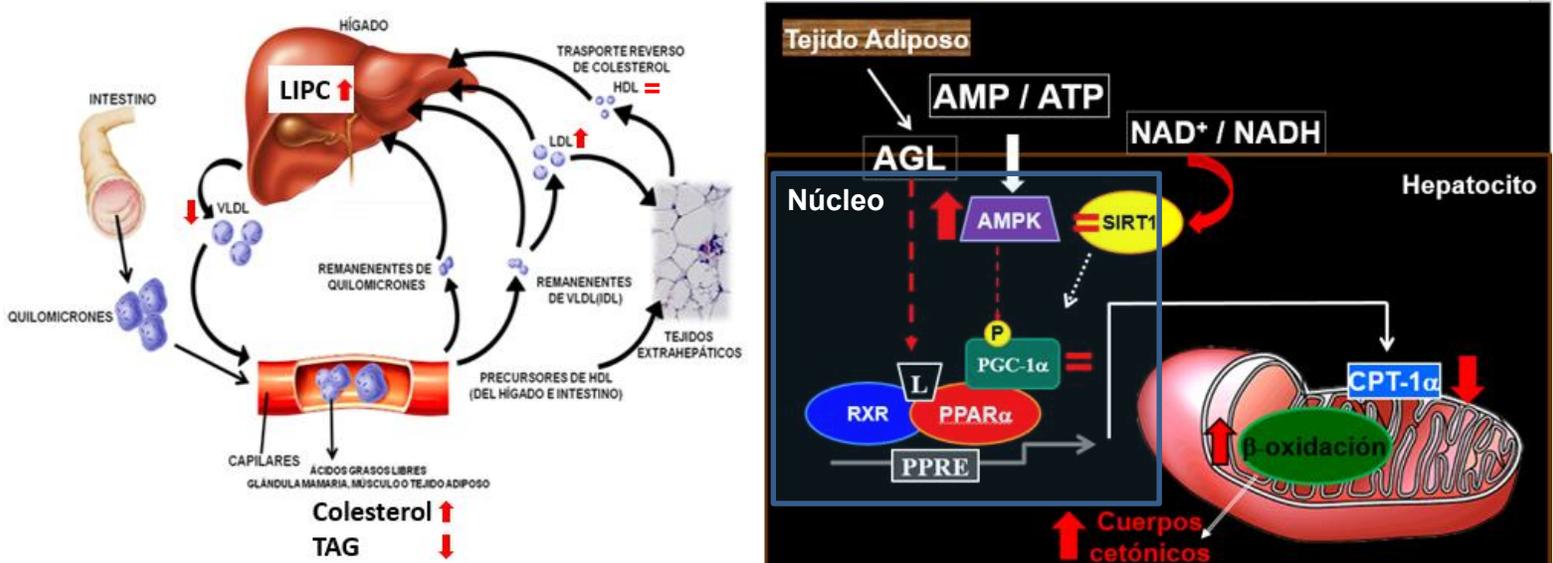


Figura 17. Cambios en los reguladores de la oxidación de ácidos grasos y el metabolismo de lipoproteínas, colesterol y TAG durante la actividad anticipatoria al alimento. A) Metabolismo de lipoproteínas, colesterol y TAG. B) Reguladores de la oxidación de ácidos grasos. Sin cambios (=), incremento (↑), disminución (↓) del grupo de restricción diurna de alimento contra el grupo *ad libitum*.

Se necesitan más estudios para comprender las consecuencias fisiológicas del metabolismo de los lípidos en las adaptaciones reostáticas que participan en los horarios de restricción de alimento y la expresión de la Oscilador Sincronizado por Alimento. La sincronización por alimento, es una herramienta para evidenciar las respuestas metabólicas hepáticas.

Parte de mi tesis doctoral (Introducción: Metabolismo de lipoproteínas y Metabolismo de lípidos durante la expresión del Oscilador Sincronizado por Alimento), fue tomada de un volumen especial de la revista CIENCIA@UAQ dedicado a los ganadores del Premio Alejandrina y reconocido con un premio otorgado por el Estado de Querétaro. El cuerpo de información principal fue publicado en la revista británica: British Journal of Nutrition con título: Daytime restricted feeding modifies the daily regulation of fatty acid β -oxidation and the lipoprotein profile in rats.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar-Delfín I, López-Barrera F y 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, pp. 657–662.
2. Aguilar-Roblero R y Díaz-Muñoz M. (2010). Chronostatic adaptations in the liver to restricted feeding: The FEO as an emergent oscillator. *Sleep and Biological Rhythms*. 8, pp. 9-17.
3. Ahmadian M, Duncan RE, Jaworski K. (2007). Triacylglycerol metabolism in adipose tissue. *Future Lipidology*. 2, pp. 229–237.
4. Arellanes-Licea EC, Báez-Ruiz A, Carranza ME, Luna M, Arámburo C y Díaz-Muñoz M. (2014). Functional adaptations of the ghrelin, growth hormone-IGF-1 axis during daytime food synchronization in rats. *Journal of Neuroendocrinology*. 26, pp. 282-295.
5. Báez-Ruiz A, Escobar C, Aguilar-Roblero R, Vázquez-Martínez O y Díaz-Muñoz M. (2005). Metabolic adaptations of liver mitochondria during restricted feeding schedules. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 289, pp. G1015-G1023.
6. Beisiegel U. (1998). Lipoprotein metabolism. *European Heart Journal*. 19, pp. A20-A23.
7. Berglund ED, Kang L, Lee-Young RS, Hasenour CM, Lusting DG, Lynes SE, Donahue EP, Swift LL, Charron MJ y Wasserman DH. (2010). Glucagon and lipid interactions in the regulation of hepatic AMPK signalling and expresión of PPARalpha

and FGF21 transcripts in vivo. *The American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*. 299, pp. E607-614.

8. Bieber LL. (1988). Carnitine. *Annual Review of Biochemistry*. 57, pp. 261–283.

9. Birchmeier W. (2016). Orchestrating Wnt signaling for metabolic liver zonation. *Nature Cell Biology*. 18, pp. 463-465.

10. Carling D. (2004). The AMP-activated protein kinase cascade—a unifying system for energy control. *Trends in Biochemical Sciences* 29, pp. 18–24.

11. Chang L, Siming L, Tiecheng L, Jimo B y Jiandie DL. (2007). Transcriptional coactivator PGC-1 α integrates the mammalian clock and energy metabolism. *Nature*. 447, pp. 477-481.

12. Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F y Schibler U. (2000). Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Development*. 14, pp. 2950-2961.

13. Davies SP, Carling D, Munday MR y Hardie DG. (1992). Diurnal rhythm of phosphorylation of rat liver acetyl-CoA carboxylase by the AMP-activated protein kinase, demonstrated using freeze-clamping. Effects of high fat diets. *European Journal of Biochemistry*. **203**, pp. 615–623.

14. Díaz-Muñoz M, Vázquez-Martínez O, Aguilar-Roblero R y Escobar C. (2000). Anticipatory changes in liver metabolism and entrainment of insulin, glucagon, and corticosterone in food-restricted rats. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 279, pp. R2048-R2056.

15. Díaz-Muñoz M, Vázquez-Martínez O, Báez-Ruiz A, Martínez-Cabrera G, Soto-Abraham MV, Avila-Casado MC y Larriva-Sahd J. (2010). Daytime food restriction alters liver glycogen, triacylglycerols, and cell size. A histochemical, morphometric, and ultrastructural study. *Comparative Hepatology*. 23, pp. 9-5.
16. Dobiášová M y Frohlich J. (2001). The plasma parameter log (TG/HDL-C) as an atherogenic index: correlation with lipoprotein particle size and esterification rate in apoB lipoprotein-depleted plasma (FER(HDL)). *Clinical Biochemistry*. 34, pp. 583–588.
17. Escobar C, Díaz-Muñoz M, Encinas F y Aguilar-Roblero R. (1998). Persistence of metabolic rhythmicity during fasting and its entrainment by restricted feeding schedules in rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 274, pp. R1309-R1316.
18. Fisher EA y Ginsberg HN. (2002). Complexity in the secretory pathway: the assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 277, pp. 17377–17380.
19. Foster DW. (2012). Malonyl-CoA: the regulator of fatty acid synthesis and oxidation. *Journal of Clinical Investigation*. 122, pp. 1958-1959.
20. Fukuda N y Ontko JA. (1984). Interactions between fatty acid synthesis, oxidation, and esterification in the production of triglyceride-rich lipoproteins by the liver. *The Journal of Lipid Research*. 25, pp. 831-842.
21. Goldstein JL, Basu SK, Brown MS. (1983). Receptor-mediated endocytosis of low-density lipoprotein in cultured cells. *Methods Enzymology*. 98, pp. 241–260.

22. Guzman M, Bijleveld C y Geelen MJ. (1995). Flexibility of zonation of fatty acid oxidation in rat liver. *Biochemical Journal*. 31, pp. 853–860.
23. Hawley SA, Boudeau J, Reid JL, Mustard KJ, Udd L, Makela T, Alessi DR y Hardie DG. (2003). Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD α/β and MO25 α/β are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *Journal of Biological Chemistry*. 2, pp. 28.
24. Hazra A, Pyszczynski NA, DuBois DC. (2008). Modeling of corticosteroid effects on hepatic low-density lipoprotein receptors and plasma lipid dynamics in rats. *Pharmaceutical Research*. 25, pp. 769–780.
25. Heimberg M, Weinstein I & Kohout M. (1969). The effects of glucagon, dibutyryl cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate, and concentration of free fatty acid on hepatic lipid metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*. 244, pp. 5131–5139.
26. Herzig S, Long F, Jhala US, Hedrick S, Quinn R, Bauer A, Rudolph D, Schutz G, Yoon C, Puigserver P, Spiegelman B, y Montminy M. (2001). CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature*. 413, pp. 179–183.
27. Huang W, Ramsey KM, Marcheva B y Bass J. (2011). Circadian Rhythms, sleep, and metabolism. *Journal of Clinical Investigation*. 6, pp. 2133-2141.
28. Jairam V., Uchida, K. y Narayanaswami, V. (2012). Pathophysiology of lipoprotein oxidation. *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*. 13, pp. 45-52.
29. Jungermann K. (1988). Metabolic zonation of liver parenchyma. *Seminars in Liver Disease*. 8, pp. 329–341.

30. Jungermann K y Kietzmann T. (1996). Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annu Rev Nutr.* 16, pp. 179-203.
31. Krebs HA, Wallace G, Hems R y Freedland RA. (1969). Rates of ketone-body formation in the perfused rat liver. *Biochemistry Journal.* 112, pp. 595-600.
32. Ko CH y Takahashi JS. (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human Molecular Genetics.* 15, pp. R271- R277.
33. Kola B, Hubina E, Tucci SA, Kirkham TC, Garcia EA, Mitchell SE y cols. (2005). Cannabinoids and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 280, pp. 25196–25201.
34. Kuipers F, Jong MC, Lin Y. (1997). Impaired secretion of very low density lipoprotein-triglycerides by apolipoprotein E-deficient mouse hepatocytes. *The Journal of Clinical Investigation.* 100, pp. 2915–2922.
35. Kyriakis JM. (2003). At the crossroads: AMP-activated kinase and the LKB1 tumor suppressor link cell proliferation to metabolic regulation. *Journal of Biological Chemistry.* 2, pp. 26.
36. Kwon HS y Ott M. (2008). The ups and downs of SIRT1. *Trends in Biochemical Sciences.* 33, pp. 517–525.
37. Lamia KA, Sachdeva UM, DiTacchio L, Williams EC, Alvarez JG, Egan DF, Vasquez DS, Juguilon, H, Panda S, Shaw RJ, Thompson CB, Evans RM. (2009). AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. *Science.* 326, pp. 437.
38. Landin B, Nilsson A, Twu JS. (1984). A role for hepatic lipase in chylomicron and high density lipoprotein phospholipid metabolism. *The Journal Lipid Research.* 25, pp. 559–563.

39. Landry J, Sutton A, Tafrov ST, Heller RC, Stebbins J, Pillus L y Sternglanz R. (2000). The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 97, pp. 5807–5811.
40. Li X, Zhang S, Blander G, Tse JG, Krieger M, y Guarente L. (2007). SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. *Molecular Cell.* 28, pp. 91–106.
41. Luna-Moreno D, García-Ayala B y 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.* 14, pp. 2002-2013.
42. Mannaerts GP, Debeer LJ, Thomas J y Schepper PJ. (1979). Mitochondrial and peroxisomal fatty acid oxidation in liver homogenates and isolated hepatocytes from control and clofibrate-treated rats. *The Journal of Biological Chemistry.* 254, pp. 4585-4595.
43. McGarry JD, Mannaerts GP y Foster DW. (1977). A possible role for malonyl CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. *The Journal of Clinical Investigation.* 60, pp. 265-270.
44. McGarry JD y Brown NF. (1997). The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. *European Journal of Biochemistry.* 244, pp. 1-14.
45. Mistlberger RE. (1994). Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* 18, pp- 171-195.
46. Moore RY y Eichler VB. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesion in the rat. *Brain Research.* 42, pp. 201-206.

47. Moore RY y Klein DC. (1974). Visual pathways and the central neural control of a circadian rhythm in pineal serotonin n-acetyltransferase activity. *Brain Research*. 71, pp. 17-33.
48. Motta MC, Divecha N, Lemieux M, Kamel C, Chen D, Gu W, Bultsma Y, McBurney M y Guarente L. (2004). Mammalian SIRT represses forkhead transcription factors. *Cell*. 116, pp 551–563.
49. Murdoch SJ & Breckenridge WC. (1995). Influence of lipoprotein lipase and hepatic lipase on the transformation of VLDL and HDL during lipolysis of VLDL. *Atherosclerosis*. 118, pp. 193–212.
50. Ontko JA. (1972). Metabolism of free fatty acids in isolated liver cells. *Journal of Biological Chemistry*. 247, pp. 1788–1800.
51. Pardini L y Kaefer B. (2006). Feeding and circadian clocks. *Reproduction Nutrition Development*. 5, pp. 463-480.
52. Pérez-Mendoza M, Rivera-Zavala JB y Díaz-Muñoz M. (2014). Daytime restricted feeding modifies the daily variations of liver gluconeogenesis: Adaptations in biochemical and endocrine regulators. *Chronobiology International*. 31, pp. 815-828.
53. Price NT, van der Leij FR, Jackson VN, Corstophine CG, Thomson R, Sorensen A y Zammit VA. (2002). A novel brain-expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I. *Genomics*. 80, pp. 433-442.
54. Puigserver P y Spiegelman BM. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocrine Reviews*. 24, pp. 78–90.

55. Reed WD, Baab PJ, Hawkins RL. (1984). The effects of insulin and glucagon on ketone body turnover. *Biochemical Journal*. 15, pp. 439–444
56. Reghunandanan V y Reghunandanan R. (2006). Neurotransmitters of the suprachiasmatic nuclei. *Journal of Circadian Rhythms*. 4, pp. 2.
57. Richter CP. (1922). A behavioristic study of the rat. *Journal of Comparative Psychology*. 1, pp. 1-55.
58. Rivera-Zavala JB, Báez-Ruiz A y 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*. doi: 10.1155/2011/261584.
59. Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi S P, Spiegelman BM y Puigserver, P. (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature*. 434, pp. 113–118.
60. Rui L. (2014). Energy Metabolism in the liver. *Comprehensive Physiology*. 4, pp. 177–197.
61. Sharma VK. (2003). Effect of light intensity on phase and period response curves in the nocturnal field mouse *Mus bodega*. *Chronobiology International*. 20, pp. 223-231.
62. Shaw RJ, Kosmatka M, Bardeesy N, Hurley RL, Witters LA, DePinho RA y Cantley LC. (2004). The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 101, pp. 3329-3335.
63. Stephan FK and Zucker I. (1972). Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 69, pp. 1583-1586.

64. Tanner KG, Landry J, Sternglanz R y Denu JM. (2000). Silent information regulator 2 family of NAD-dependent histone/protein deacetylases generates a unique product, 1-O-acetyl-ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 97, pp. 14178–14182.
65. Tauber E, Last KS, Olive PJ y Kyriacou CP. (2004). Clock gene evolution and functional divergence. *Journal of Biological Rhythms.* 19, pp. 445-458.
66. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S y cols. (2002). Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature Medicine.* 8, pp. 1288–1295.
67. Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelmant G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK, Newgard CB, y Spiegelman BM. (2001). Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature.* 413, pp. 131–138.
68. Vega RB, Huss JM y Kelly DP. (2000). The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Molecular and Cellular Biology.* 20, pp. 1868-76.
69. Velasco G, Geelen MJ y Guzman M. (1997). Control of hepatic fatty acid oxidation by 5'-AMP-activated protein kinase involves a malonyl-CoA-dependent and a malonyl-CoA-independent mechanism. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 337, pp. 169-75.
70. Winder WW, Wilson HA, Hardie DG, Rasmussen BB, Hutber CA, Call GB, Clayton RD, Conley LM. Yoon S y Zhou B. (1985). Phosphorylation of rat muscle acetyl-CoA

carboxylase by AMP- activated protein kinase and protein kinase A. *Journal of Applied Physiology*. 82, pp. 219-225.

71. Witters LA, Gao G, Kemp BE. (1994). Hepatic 5'-AMPactivated protein kinase: zonal distribution and relationship to acetyl-coA carboxylase activity in varying nutritional states. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 308, pp. 413–419.

72. Zammit VA. (2008). Carnitine palmitoyltransferase 1: central to cell function. *IUBMB Life*. 60, pp. 347–354.

Libros

1. Lodish H, Berk A y Zipursky SL. (2000). *Molecular Cell Biology*, 4th ed., pp. 307–313. New York, NY: W. H. Freeman
2. Kokkari W y Sothorn R. (2006). *Introducing biological rhythms*. Springer.
3. Nelson D y Cox ML. (2004). *The Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman Publishing, 4th Edition.
4. Refinetti, R. (2006). *Circadian Physiology*, 2nd Edition. Boca Raton, FL: CRC Press.