



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

**CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA GLUCONEOGENICA DURANTE UN
PROTOCOLO DE AYUNO INTERMITENTE**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA:
SILVIA CRISTINA CERVANTES GUTIÉRREZ

TUTOR:
DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DRA. MARTHA L. CONTRERAS ZENTELLA
INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

DRA. YAZMÍN MACOTELA GUZMÁN
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

JURIQUILLA, QUERÉTARO, DICIEMBRE 2019



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.

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Jurado certificamos que la tesis elaborada por: Silvia Cristina Cervantes Gutiérrez, cuyo título es: “Caracterización de la respuesta gluconeogénica durante un protocolo de ayuno intermitente”, se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dra. Carmen Yolanda Aceves Velasco

Secretario (Tutor)

Mauricio Díaz Muñoz

Vocal

Dr. Roberto Augusto Ferriz Martínez

Suplente

Luis Alberto Tellez Lima

Suplente

Dra. Yazmín Macotela Guzmán

Aprobado por el Comité Académico

Dra. Maricela Luna Muñoz
Coordinadora del Programa de Maestría en Ciencias (Neurobiología)

RESUMEN

El ayuno intermitente es un protocolo nutricional utilizado en con el objetivo de mejorar la salud metabólica, y prevenir obesidad, diabetes, envejecimiento prematuro y enfermedad vascular. El ayuno intermitente consiste en alternar periodos de ayuno de 16 a 48 h, con periodos de alimentación normal en forma recurrente, esto provoca una adaptación fisiológica para lidiar con el reto energético de aumentar la duración y frecuencia del ayuno. Esta adaptación fisiológica mejora de la resiliencia y tolerancia del sistema, incrementando su capacidad para contender con agentes estresores en el futuro, lo que lo hace una alternativa para tratamiento y prevención de enfermedades. A pesar del reciente interés académico en esta maniobra nutricional, existen pocos informes sobre adaptaciones en las redes metabólicas relacionadas por efecto del ayuno intermitente. En este proyecto, se caracterizó en ratas, la adaptación metabólica gluconeogénica en ayuno intermitente de 10 días. Se usaron 5 grupos: acceso libre al alimento o *ad libitum*, ayuno y realimentación de una ocasión (agudo), y ayuno intermitente de 10 días en condición de alimentación y ayuno. Los resultados indicaron que el peso corporal en ayuno intermitente no mostró ninguna ganancia después del tiempo de tratamiento debido a un menor consumo calórico. La relación peso del hígado / peso corporal fue mayor en condiciones de alimentación que en ayuno. No se observaron cambios en el contenido de agua en el tejido hepático. La cuantificación de la enzima gluconeogénica, glucosa-6-fosfatasa, mostró que el ayuno intermitente promovió una reducción más acentuada en el grupo de realimentación. Por el contrario, no se observaron diferencias claras en la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa. En el caso del valor de glucosa circulante es más alto en las ratas con ayuno intermitente sin acceso a alimento, en comparación con el ayuno agudo; en contraste, los niveles de glucógeno fueron más bajos en este grupo experimental. El nivel glucémico y el contenido de glucógeno fueron similares después de la realimentación. En conclusión, nuestros datos mostraron que el ayuno intermitente provocó respuestas metabólicas diferentes en comparación con las respuestas que se muestran en el ciclo agudo de ayuno-realimentación; estos efectos podrían considerarse como adaptaciones horméticas asociadas a los protocolos de ayuno intermitente.

SUMMARY

Intermittent fasting is a nutritional protocol used in order to improve metabolic health, and prevent obesity, diabetes, premature aging, and vascular disease. Intermittent fasting consists of alternating periods of fasting from 16 to 48 hours, with periods of normal feeding on a recurring basis, this causes a physiological adaptation to deal with the energy challenge of increasing the duration and frequency of fasting. This physiological adaptation improves the resilience and tolerance of the system, increasing its ability to contend with stressors in the future, making it an alternative for treatment and prevention of diseases. Despite recent academic interest in this nutritional maneuver, there are few reports on adaptations in related metabolic networks caused by intermittent fasting. In this project, the 10-day intermittent fasting gluconeogenic metabolic adaptation was characterized in rats. Five groups were used: free food access or *ad libitum*, acute fasting and acute refeeding, and intermittent fasting of 10 days fed and fasted. The results indicated that intermittent fasting body weight did not show any gain after treatment time due to lower caloric intake. The ratio of liver weight/ body weight was higher in fed than in fasting conditions. No changes in water content were observed in liver tissue. The quantification of the gluconeogenic enzyme, glucose-6-phosphatase, showed that intermittent fasting promoted a more pronounced reduction in the feedback group. On the contrary, no clear differences were observed in the activity of phosphoenolpyruvate carboxykinase. The circulating glucose value is higher in rats with intermittent fasting without access to food, compared to acute fasting; in contrast, glycogen levels were lower in this experimental group. The glycemic level and glycogen content were similar in fed conditions (acute and intermittent fasting). In conclusion, our data showed that intermittent fasting caused different metabolic responses compared to the responses shown in the acute fasting-feedback cycle. These effects could be considered as hormetic adaptations associated with intermittent fasting protocols.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Fisiología Celular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del Dr. Mauricio Díaz Muñoz. El proyecto fue apoyado por CONACyT (No. 284-557). Silvia Cristina Cervantes Gutiérrez recibió apoyo del CONACyT (No. CVU 857849).

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM.

Al Instituto de Neurobiología de la UNAM.

Al Dr. Mauricio Díaz Muñoz por su guía y enseñanza.

A la Dra. Yazmín Macotela Guzmán y a la Dra. Martha Contreras por sus valiosas aportaciones al trabajo y contribuir en mi formación académica.

Al Dr. Francisco Vázquez Cuevas y a la Dra. Eva Olivia Vázquez Martínez por su apoyo técnico.

A la M. en C. Leonor Casanova Rico y Dra. Nuri Aranda por el apoyo académico y guía para la realización de trámites escolares.

A las secretarías Guadalupe Amador y Carmen Mendoza por el apoyo con respecto a la orientación y trámites realizados.

A la M. en C. Adriana González Gallardo por el apoyo otorgado con los experimentos realizados en la Unidad de Proteogenómica.

A la Dra. Ericka A. de los Ríos Arellano por su apoyo en la unidad de histología.

A M.V.Z. José Martín García Servín, Dra. Alejandra Castilla León y al personal sindicalizado del bioterio.

A la Lic. Ma. Lourdes Lara por su apoyo en las videoconferencias y enlaces en exámenes y clases.

Al personal de la biblioteca.

Al personal sindicalizado del campus, no siempre notamos su trabajo, pero notaríamos si no estuvieran aquí.

A Alexandra Elbakyan.

A los autores citados en este trabajo.

A los canales de YouTube Top Tip Bio, T14IIBm, e Histología Animal por compartir información para el análisis de datos e imágenes, y uso de software.

Índice

Antecedentes.....	11
Justificación.....	17
Hipótesis.....	17
Objetivos.....	17
Objetivo general.....	17
Objetivos específicos.....	17
Métodos.....	18
Animales.....	18
Diseño experimental.....	18
Gravimetría de peso corporal, hígado, y alimento consumido.....	19
Calorimetría indirecta.....	19
Determinación de glucosa.....	20
Toma de muestras.....	20
Determinación de peso seco del hígado.....	20
Western Blot.....	21
Actividad enzimática de PEPCK.....	21
Actividad enzimática de G6Pasa.....	21
Cuantificación de la transcripción de genes <i>pck1</i> y <i>g6pc</i>	22
Análisis estadístico.....	23
Resultados.....	24
Discusión.....	40
Conclusión.....	47
Bibliografía.....	48

Índice de figuras

Figura 1 Glicólisis y gluconeogénesis	14
Figura 2. Diseño experimental del tratamiento de ayuno intermitente.....	19
Figura 3 Respuesta morfométrica del ayuno intermitente	26
Figura 4 Actividad gluconeogénica.....	30
Figura 5 Glucosa y glucógeno	34
Figura 6 Coeficiente respiratorio.....	39

Abreviaturas

Ayuno intermitente (AI)

Coeficiente respiratorio (RQ)

Glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa)

Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK)

Fructosa-1-6-bifosfatasa (F16B)

Fructosa-6-fosfato (F6P)

Ad libitum (AL)

Ayuno agudo (AA)

Realimentación aguda (RA)

Ayuno intermitente en ayuno (AI-ayunado)

Ayuno intermitente en alimentación (AI-alimentado)

Introducción

Los ciclos de alimentación y ayuno suceden todo el tiempo, y los organismos han desarrollado mecanismos para contender con demandas metabólicas y mantener la homeostasis durante ambos estados. Estos mecanismos son el resultado de señalización endocrina de dos importantes hormonas: la insulina y el glucagón (Voet et al., 2016).

La señalización de la insulina y glucagón resultan en cambios dinámicos en las redes metabólicas que permiten que estas se “apaguen” o “enciendan”, con el fin de que exista la correcta homeostasis según el estado de alimentación o el ayuno. Estos cambios dinámicos permiten la optimización de los recursos energéticos durante la alimentación o el ayuno; lo que se le conoce como flexibilidad metabólica (Smith et al., 2018).

Cuando el organismo no es capaz de optimizar los recursos energéticos y que ocurran cambios dinámicos en las redes metabólicas, se habla de un estado de *inflexibilidad metabólica*, que resulta en estados patológicos como la resistencia a la insulina, estrés oxidativo, desregulación de lípidos, inflamación de bajo grado, que posteriormente se pueden complicar y causar diabetes tipo 2, obesidad, envejecimiento prematuro, o enfermedad cardiovascular (Nunn et al., 2009; Rohm et al., 2018; van den Brink et al., 2019).

Se sabe que la flexibilidad metabólica puede modificarse por la composición de nutrientes en la dieta, la actividad física, los ritmos circadianos, la frecuencia y duración del periodo de ayuno, por lo que estos parámetros se están usando como estrategias no farmacológicas para aumentar la flexibilidad metabólica durante estados patológicos o prevención durante la salud (Baumeier et al., 2015; Smith et al., 2018).

La producción hepática de glucosa es una vía metabólica importante para mantener la homeostasis durante el ayuno, gracias a ella se mantienen los niveles de glucosa circulante debido a la hidrólisis de glucógeno y gluconeogénesis (Petersen et al., 2017). En nuestro grupo de trabajo se han caracterizado en ratas los cambios transcripcionales, hormonales, nivel de proteína y actividad enzimática en la gluconeogénesis durante un protocolo nutricional que modifica los ritmos circadianos y el comportamiento metabólico de la vía en comparación con condiciones *ad libitum*.

En este proyecto se buscó caracterizar los cambios de la gluconeogénesis en los niveles transcripcional, protéico y actividad enzimática de las proteínas clave de la vía durante un protocolo que usa como variable la frecuencia y duración del periodo de ayuno para modificar la flexibilidad metabólica, alternando periodos de 24 h de alimentación y 24 h de ayuno durante 10 días, a lo que también se le conoce como ayuno intermitente.

Los resultados indican que existe una adaptación en los mecanismos de flexibilidad metabólica, y que la tasa de gluconeogénesis después del ayuno intermitente es menor que en ayuno agudo, a pesar de que los valores de glucosa y glucógeno son mayores que para ayuno agudo.

Antecedentes

Todos los animales alternan periodos de ayuno y alimentación, por lo que es importante mencionar que el ayuno no siempre conlleva una condición hipocalórica, sino una conducta normal de los organismos. El ayuno es definido por Buono y Longo (2018) como la falta de ingesta de alimento y bebidas calóricas por periodos de 12 h a 3 semanas. Ante la falta de la ingesta de alimento, la homeostasis se mantiene a través de recursos energéticos endógenos, y la regulación fisiológica cambiará dependiendo la duración del ayuno para optimizar la activación de vías metabólicas y el uso de sustratos energéticos como el glucógeno o ácidos grasos, con el fin de conservar la homeostasis (Secor y Carey, 2016).

La respuesta fisiológica diferencial está en función de la duración del ayuno, y se puede catalogar en 3 fases. El tiempo que abarca desde que termina la alimentación hasta que se agotan las reservas de glucógeno (de 12 a 16 h) es la fase 1 del ayuno (Kerndt et al., 1982; Secor y Carey, 2016). La homeostasis energética durante este periodo depende de la producción y liberación hepática de glucosa, esto incluye la hidrólisis de glucógeno y la gluconeogénesis (Secor y Carey, 2016; Petersen et al., 2017). Después de que las reservas de glucógeno se acaban, comienza la fase 2 que puede durar hasta 10 días (Kerndt et al., 1982). Durante esta fase se optimiza el uso de sustratos energéticos, al aumentar la tasa de gluconeogénesis, lipólisis y cetogénesis (Secor y Carey, 2016).

Finalmente, la fase 3 del ayuno precede a un estado de inanición, y se caracteriza por el incremento del catabolismo de aminoácidos usados en la gluconeogénesis, y la disminución de la oxidación de lípidos y cuerpos cetónicos (Secor y Carey, 2016).

Los cambios fisiológicos observados durante las fases del ayuno ocurren a través de mensajes endocrinos. Las dos principales hormonas de la alimentación y el ayuno son la insulina y el glucagón, respectivamente; estas tienen una función antagónica y ambas convergen a nivel de regulación transcripcional en enzimas clave para modular la producción hepática de glucosa y mantener la homeostasis (Secor y Carey, 2016; Gastaldelli et al., 2017; Hatting et al., 2017).

La glucosa es la fuente de energía metabólica para las células, a través de su degradación durante la glucólisis. Después de consumir alimento, la insulina se eleva por la alta concentración de glucosa circulante, y da la señal para promover el almacenamiento de energía en forma de glucógeno y triglicéridos, que después serán aprovechados durante el ayuno (Voet et al., 2016).

En el hígado, la insulina bloquea la gluconeogénesis inhibiendo la transcripción de genes de las enzimas gluconeogénicas fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK), fructosa-1,6-bisfosfatasa (F16B), y glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa); y estimula la transcripción de enzimas glucolíticas (Noguchi et al., 2013; Voet et al., 2016; Petersen et al., 2017).

Ahora bien, el glucagón regula las funciones contrarias de la insulina cuando la concentración de glucosa disminuye, lo que provocará un aumento en la tasa de gluconeogénesis e hidrólisis de glucógeno (Secor and Carey, 2016; Goldstein y Hager, 2018). El glucógeno es un recurso energético finito, una vez que se agoten sus reservas, la liberación de glucosa hepática dependerá de la producción *de novo* a partir de sustratos como piruvato, lactato, glicerol, alanina, glutamina u otros aminoácidos e intermediarios del ciclo del ácido cítrico, gracias a la gluconeogénesis (Hatting et al., 2017).

La gluconeogénesis está altamente regulada por diversos mecanismos, que permiten optimizar la tasa y la dirección de las reacciones metabólicas (Noguchi et al., 2013; Petersen et al., 2017) porque en ciclos de ayuno y alimentación, la gluconeogénesis tiene un comportamiento dinámico de supresión y activación respectivamente (Díaz-Muñoz et al., 2010; Noguchi et al., 2013; Secor y Carey, 2016).

Dentro del dinamismo del metabolismo existe la intercomunicación constante en diferentes puntos de las vías, y además, algunos metabolitos pueden ser reguladores alostéricos de enzimas en otras vías (Petersen et al., 2017). En la gluconeogénesis, el aumento de la concentración de los sustratos piruvato y oxoalacetato provenientes del ciclo del ácido cítrico, el glicerol derivado de la lipólisis, y el lactato originado del ciclo de cori favorecerá la dirección para formar glucosa (Petersen et al., 2017).

La activación alostérica de las enzimas gluconeogénicas, e inhibición alostérica de enzimas glucolíticas son formas de asegurar la formación de glucosa en un estado de ayuno. Un ejemplo es el incremento de acetil coenzima A (por una alta tasa oxidación de lípidos) que activa alostericamente la piruvato carboxilasa, aumentando la concentración de oxaloacetato y favoreciendo la gluconeogénesis (Petersen et al., 2017).

Otros mecanismos de regulación de la gluconeogénesis son las modificaciones postraduccionales que regulan a las enzimas de la vía, a través de fosforilaciones o acetilaciones, y por el balance redox (Petersen et al., 2017; Latorre-Muro et al., 2018).

Los puntos de convergencia de la gluconeogénesis con otras vías ocurren con la síntesis de glucógeno con la glucosa-6-fosfato, con la vía de las pentosas fosfato, principalmente con la fructosa-6-fosfato y el gliceraldehído-3-fosfato (G3P), y el metabolismo de lípidos con la acetil coenzima A, el G3P, y el ácido málico que se transforma en piruvato (Kalogiannis et al., 2014).

A pesar de que los sustratos de la gluconeogénesis puedan entrar en varios puntos de la vía, para su estudio conviene marcar el comienzo de la gluconeogénesis con la conversión del piruvato a oxalacetato por carboxilación en la mitocondria, esta reacción es estimulada por altos niveles de acetil-CoA, e inhibida por altos niveles de adenosín difosfato (ADP) y glucosa (Adeva-Andany et al., 2016), como se puede apreciar en la Figura 1. Después, el oxalacetato sale al citoplasma y es descarboxilado, y fosforilado para formar fosfoenolpiruvato por acción de PEPCK (Hatting et al., 2017). Luego de varios pasos de glucólisis reversa, la FBP convierte a la fructosa-1,6-bifosfato en F6P. Enseguida la F6P es transformada a G6P por la enzima fosfoglucoisomerasa. La G6P puede ser desfosforilada por glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa) para formar glucosa libre (Figura 1). (Hatting et al., 2017; Pérez-

Mendoza et al., 2014; Van Schaftingen y Gerin, 2002).

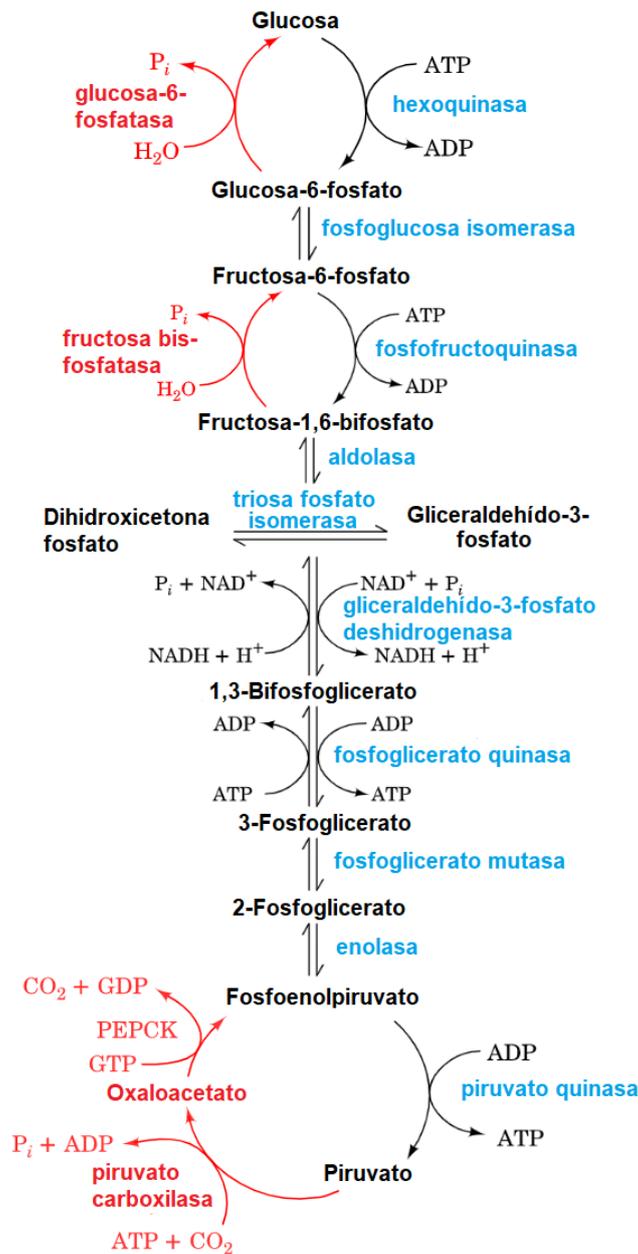


Figura 1 Glicólisis y gluconeogénesis (Voet et al., 2016)

Todas las señales endocrinas y celulares son dinámicas y tienen como objetivo adaptar eficientemente el metabolismo a través de procesos de almacenamiento, tráfico y uso de sustratos (Smith et al., 2018; Tareen et al., 2018). El conjunto de estos procesos y señales, se conocen como flexibilidad metabólica, y permite percibir si hay un exceso calórico o una demanda de energía alta, para que el organismo pueda contender con estos factores ambientales de forma óptima (Smith et al., 2018).

Los procesos de flexibilidad metabólica ocurren en distintos niveles, y en un nivel molecular, el proceso principal es la configuración óptima de las vías metabólicas a partir de la regulación de enzimas clave y factores de transcripción (Smith et al., 2018). La optimización metabólica ocurre por factores ambientales como la composición de nutrientes y cantidad calórica de la dieta, la frecuencia y duración del ayuno, actividad física, e incluso la temperatura ambiental (Baumeier et al., 2015; Smith et al., 2018). La adaptación metabólica puede entenderse desde procesos de adaptación epigenética que alteran la expresión génica para amortiguar los cambios ambientales (Vaiserman, 2011).

La flexibilidad metabólica es un proceso de respuesta rápida, orquestada y dinámica para permitir la homeostasis energética, que cambiará según los factores ambientales que se mencionaron antes (van den Brink et al., 2019); sin embargo, un estilo de vida sedentario y dietas altas en calorías de manera prolongada pueden causar patologías metabólicas que provocan un estado de inflexibilidad metabólica en el sistema, resultando imposible mantener una óptima homeostasis energética, teniendo problemas de estrés oxidativo, desregulación de lípidos, inflamación de bajo grado y resistencia a la insulina (Nunn et al., 2009; van den Brink et al., 2019).

El estado de inflexibilidad metabólica puede prolongarse y culminar en patologías como diabetes tipo 2, obesidad, envejecimiento prematuro (Nunn et al., 2009; van den Brink et al., 2019), o enfermedad cardiovascular (Rohm et al., 2018). Sin embargo, existen intervenciones para aumentar la flexibilidad metabólica, principalmente basadas en cambiar el estilo de vida al aumentar la actividad física con ejercicio, o con estrategias dietéticas que tengan restricción energética (Antoni et al., 2017; Smith et al., 2018; Stockman et al., 2018). Dentro de las estrategias dietéticas restrictivas se encuentran la restricción energética continua, que se basa en tener un menor consumo calórico diariamente; y la restricción energética intermitente (Sundfør et al., 2018) o ayuno intermitente, que significa alternar periodos de ayuno de 16 a 48 h, con periodos de alimentación normal, en forma recurrente (Mattson et al., 2017), y que presenta la ventaja de tener un nivel mayor de adherencia en contraste con la restricción continua (Tinsley y La Bounty, 2015; Wegman et al., 2015).

Para entender los efectos de mejora metabólica que trae consigo el ayuno intermitente conviene hacer uso del concepto de *hormesis*, uno de los diferentes conceptos de homeostasis adaptativa (Davies, 2016). La hormesis se refiere al proceso de

adaptación de un sistema biológico por estrés ambiental en dosis pequeñas, que resultan en la mejora de la resiliencia y tolerancia del sistema, incrementando su capacidad para contender con agentes estresores de mayor grado en el futuro (Calabrese, 2005; Davies, 2016; van den Brink et al., 2019). Dentro de los estresores que pueden desencadenar una respuesta de adaptación hormética se encuentran la radiación, hipoxia, ejercicio, algunas toxinas, y el ayuno intermitente (Calabrese, 2005; Calabrese y Mattson, 2017).

Las evidencias señalan que el ayuno intermitente mejora la salud cardiovascular protegiendo el corazón del daño por infarto agudo al miocardio mediante mecanismos antiapoptóticos y antiinflamatorios (Ahmet et al., 2005), mejorando el perfil de lípidos que son factores de riesgo de enfermedad coronaria (Varady et al., 2013), y disminuyendo la frecuencia cardíaca y la presión arterial (Wan et al., 2003). El ayuno intermitente también previene el daño neuronal al regular a la baja los receptores de glucocorticoides (Lee et al., 2000), disminuye los niveles de diacilglicerol en gotas lipídicas en hígado previniendo la resistencia a la insulina (Baumeier et al., 2015), aumenta la termogénesis en tejido adiposo por la activación de los macrófagos M2 (Kim et al., 2017) y por cambios favorables en la microbiota intestinal (Li et al., 2017); asimismo se ha observado el aumento del periodo de vida de diversos organismos en contraste con alimentación libre (*ad libitum*) (Martin et al., 2006).

Durante el ayuno intermitente, la respuesta hormética coordina mecanismos de resistencia al estrés para reducir el daño oxidativo, inflamación, optimizar la energía metabólica (Báez-Ruiz et al., 2005; Chausse et al., Longo y Mattson, 2014), y contender con estresores en el futuro (Calabrese and Mattson, 2017). A diferencia de un ayuno agudo o de una ocasión, no existe una respuesta de adaptación al ocurrir una sola vez, por lo tanto, es interesante explorar cuál es la respuesta adaptativa en una de las vías metabólicas implicada en mantener la homeostasis de glucosa, durante un protocolo de ayuno intermitente.

Justificación

Actualmente existe interés en el ayuno intermitente como estrategia no farmacológica en la prevención y tratamiento de enfermedades no transmisibles, debido a las evidencias benéficas que este tiene sobre la flexibilidad metabólica.

La desregulación de la gluconeogénesis es central en la patogénesis y complicaciones de la diabetes, y la expresión de genes de enzimas gluconeogénicas está alterada en cáncer para favorecer las vías biosintéticas en lugar de la producción de glucosa.

Por lo anterior, es importante entender las adaptaciones moleculares y celulares, resultantes del proceso hormético, que suceden durante el ayuno intermitente y un estado de salud, en el organismo haciendo énfasis en el hígado, porque son diferentes a la respuesta que se tiene durante un ayuno agudo

Hipótesis

Existirá una respuesta hormética en la actividad de la producción hepática de glucosa por gluconeogénesis durante el ayuno intermitente. La respuesta será diferencial a la presentada en ayuno agudo, debido al componente adaptativo del ayuno intermitente.

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar los cambios en la actividad de la vía gluconeogénesis durante el ayuno intermitente, por medio de mediciones de parámetros de las enzimas marcadoras de la vía.

Objetivos específicos

1. Caracterizar la morfometría corporal y hepática durante el ayuno intermitente.
2. Caracterizar a nivel génico, de traducción y actividad enzimática, las proteínas claves de la gluconeogénesis después del ayuno intermitente.
3. Caracterizar la homeostasis de glucosa y glucógeno después del ayuno intermitente.

Métodos

Animales

Se usaron ratas macho de la cepa Wistar de 9 semanas con peso entre 250-350 g. Permanecieron en ciclo de luz-oscuridad 12:12 h (encendido de luz 08:00 h) y una temperatura constante de $22 \pm 1^\circ \text{C}$, e intensidad luminosa de 350 lux. Los grupos fueron de 4 animales, y se mantuvieron en jaulas de acrílico transparente con acceso libre al agua.

Diseño experimental

Previo al experimento, los animales se mantuvieron en condiciones *ad libitum* y agua de acceso libre. Se aclimataron a las condiciones del laboratorio durante 3 días antes de iniciar el experimento. Los animales se asignaron de manera aleatoria a los grupos con las siguientes condiciones de alimentación durante 10 días:

- 1) **Ad libitum (AL)** [●], que tiene acceso libre al alimento y agua durante 10 días.

Condiciones control o agudas de ayuno y realimentación:

- 2) **Ayuno agudo (AA)** [●], con un ayuno de 24 h.
- 3) **Realimentación aguda (RA)** [●], con un ayuno de 24 h, seguido de una realimentación de 24 h.

Condiciones experimentales de ayuno intermitente:

- 4) **Ayuno intermitente en ayuno (AI-ayunado)** [●], ayuno intermitente de 9 días, después de haberse ayunado.
- 5) **Ayuno intermitente en alimentación (AI-alimentado)** [●], ayuno intermitente de 9 días, después de haberse alimentado.

El ayuno intermitente que se estudió en este trabajo es de día alterno, lo que significa que se alternó 1 día de alimentación libre y 1 día de ayuno, lo que corresponde a la unidad mínima temporal del ayuno intermitente. En la **Figura 2**, se muestra el

diagrama del tratamiento, cada recuadro corresponde a un día, y dos días son un ciclo de ayuno intermitente.

El inicio del ayuno o realimentación durante el tratamiento se hizo a las 12:00 h de todos los días, 4 h después del cambio de luz.



Figura 2 Diseño experimental del tratamiento de ayuno intermitente.

Gravimetría de peso corporal, hígado, y alimento consumido

Durante todos los días del tratamiento se registró el peso corporal de los animales, así como la cantidad de alimento consumido. El registro ocurrió en el momento del inicio del ayuno o realimentación en el tratamiento (12:00 h).

Después del sacrificio de los animales, se obtuvo el hígado para calcular el porcentaje correspondiente al peso corporal

Calorimetría indirecta

La calorimetría indirecta se registró mediante el uso de cajas metabólicas (Oxyletpro Physiocage Panlab Harvard Apparatus), esta medición indica de manera indirecta el sustrato energético que está siendo oxidado; valores de RQ alrededor de 1.0 indican la oxidación de hidratos de carbono y, valores alrededor de 0.7, oxidación de lípidos (Secor y Carey, 2016).

Fue necesario calibrar el equipo con concentraciones conocidas de oxígeno (O₂) y dióxido de carbono (CO₂), después de la calibración, los animales tuvieron un periodo de habituación de 24 horas. Se registró el intercambio gaseoso respiratorio en mL de CO₂ y mL de O₂ de cada animal durante el tratamiento de ayuno intermitente, y se registró el intercambio gaseoso para animales *ad libitum*. Con los datos obtenidos, se calculó el coeficiente respiratorio según la siguiente fórmula:

$$\text{Coeficiente respiratorio (RQ)} = \frac{V \text{ CO}_2 \text{ (mL)}}{V \text{ O}_2 \text{ (mL)}}$$

Determinación de glucosa

La determinación de glucosa con un glucómetro AccuCheck (México), con sangre de la cola obtenida con lanceta. Se realizó la medición después de un ayuno de 4 h en los grupos con alimentación: *ad libitum*, realimentación aguda, y ayuno intermitente alimentado; y en los grupos de ayuno (ayuno agudo y ayuno intermitente ayunado), antes de tener acceso al alimento.

Toma de muestras

Las ratas se sacrificaron mediante decapitación con guillotina. Del hígado, se tomaron 2 g para fraccionamiento celular, ~1 g para determinación de peso seco por triplicado, 1 g para extracción de ácidos nucleicos, y la parte restante se cortó en trozos pequeños de 1-2 mm³ para histología.

El fraccionamiento celular, se llevó a cabo según De Ita Pérez y col., (2010). Se tomaron 2 g de tejido hepático para homogeneizar con 10 mL de amortiguador (0.5 M sacarosa, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 25 mM KCl, pH 7.5 con coctel de inhibidores de proteasas [Sigma P8340]); el homogenado se centrifugó a 3,500 rpm por 15 min, el sobrenadante se centrifugó a 10,000 rpm por 30 min, y el nuevo sobrenadante se centrifugó por tercera vez a 36,000 rpm por 60 min. Al término, se obtuvo la fracción citosólica en el sobrenadante que se usó para determinar presencia y actividad de PEPCK; y el precipitado se suspendió en 500 µL de amortiguador, para obtener la fracción microsomal y determinar presencia y actividad de G6Pasa.

Determinación de peso seco del hígado

Debido a que el peso del hígado puede tener fluctuaciones por la contribución del volumen de sangre a la medición, se decidió determinar el peso seco del hígado para tener información más precisa sobre los cambios de este órgano (Wimmer et al., 1985). Una vez el hígado disectado, se tomaron 3 muestras de cada animal de ~1 g. Las muestras se deshidrataron en una estufa a ~60 °C hasta que alcanzaran un peso constante. Después se hizo el cálculo del peso seco del hígado, ver ecuación a continuación.

$$\text{peso seco (\%)} = 100 \times \frac{\text{peso seco constante}_{\text{muestra}}}{\text{peso total}_{\text{muestra}}}$$

Western Blot

Las fracciones celulares se usaron para medir la presencia de PEPCK (fracción citosólica) y G6Pasa (fracción microsomal) en western blot. 50 µg de proteína (cuantificada por el método de Bradford), se mezclaron con amortiguador 2x Laemmli e incubaron a 90° C por 5 min. La proteína se separó en un gel de poliacrilamida al 10% y transferida a una membrana PVDF e incubó durante la noche con anticuerpos anti-PEPCK policlonal de conejo (Santa Cruz Biotechnology, sc-32879) y anti-G6Pasa-α policlonal de cabra (Santa Cruz Biotechnology, sc-33839) con dilución 1:1000, y anti-β-actina (Sigma A2066) como control de carga, en dilución 1:1,000. Las membranas de PVDF se lavaron e incubaron 2 h con anticuerpo anti-conejo y anti-cabra, respectivamente, y se revelaron con el método quimioluminiscente con peroxidasa de rábano.

Actividad enzimática de PEPCK

La actividad se midió según Opie y Newsholme (1967) con ligeras modificaciones. En volumen total de 200 µL (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 20 mM NaHCO₃, 20 mM fosfoenolpiruvato, 1mM MnCl₂, 0.1 mM NADH, 150 µM GDP, 2 U de malato deshidrogenasa, 100 µL de fracción citosólica) se incubó a 30° C por 3 min en el equipo Varioskan. La reacción inició con la adición simultánea de 2 U de malato deshidrogenasa y 2 µL de fracción citosólica. Se midió la absorbancia a 340 nm cada 1 min (manteniendo la incubación) por 5 min. La actividad de PEPCK se estimó a partir de la diferencia en la caída de las absorbancias entre la muestra experimental y el control (mezcla sin muestra sujeta al mismo procedimiento). La actividad se expresa en mmol sustrato / min mg proteína.

Actividad enzimática de G6Pasa

Se siguió el método empleado por Pérez-Mendoza y col., (2014) con modificaciones. A 50 µg de proteína de fracción microsomal, se adicionaron 200 µL de amortiguador de citrato de sodio (100 mM, pH 6.5), y se incubará por 5 min a 37° C. Después, se añadieron 200 µL de 80 mM G6P pH 6.5 preparada al instante, y se incubó por 15 min a 37° C, posteriormente se agregó 2 mL de ácido tricloroacético al 10%, y se centrifugó

a 7,400 rpm por 5 min. A 1 mL de sobrenadante, se añadió 1 mL de amortiguador de citrato de sodio (100 mM, pH 6.5); para la medición del blanco, se añadió 1 mL de fosfato monobásico 0.5 mM.

Se preparó una curva patrón con concentraciones conocidas de fósforo inorgánico, mediante la hidrólisis ácida del fosfato monobásico con ácido sulfúrico concentrado.

Posteriormente, a las muestras de la curva patrón, la muestra experimental y el blanco, se les añadieron 500 μ L de molibdato de amonio tetrahidratado (2 mM) y 100 μ L de solución ANS (sulfito de sodio 5.7 g, bisulfito de sodio 0.2 g, ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico 1 g) y se centrifugó a 7,400 rpm por 5 min. Se incubó a temperatura ambiente por 30 min en oscuridad. Todas las muestras se leyeron a 660 nm en el espectrofotómetro y se interpoló la concentración de fósforo inorgánico de las muestras experimentales a partir de la curva patrón.

La cantidad de fósforo inorgánico corresponde a los fosfatos libres de la reacción de desfosforilación de la G6Pasa. La actividad se expresa como mmol PO_4 / min \cdot mg proteína.

Cuantificación de la transcripción de genes *pck1* y *g6pc*

Para cuantificar el nivel de expresión génica primero se purificó el ARN total del hígado utilizando un kit Promega con las instrucciones del proveedor (Invitrogen) con TRIzol® que es una solución monofásica de fenol e isotiocinato de guanidina, diseñado para separar fracciones de ADN, ARN y proteínas a partir de muestras de tejido o colonias.

Para verificar la integridad del ARN total se preparó un gel de agarosa 3% (30 mL de tampón trisborato-EDTA 1x con 0.3 gr de agarosa, agregar 2 μ L de colorante de ácidos nucleicos GelRed®), se colocan 2 μ L de muestra con 2 μ L de intercalante, y se corrió la electroforesis durante 30 min a 100 V.

La síntesis de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) se realizó por medio de transcripción reversa (RT) mediante una reacción de transcripción reversa y controlada por la enzima transcriptasa reversa, capaz de convertir el ARNm en una molécula de ADNc.

Se estableció una curva de eficiencia para cada gen con el fin de estimar la concentración (μ g/ μ L) de ADN de doble cadena que se forma durante la qPCR para cada gen dentro de cada muestra. El siguiente paso fue desarrollar la qPCR para cada

gen dentro de cada muestra siguiendo las instrucciones del proveedor (LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I, Roche). Para cada gen en un conjunto de muestras del mismo tejido, se obtiene el valor de punto de cruce o CT, que indica el momento en que la muestra se detecta la generación de ADN de doble cadena a partir de los templados de oligonucleótidos de cada gen y de su codificación del mRNA de la muestra.

Los CT de las muestras se normalizan de acuerdo con el método de doble delta CT ($2^{-\Delta\Delta CT}$) para analizar la expresión genética de los datos obtenidos en qPCR. Este parámetro ($2^{-\Delta\Delta CT}$) indica las veces de cambio en la expresión génica debida al tratamiento experimental (Schmittgen y Livak, 2008). Una vez normalizados, se analizan estadísticamente comparando cada tejido y cada gen para ambos grupos.

Análisis estadístico

Para todos los resultados presentados, se realizó un análisis previo para conocer la normalidad de los datos con la prueba de D'Agostino & Pearson. Los resultados se expresan como promedio \pm error estándar de la media.

Para análisis en peso corporal y consumo energético diarios, las diferencias significativas se determinaron por la prueba pareada t de Student de una cola comparando los grupos *ad libitum* y ayuno intermitente. Para el cambio de peso total, las diferencias se determinaron con la prueba ANOVA con prueba post hoc de Sidak. Para consumo energético total, las diferencias significativas se determinaron por la prueba sin parear t de Student de una cola con la corrección de Welch comparando los grupos *ad libitum* y ayuno intermitente. Para el peso seco hepático, actividad enzimática, y mediciones de glucosa, las comparaciones se realizaron con la prueba de Kruskal-Wallis con post hoc de Dunn. Para el peso hepático, presencia de PEPCK, y contenido de glucógeno, las comparaciones se realizaron con la prueba ANOVA con prueba post hoc de Sidak. Valores de $p < 0.05$, se consideraron significativos.

Resultados

Se asignaron de manera aleatoria 4 ratas Wistar de 9 semanas a los siguientes grupos: **Ad libitum (AL)**, **Ayuno agudo (AA)**, **Realimentación aguda (RA)**, **Ayuno intermitente en ayuno (AI-ayunado)**, y **Ayuno intermitente en alimentación (AI-alimentado)**.

Hay disminución en el consumo de alimento durante el ayuno intermitente

Se midió el peso corporal (**Figura 3A**) y el consumo de alimento (**Figura 3C**) de los animales cada día durante los 10 días del tratamiento a la misma hora (12:00 h) para ambos grupos, que corresponde al momento en el que se retiró o se colocó de nuevo el alimento en el grupo experimental.

Los resultados de la Figura 3, proporcionan evidencia que el ayuno intermitente resulta en el comportamiento oscilatorio del peso corporal dependiente del acceso al alimento, disminuyendo o aumentando en peso corporal, en función al acceso al alimento. Lo anterior resultó en que al final de los 10 días de tratamiento, el peso corporal en el grupo de ayuno intermitente (**AI**) no mostró cambios, en comparación con el inicio del tratamiento.

A partir del registro del peso corporal, se calculó la tasa total de cambio de peso al final del tratamiento (**Figura 3B**), obteniendo un aumento de 2% para **AI-alimentado**, y una disminución significativa del 5% para **AI-ayunado**, ambos con respecto al inicio del tratamiento.

El consumo de alimento durante el tratamiento se muestra en la **Figura 3C** expresado en kcal ingeridas por ciclo de 2 días. Se muestra el consumo total de kcal en 10 días de tratamiento en la **Figura 3D**, observándose un consumo menor significativo de 43% ($p=0.0119$) para ayuno intermitente (**AI**). Es importante resaltar que el grupo *ad libitum* (**AL**) llega a un valor máximo que se mantiene hasta el final del tratamiento, mientras que el **AI** tiene una discreta pendiente que indica que el consumo no ha llegado todavía a un valor estable.

La proporción del hígado respecto al peso corporal disminuye después del ayuno, e incrementa después de la alimentación durante el AI

El porcentaje del hígado normalizado al peso corporal de *ad libitum* (**AL**) es significativamente mayor para los grupos con ayuno intermitente (**AI**) en ambas condiciones (Figura 3E), así como para las condiciones agudas. Se observa, al igual que el peso corporal (Figura 3A), un comportamiento oscilatorio, disminuyendo en las condiciones de ayuno agudas y experimentales (**AA** y **AI-ayunado**, respectivamente)

Se deshidrataron 3 muestras de hígado ~1 g hasta un peso constante para calcular el peso seco del hígado en todas las condiciones (Figura 3F). El peso seco del hígado del ayuno agudo (**AA**) es 18% menor que **AL**. Después de una realimentación aguda (**RA**), la proporción aumenta ligeramente con respecto a **AA** teniendo una disminución total (no significativa) del 15% del grupo **AL**.

En las condiciones experimentales, con alimentación (**AI-alimentado**) y con ayuno (**AI-ayunado**), el peso seco es mayor que las condiciones agudas, con una disminución no significativa del 8% en **AI-ayunado** y 12%, **AI-alimentado** con respecto a **AL**; sin embargo, estas disminuciones con respecto a **AL** no son estadísticamente diferentes.

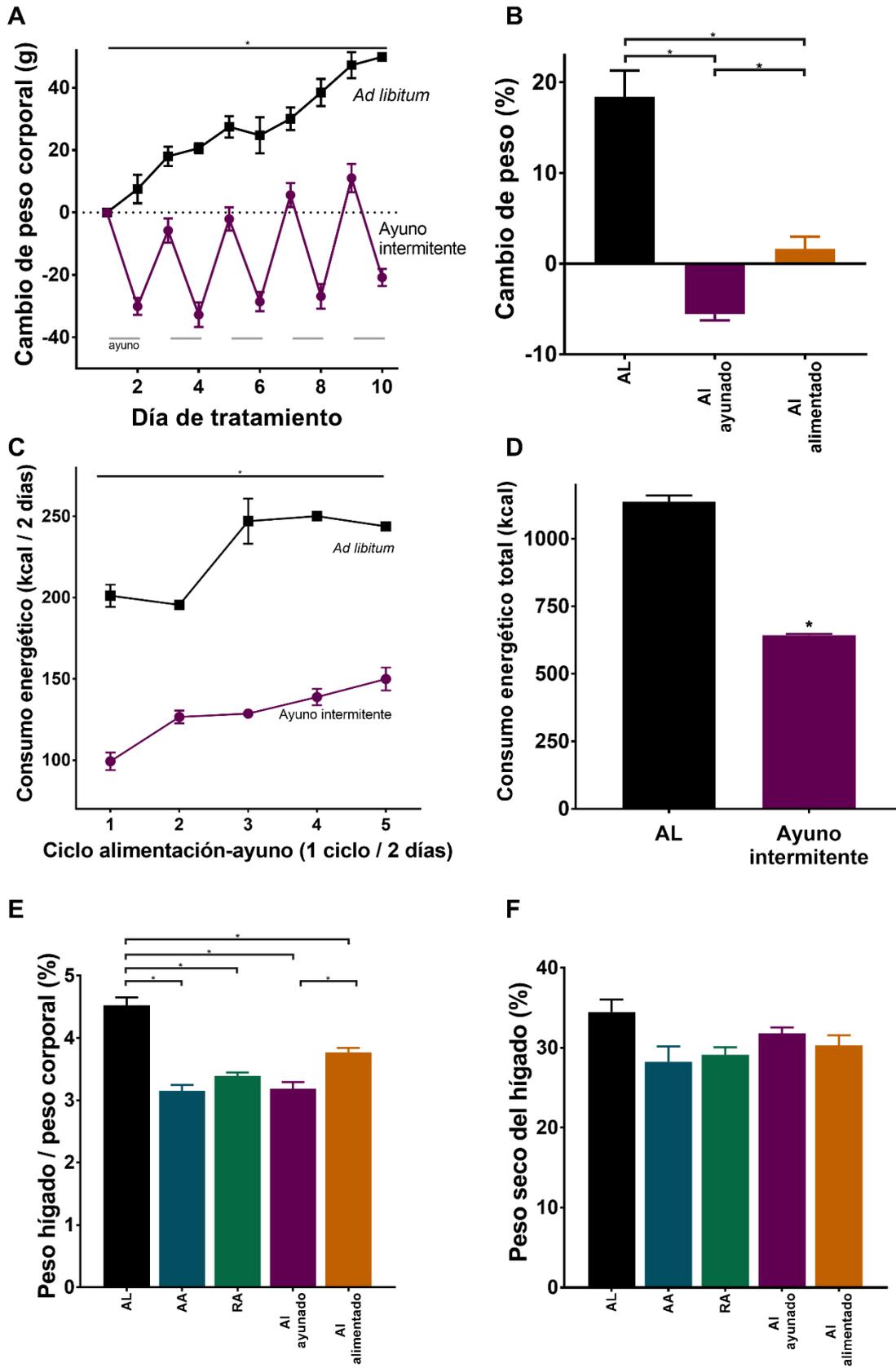


Figura 3 Respuesta morfométrica del ayuno intermitente

A. Peso corporal durante el tratamiento. Existe una diferencia significativa entre grupos según la prueba t de Student pareada de una cola, $p=0.0001$.

B. Cambio de peso corporal. Existe una diferencia significativa entre grupos según la prueba ANOVA de una vía, seguida de una prueba post hoc de Tukey: AL vs. AI ayunado $p<0.0001$, AL vs. AI alimentado $p<0.0001$, AI ayunado vs. AI alimentado $p=0.0347$.

C. Ingesta energética por cada ciclo de tratamiento Existe una diferencia significativa entre grupos según la prueba t de Student pareada de una cola, $p=0.0002$.

D. Ingesta total energética durante el tratamiento. Existe una diferencia significativa entre grupos según la prueba t de Student no pareada de una cola, con la corrección de Welch, $p=0.0119$

E. Peso del hígado expresado como porcentaje del peso corporal. Existe una diferencia significativa entre grupos según la prueba ANOVA de una vía, seguida de una prueba post hoc de Sidak: AL vs. AA, AL vs. RA, AL vs. AI-ayunado $p<0.0001$, AL vs. AI-alimentado $p=0.0015$, AI ayunado vs. AI alimentado $p=0.0048$

F. Peso seco del hígado expresado en porcentaje del peso húmedo del hígado. No hay diferencias significativas entre grupos. Los datos son expresados como promedio \pm error estándar de la media (EEM).

Hay una caída mayor en la expresión de *pck1* y *g6pc* en la realimentación aguda, que en la alimentación en ayuno intermitente

La expresión de *g6pc* y *pck1* (Figura 4A) del grupo **AL** tiene un valor promedio de 1 U.A. Después del ayuno agudo de 24 h, la expresión de ambos genes tiene un aumento no significativo del 47% para *g6pc* y 32% para *pck1* en comparación con **AL**. Después de la realimentación aguda, la expresión de ambos genes disminuye significativamente en 80% en comparación con **AA**, *g6pc* ($p=0.0166$) y *pck1* ($p=0.0103$). Después del tratamiento, la expresión génica de *pck1* se mantiene con una expresión disminuida del 66% (no significativa) para la **AI-alimentado**, y un valor similar de **AI-ayunado** al grupo a **AL**. El *g6pc*, se mantiene disminuido en 64% (no significativo) para **AI-alimentado**, y disminuida en un 50% para **AI-ayunado**. Estos resultados indican que la expresión génica de ambas enzimas disminuye en los ciclos repetidos de ayuno-alimentación, en comparación con la respuesta típica de un ayuno-alimentación agudo.

La presencia de PEPCK es mayor durante un ayuno agudo en comparación con el ayuno, después del tratamiento.

La presencia de la PEPCK, expresada en unidades arbitrarias (U.A.) de densidad óptica (D.O.), se midió con inmunodetección por western blot, con la subsecuente normalización por la presencia actina (U.A.). En la (Figura 4B), la densidad óptica [PEPCK (U.A.) / Actina (U.A.)] de cada grupo. La presencia de la proteína aumenta en 1.7 veces después de un ayuno agudo ($p=0.0003$), y disminuye el 50% después de la realimentación ($p<0.0001$); sin embargo, después del tratamiento de ayuno intermitente, para **AI-alimentado** y **AI-ayunado**, no se presentan diferencias significativas en comparación con **AL**.

La actividad enzimática de la PEPCK y G6Pasa presenta un aumento y disminución después de un ayuno y después de la realimentación de una ocasión, respectivamente; y no se presenta el comportamiento en ayuno intermitente

La actividad enzimática de la PEPCK (Figura 4C izquierda) de **AA**, está incrementada significativamente en un 131% en comparación con **AL** ($p < 0.0001$). Después de tener acceso al alimento durante 24 h, posterior al ayuno agudo, el grupo realimentación aguda (**RA**) disminuye significativamente ($p=0.0222$) un 42% con respecto al **AA**, y siendo 35% mayor (no significativo) que **AL**. Después del tratamiento experimental, la actividad de la PEPCK del grupo **AI-ayunado** se mantiene similar que **AL**, pero siendo 55% menor que **AA** ($p<0.0001$); y el grupo **AI-alimentado** tiene un valor 57% más alto que **AI-ayunado** (no significativo), y 63% mayor que **AL** ($p=0.0186$).

La actividad de la G6Pasa (Figura 4C derecha) del grupo **AL** tiene un valor promedio basal de 6 mmol PO₄/mg/min. Después de un ayuno de 24 h, el grupo de **AA** tiene un valor de 9 mmol PO₄/mg/min que representa un aumento significativo ($p=0.0008$) del 41% en comparación con **AL**. Después de tener acceso al alimento durante 24, posterior al ayuno agudo, el grupo **RA** tiene un valor de 7 mmol PO₄/mg/min, disminuyendo significativamente ($p=0.0264$) un 17% con respecto al **AA**, y siendo 18% mayor (no significativo) que **AL**.

Posterior al tratamiento experimental, la actividad de la G6Pasa se mantiene incrementada para **AI-ayunado** con un valor 25% mayor (no significativo) que **AL**,

pero siendo menor que **AA**. El grupo **Al-alimentado** tiene un valor disminuido (no significativo) del 32% con respecto a **AL**.

Estos resultados indican que la actividad de ambas enzimas aumenta significativamente y disminuye después de un ayuno agudo, y la realimentación aguda, respectivamente; sin embargo, después del tratamiento experimental, la actividad de la PEPCCK es menor (no significativo) durante el ayuno que durante la alimentación y, la actividad de la G6Pasa es mayor (no significativo) durante el ayuno.

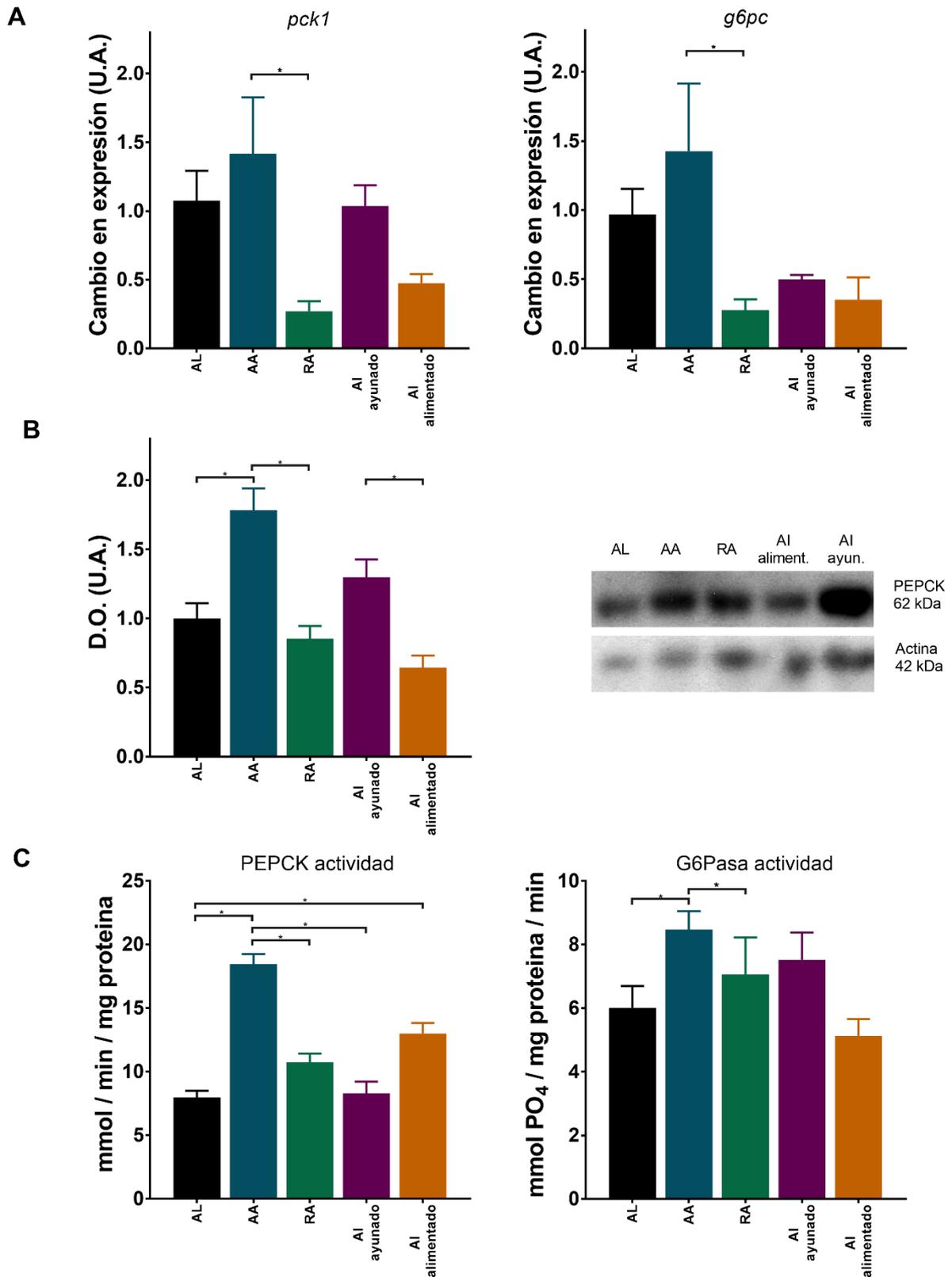


Figura 4 Actividad gluconeogénica

A. Expresión relativa de mRNA de *Pck1* y *G6pc*. Existen diferencias significativas en la expresión de *Pck1* según la prueba ANOVA de una vía seguida de la prueba

post hoc de Sidak: AA vs. RA $p= 0.0103$ Existen diferencias significativas en la expresión de *G6pc* según la prueba ANOVA de una vía seguida de la prueba post hoc de Sidak AL vs. AA $p= 0.0166$

B. Presencia de PEPCK por Western Blot. Existen diferencias significativas según la prueba ANOVA de una vía seguida de la prueba post hoc de Sidak: AL vs. AA $p=0.0003$, AA vs. RA $p<0.0001$, Al ayunado vs. Al alimentado $p=0.0048$

C. Actividad enzimática de PEPCK y G6Pasa. Existe una diferencia significativa en la actividad enzimática de PEPCK entre grupos según la prueba Kruskal Wallis, seguida de una prueba post hoc de Dunn: AL vs. AA $p<0.0001$, AL vs. Al alimentado $p= 0.0186$, AA vs. RA $p=0.0222$, AA vs. Al ayunado $p <0.0001$. Existe una diferencia significativa en la actividad enzimática de G6Pasa entre grupos según la prueba Kruskal Wallis, seguida de una prueba post hoc de Dunn: AL vs. AA $p= 0.0008$, AA vs. RA $p= 0.0264$. Los datos son expresados como promedio \pm error estándar de la media.

Los valores de glucosa son más altos para los grupos experimentales, que para los controles de ayuno y realimentación aguda.

Los valores de glucosa circulante se midieron con un glucómetro AccuCheck. Para los grupos en condición de alimentación como **AL**, **RA**, y **Al-alimentado**, se mantuvieron en un ayuno de 4 h (8 am a 12 pm) antes de la medición; y para los grupos en condición de ayuno como **AA** y **Al-ayunado**, se realizó la medición al final de las 24 h de ayuno de cada grupo.

La glicemia de **AA** tiene una disminución no significativa del 23% en comparación con **AL**. Después de la realimentación aguda, ocurre un aumento significativo ($p=0.0080$) de 1.5 veces en comparación con los valores de **AA**. Sin embargo, para los grupos con ayuno intermitente, ocurre un aumento de 130% para **Al-alimentado** en comparación con **Al-ayunado**. Las condiciones experimentales de alimentación y ayuno tienen valores ligeramente elevados en comparación con los controles agudos, lo que indica una producción hepática de glucosa elevada durante el tratamiento experimental.

El contenido de glucógeno es menor para los grupos experimentales, que para los controles de ayuno y realimentación aguda.

El contenido de glucógeno se determinó indirectamente por medio de la tinción de PAS, y por su cuantificación de densidad con el programa ImageJ. Se puede observar en la ~~¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.~~ **B y C** una disminución evidente en la tinción que corresponde a los grupos en ayuno, tanto **AA** (27%, $p= 0.0002$), como **AI-ayunado** (37%, $p<0.0001$), en comparación con la condición **AL**. En la condición de alimentación, el contenido de glucógeno aumenta en 119% ($p= 0.0405$) en **RA**; y en 145% ($p<0.0001$), para **AI-alimentado**. Estos datos indican diferencias interesantes en la respuesta al ayuno entre los grupos **AA** y **AI-ayunado**, ya que el ayuno intermitente promovió una mayor glucemia y un menor contenido de glucógeno, lo que sugiere una adaptación diferencial a la falta de alimentos en ambos grupos a pesar de tener un estado nutricional similar.

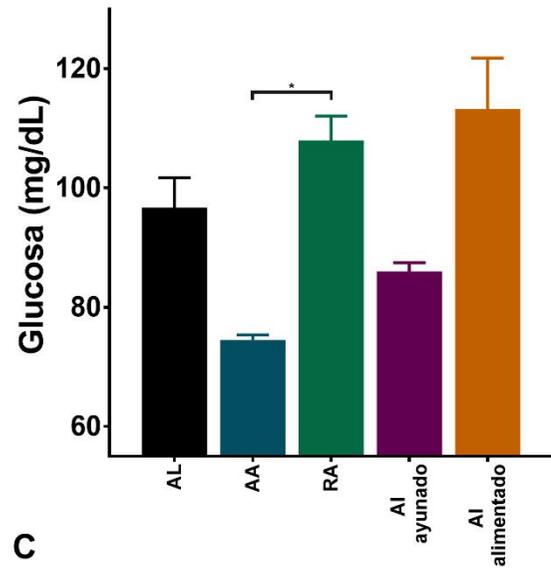
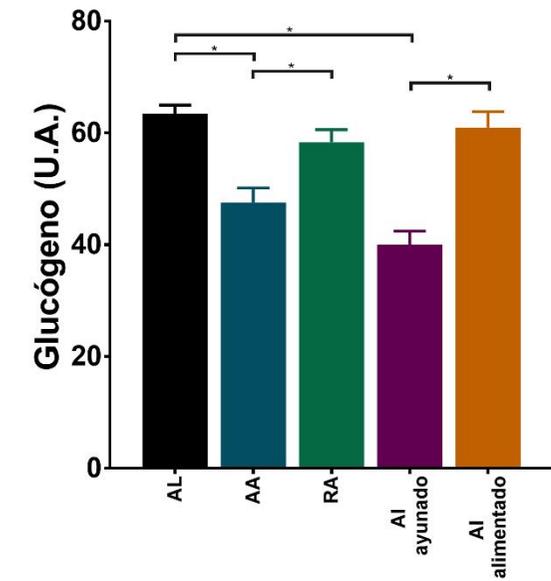
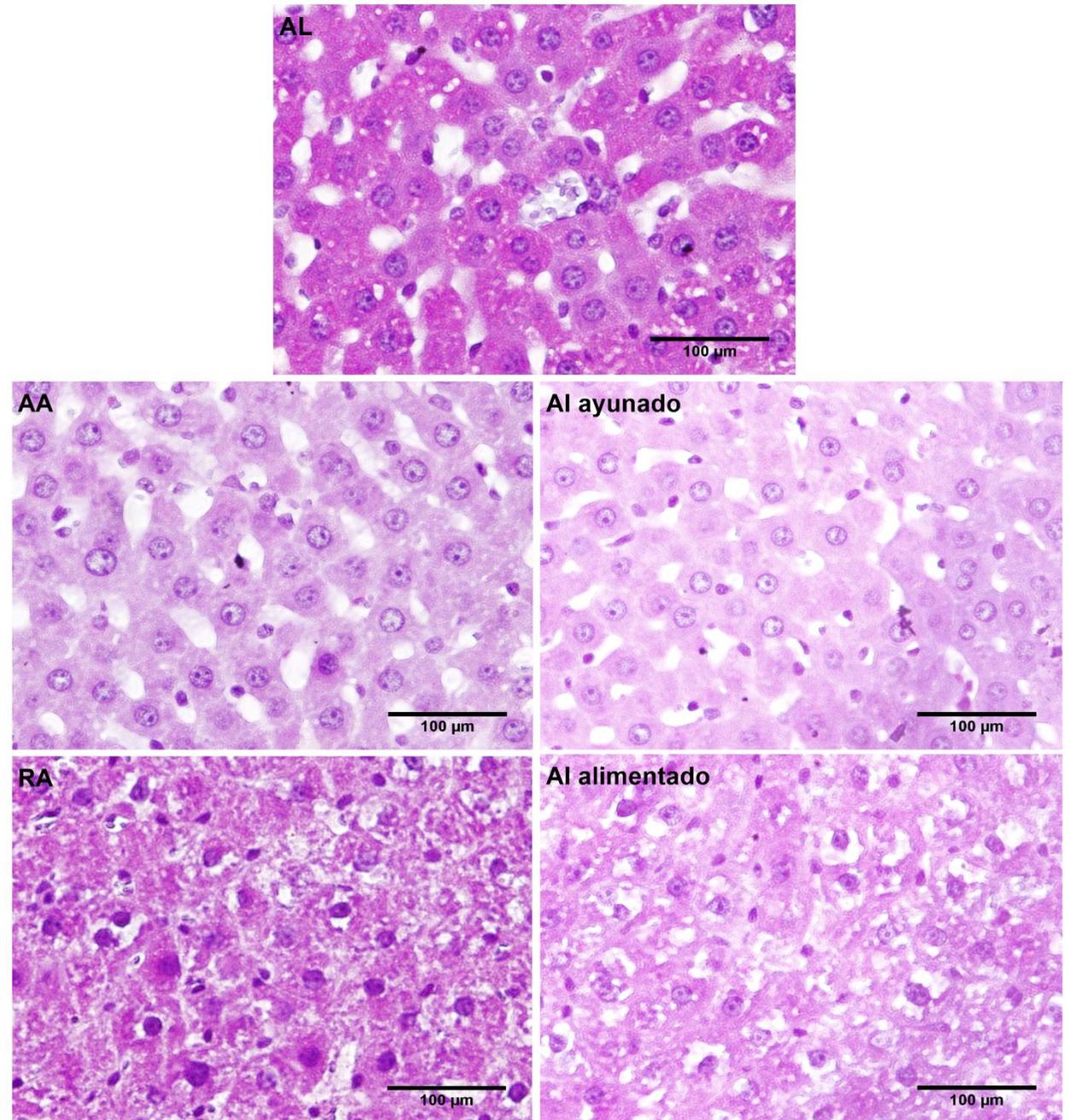
A**C****B**

Figura 5 Glucosa y glucógeno

A. Glucosa circulante. Existe una diferencia significativa entre grupos según la prueba Kruskal Wallis, seguida de una prueba post hoc de Dunn: AA vs. RA $p= 0.0080$

B. Microfotografías representativas de tinción de glucógeno.

C. Cuantificación relativa de glucógeno. Existen diferencias significativas según la prueba ANOVA de una vía seguida por la prueba post hoc de Sidak: AL vs. AA $p= 0.0002$, AL vs. AI ayunado $p<0.0001$, AA vs. RA $p= 0.0405$, AA vs. AI ayunado $p= 0.0522$, AI ayunado vs. AI alimento $p <0.0001$. Los datos son expresados como promedio \pm error estándar de la media.

El coeficiente respiratorio durante el ayuno intermitente

El coeficiente respiratorio (RQ) durante el protocolo de ayuno intermitente indica de manera indirecta el sustrato energético que está siendo oxidado; valores de RQ alrededor de 1.0 indican la oxidación de carbohidratos y, valores alrededor de 0.7, oxidación de lípidos (Secor y Carey, 2016). El registro se realizó durante 5 ciclos

alimentación-ayuno, equivalente a los 10 días de tratamiento. En la

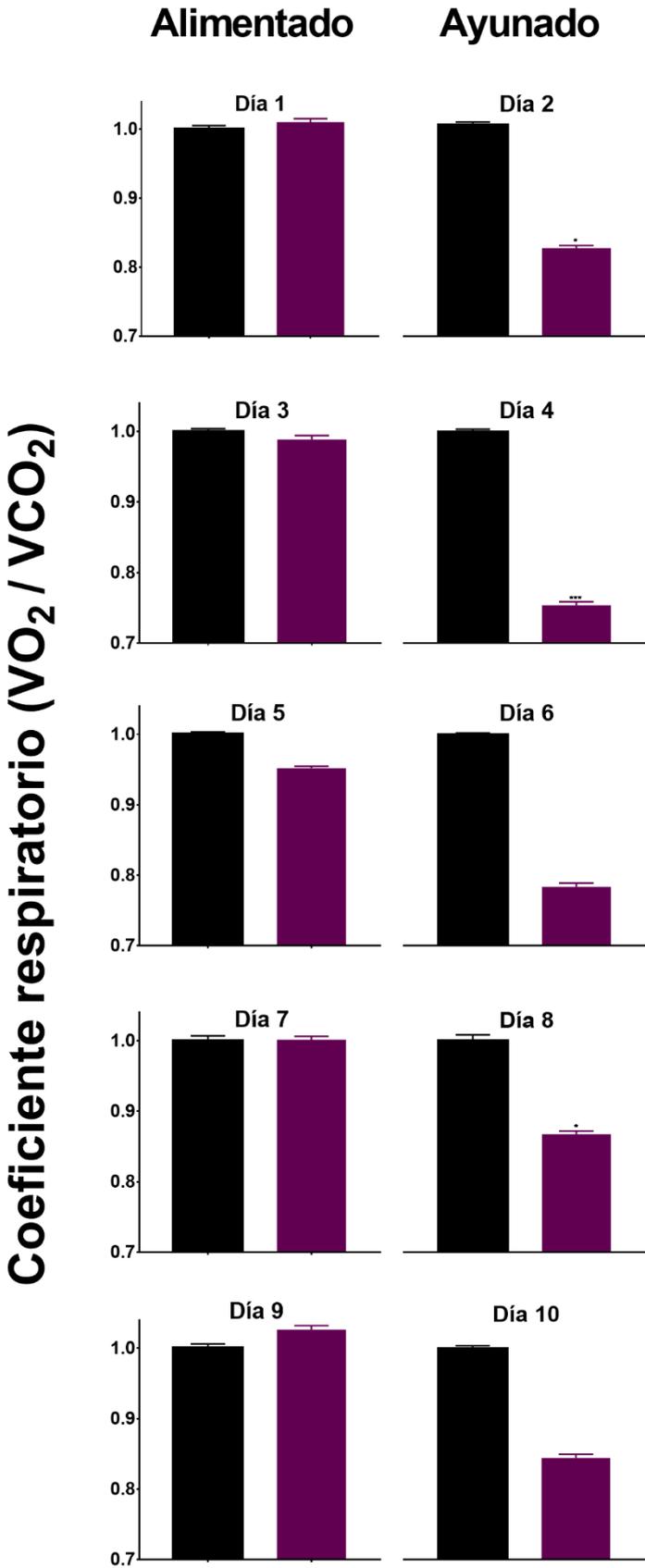
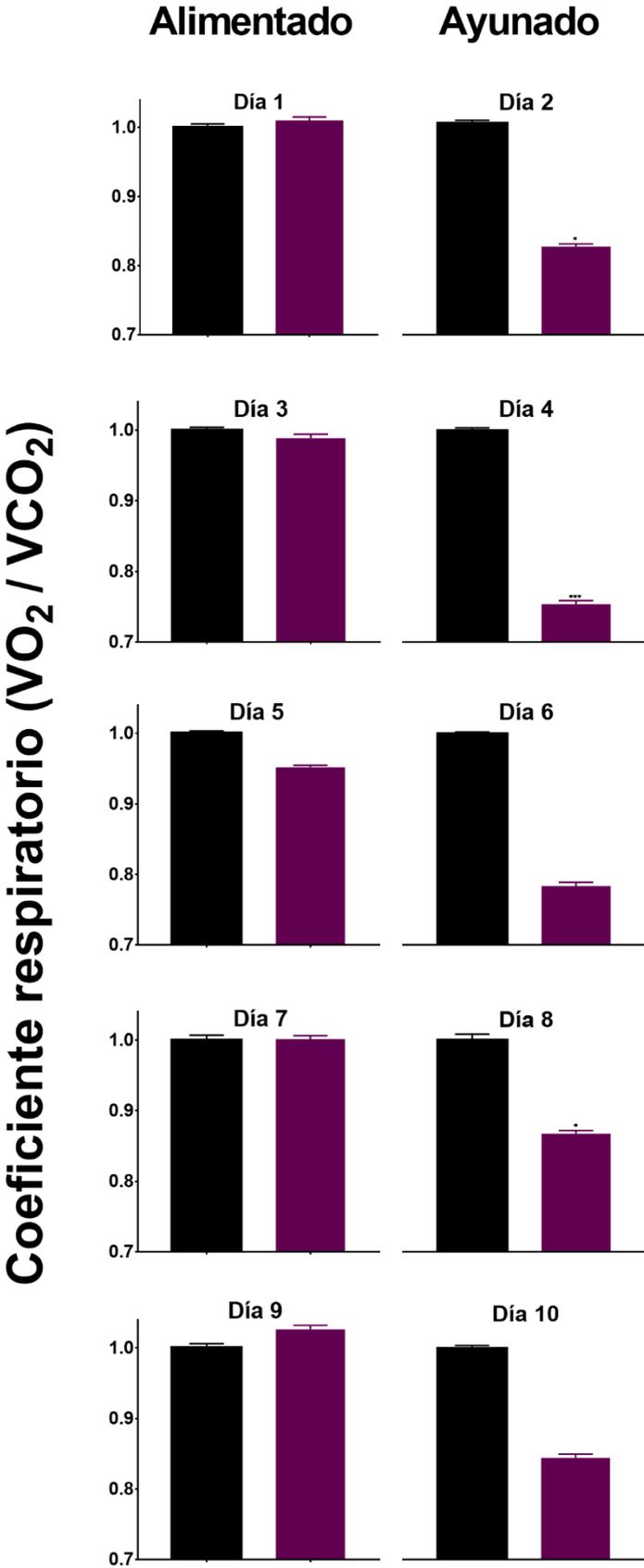
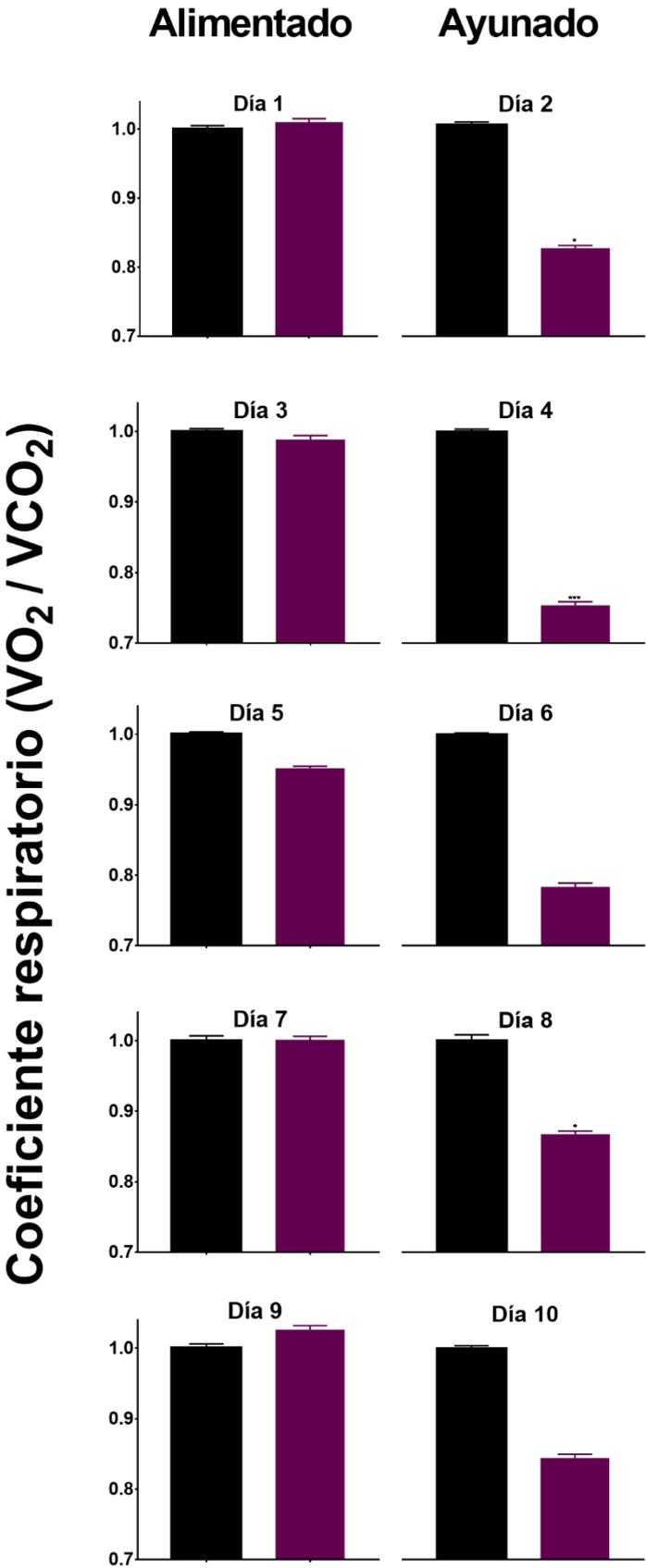


Figura 6 se muestra el RQ de los grupos de AL y AI. Los valores del grupo AI-



alimentado (

Figura 6 izquierda) fueron los días 1, 3, 5, 7 y 9, mientras que los días de



Al-ayunado (

Figura 6 derecha) fueron 2, 4, 6, 8 y 10. Se puede observar que en el día 2 que fue el primer día sin comida (ayuno agudo), el valor RQ se redujo en 18% ($p=0.0241$). El valor de RQ se redujo en 27% ($p=0.0002$) más el ayuno del siguiente ciclo, y para el siguiente ayuno, la disminución para el ciclo fue del 7% (no significativa); y en los dos últimos ayunos, la disminución fue del 16-18% ($p=0.0351$). Estos valores indican que la actividad metabólica en el ayuno tiende a oxidar más sustratos lipídicos, sin embargo, el cambio de valores durante los subsecuentes ayunos del tratamiento, indican que el comportamiento es diferente al del ayuno agudo.

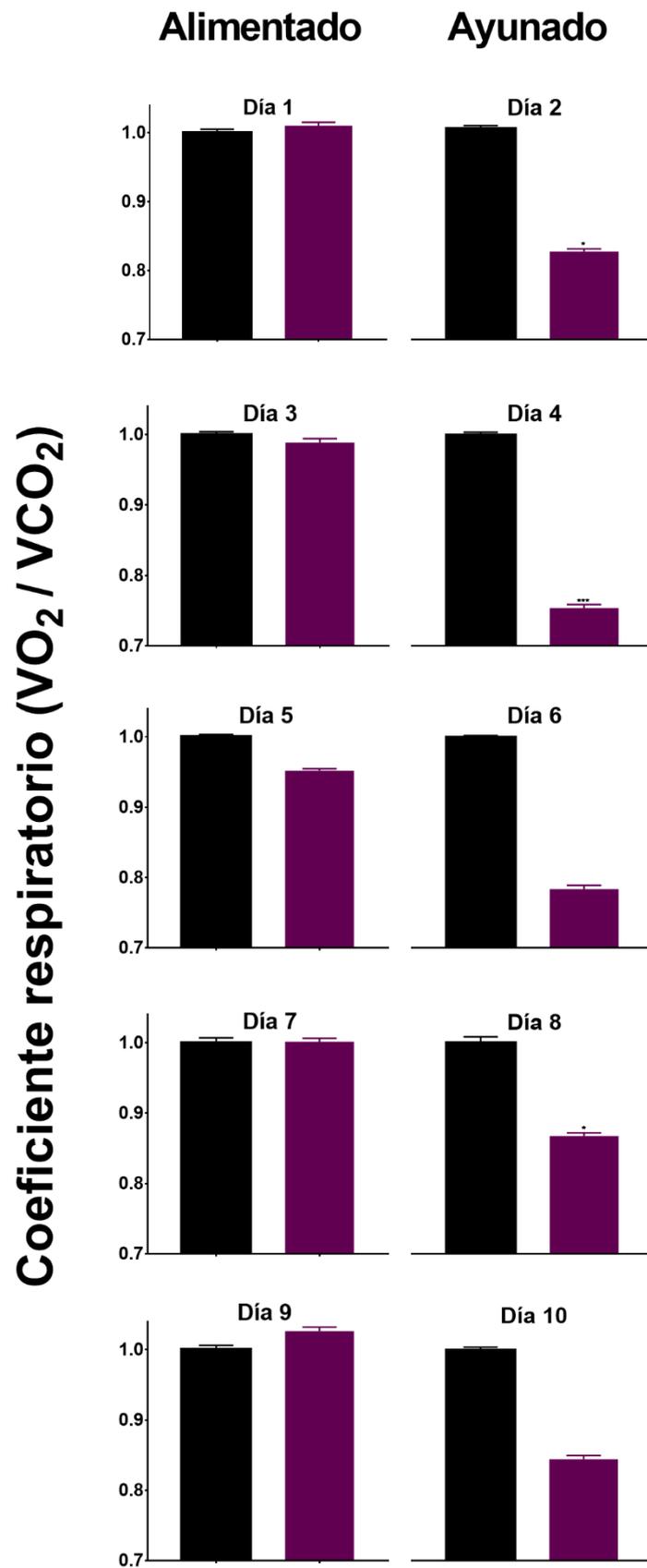


Figura 6 Coeficiente respiratorio.

Mediciones del coeficiente respiratorio normalizado al grupo ad libitum durante 10 días de ayuno intermitente. Existe una diferencia significativa entre grupos (ad libitum vs. ayuno intermitente) según la prueba de ANOVA de dos vías con prueba post hoc de Sidak: AL vs. AI día 2 $p=0.0241$, AL vs. AI día 4 $p=0.0002$, AL vs. IF día 8 $p=0.0351$. Los datos son expresados en promedio \pm EEM. (AL, AI n animales=4; n experimentos=1)

Discusión

En el presente trabajo se exploró la acción del ayuno intermitente sobre la actividad gluconeogénica del hígado. Los reportes existentes se centran en el estudio de los beneficios a la salud consecuencia del ayuno intermitente, en enfermedades cardiovasculares (Wan et al., 2003; Ahmet et al., 2005; Varady et al., 2013), con daño al sistema nervioso (Martin et al., 2006), dislipidemias (Baumeier et al., 2015), envejecimiento (Micó et al., 2017), obesidad (Kim et al., 2019), y diabetes; así como la regulación de metabolismo de lípidos, cuerpos cetónicos, e incluso la modificación de la microbiota intestinal (Kim et al., 2017; Li et al., 2017) durante el ayuno intermitente.

A pesar del interés científico en este tipo de dieta, existen pocos reportes sobre los cambios a nivel bioquímico o metabólico, y en específico para la gluconeogénesis. En el grupo de trabajo ya existen reportes del comportamiento de esta vía con otro tipo de aproximación dietética (Pérez-Mendoza et al., 2014): la restricción temporal (protocolo de 21 días, que se basa en tener acceso al alimento durante 2 h en la fase de luz, y 22 h de ayuno). Pérez-Mendoza y col. (2014) describen que la restricción temporal de alimento provoca una respuesta gluconeogénica incrementada al promover síntesis de glucógeno y producción de glucosa. Dicho lo anterior, resulta adecuado estudiar la adaptación metabólica de la gluconeogénesis en el ayuno intermitente.

Se ha descrito que el ayuno intermitente, al ser un estresor hormético provoca respuestas adaptativas que ayudan a contender con la restricción calórica (Calabrese and Mattson, 2017). Los cambios ocurren principalmente en tejidos metabólicos como el tejido adiposo y hepático (Secor y Carey, 2016; Antoni et al., 2017). Ejemplos de estas respuestas adaptativas son: el aumento de actividad termogénica, reducción de

marcadores de inflamación (Kim et al., 2017), uso de cuerpos cetónicos como principal sustrato energético, mejora de la homeostasis de glucosa (Lu et al., 2011; Mattson et al., 2017; Marosi et al., 2018), cambio en la microbiota intestinal (Li et al., 2017) o ritmos circadianos (Froy et al., 2009). A pesar de estas evidencias aún no está claro cuál es el mecanismo principal (o inicial) que induce los beneficios metabólicos del ayuno intermitente; más que eso, pareciera ser una respuesta integral y adaptativa de los procesos observados en respuesta al ayuno, como la respuesta endocrina que da lugar a cambios transcripcionales (Pérez et al., 1998; Thierion y Odom, 2018), y vías de señalización (Longo y Mattson, 2014; Marosi y Mattson, 2014; Marosi et al., 2018) que resultan en los beneficios del tratamiento.

El ayuno intermitente de día alterno (24 h de alimentación, seguido de 24 h de ayuno) tiene una disminución en el consumo calórico del 43% (Figura 3C y D), siendo la principal razón para que el peso no aumente durante el tratamiento experimental. Los cambios fisiológicos presentados en este estudio, pueden ser atribuidos a la restricción calórica; sin embargo, se ha demostrado, al evaluar grupos **AI** y **AL** que consumieron la misma cantidad de alimento, que los cambios fisiológicos ayunado intermitente se presentan independientemente de la restricción calórica (Kim et al., 2017, 2019).

Puede existir un discreto aumento de peso si se continua el tratamiento, a pesar de la disminución en la ingesta calórica intermitente o restricción calórica continua, como lo demuestran Baumeier y col. (2015), sin embargo, siempre será un menor aumento que las condiciones de acceso libre de alimento. En el estudio de Wan (2003), se aplica un ayuno intermitente de 25 semanas, en el que se observa una tendencia de ligero aumento de peso de la semana 3 a la 20. En la Figura 3A se observa el comportamiento oscilante del cambio de peso durante el tratamiento, si acotamos el peso corporal del grupo experimental en alimentación, del día 3 al 9 se observa este aumento discreto, que representa un incremento de peso del casi 5% (no significativo) para **AI** del día 3 al día 9.

Es importante considerar la fisiología del ayuno para comprender las intervenciones dietéticas terapéuticas y el efecto de la privación de alimentos en diversas enfermedades (Kerndt et al., 1982). El ayuno activa las vías metabólicas como la gluconeogénesis, lipólisis y cetogénesis, que permite el uso de sustratos energéticos por falta de glucosa exógena (Rui, 2014; Voet et al., 2016); y simultáneamente cuando

la hidrólisis de glucógeno disminuye hasta que las reservas se agotan (Kerndt et al., 1982; Secor y Carey, 2016). Los mecanismos descritos que se modifican durante el ayuno intermitente pueden incidir directa o indirectamente en los complejos procesos regulatorios de la gluconeogénesis (Hatting et al., 2017; Petersen et al., 2017; Zhang et al., 2019); además, otro aspecto de la respuesta al ayuno es su instalación secuencial: los ajustes metabólicos y transcripcionales varían según el tiempo transcurrido en ayuno y la frecuencia (Johnstone, 2007), por lo que estas respuestas pueden ser parte de la regulación hormética en el ayuno intermitente.

La G6Pasa es la enzima que remueve un grupo fosfato a la G6P para liberar glucosa a la circulación. En la Figura 4C, se observa un incremento significativo de actividad de la enzima en las condiciones agudas de ayuno en comparación con **AL** ($p=0.0008$); sin embargo para las condiciones de **Al-alimentado** existe una disminución significativa de la actividad enzimática en comparación con **Al-ayunado**, lo que significa que existe una menor producción y liberación de glucosa, y menor actividad gluconeogénica en el hígado en las condiciones experimentales de alimentación, y que el incremento del valor de glucosa (Figura 5A) para **Al-alimentado** se debe a la ingesta de alimento, y no a la glucosa endógena, lo anterior concuerda con Antoni (2017) que indica que los valores de glucosa circulante no se encuentran disminuidos en la alimentación. Por lo tanto, el ayuno agudo y el intermitente se regulan de manera diferente.

El contenido de glucógeno (Figura 5B y C) tiene una disminución significativa en **AA** ($p=0.0002$), y en **RA** recupera sus valores, y se mantienen similares para el **Al-alimentado**, sin embargo, el contenido en **Al-ayunado** tiende a estar disminuido 20% en comparación con **AA** ($p=0.0522$), lo que corresponde con el agotamiento del glucógeno, junto con la activación de la oxidación de lípidos (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.). La conclusión anterior, concuerda con los hallazgos de Díaz-Muñoz (2010) sobre los niveles de glucógeno restaurados después de la ingesta de alimento en la restricción temporal de alimento. Y es indicativo que el ciclo agudo de ayuno-realimentación es diferente a los ciclos de ayuno intermitente.

La G6P es un metabolito nodo en la gluconeogénesis, glucogenólisis, y la síntesis de ribosa-5-fosfato (ciclo de las pentosas) (Voet et al., 2016); además regula alostéricamente a la glucógeno sintasa (GS) para la síntesis de glucógeno (Noguchi et al., 2013). Una posible explicación para la baja actividad de la G6Pasa durante el

Al-alimentado (y no en la **RA**), es que, al reducir la producción de glucosa hepática por el estado de alimentación, la gluconeogénesis se activa en menor grado para aumentar la síntesis y reservas de glucógeno, para que puedan ser usadas durante los días sin acceso al alimento. Lo anterior subraya los resultados presentados por Pérez-Mendoza y col., (2014) sobre la inactivación de la glucógeno sintasa (GS), el aumento de la presencia de la GS, y la cantidad de glucógeno después de la ingesta de alimento en la restricción temporal de alimento.

En la Figura 3; *Error! No se encuentra el origen de la referencia.* **E**, se muestra que el porcentaje del peso del hígado con respecto al peso corporal disminuye significativamente después del ayuno (**AA** y **Al-ayunado**), principalmente debido por el agotamiento de las reservas de glucógeno (Kouda et al., 2004; Secor y Carey, 2016). El porcentaje del peso del hígado aumenta después de la alimentación debido a la restauración del glucógeno hepático (**RA** y **Al-alimentado**), como se observa en la Figura **3B** y **C**. Este resultado subraya las conclusiones obtenidas en trabajos previos que indican que el peso del hígado fluctúa en alimentación y ayuno por el contenido de glucógeno hepático (Liverini et al., 1992).

En la Figura **3F** se observa una tendencia de aumento en el peso seco del hígado después del ayuno intermitente, este aumento es debido al aumento de la masa hepática, que puede ser debido al aumento de la proliferación celular, ya que es una función celular afectadas por los ciclos de ayuno y realimentación, así como el número de células que sufren son sensibles a condiciones de corto plazo con ayuno y realimentación apoptosis (Piotrowska et al., 2016); además Molina-Aguilar (2012) demostró en un restricción temporal de alimento, un aumento de células positivas para duplicación celular; sin embargo estos cambios no se observan en ayuno agudo y realimentación aguda (Kouda et al., 2004).

Si bien la proliferación celular puede ser la causa del aumento de la masa seca hepática, no hay que olvidar que la estructura hidrofílica de polisacáridos como el glucógeno incide en la cantidad de moléculas de agua unidas a la estructura del glucógeno (Grossutti y Dutcher, 2016); además, el rendimiento de la oxidación de 1 g de lípidos produce 1.1 g de agua metabólica (Secor y Carey, 2016), en contraste con 0.1 g de agua metabólica con la oxidación de 1 g de glucosa, por lo que el aumento en masa seca al final del tratamiento puede ser causa de la menor cantidad de

glucógeno (Figura 5; Error! No se encuentra el origen de la referencia. **C**) y agua unida a la molécula, así como el agua metabólica proveniente del metabolismo de lípidos.

La expresión génica de *pck1* y *g6pc* tiene una tendencia de aumento en **AA** (no significativa), pero que concuerda con el comportamiento del contenido de proteínas y actividad enzimática (Figura 4), realimentación aguda, la expresión génica disminuye significativamente en comparación con **AA** ($p= 0.0103$ y $p= 0.0166$) respectivamente, esto es principalmente debido a la cascada de señalización de insulina que aumenta en alimentación y disminuye la capacidad gluconeogénica (Noguchi et al., 2013; Hatting et al., 2017; Petersen et al., 2017). Durante el ayuno intermitente los valores de la expresión génica se mantienen con tendencia a la baja en comparación con **AL** (no significativo), a pesar de estar en condición de ayuno.

La presencia de PEPCK detectada por western blot (Figura 4; Error! No se encuentra el origen de la referencia. **B**) aumenta significativamente ~ 2 veces en **AA** ($p=0.0003$); y disminuye para **RA** en comparación con el ayuno agudo ($p<0.0001$), este resultado muestra que hay una alta tasa de síntesis de PEPCK en las condiciones agudas de ayuno.

La presencia de PEPCK en los grupos con ayuno intermitente (**Al-alimentado** y **Al-ayunado**) disminuye en comparación con los grupos de ayuno y realimentación aguda (Figura 4**B**), conforme continúan los ciclos de ayuno-realimentación, hasta que la cantidad de PEPCK es similar a **AL**; esto concuerda con Hopgood (1973), quien describe que la síntesis de PEPCK durante el ayuno de 20 h aumenta y, durante 1 h de realimentación, disminuye un 80%, pero al ayunar por segunda vez, la síntesis de PEPCK representa un 73% del primer ayuno; la disminución de la presencia de PEPCK puede deberse al aumento de la tasa de degradación de la enzima debido a fosforilación y ubiquitinación (Latorre-Muro et al., 2018). La actividad de PEPCK está incrementada significativamente en **AA** ($p < 0.0001$) y disminuye un 48% en **RA** (Figura 4**C**), esto puede explicarse por la degradación de la proteína (Hopgood, 1973).

Para **Al-alimentado**, la actividad enzimática está elevada en un 55% en comparación con **AL** (Figura 4**C**). Lo anterior es contraintuitivo, ya que la alimentación disminuye la actividad gluconeogénica; sin embargo, para este mismo grupo, la actividad enzimática de la G6Pasa está disminuida, indicando que no hay liberación de glucosa

en esta condición, por lo que el aumento del flujo gluconeogénico por la PEPCK no continúa hasta la G6Pasa.

El aumento de la actividad enzimática de la PEPCK en alimentación durante el ayuno intermitente, es consistente con las funciones no gluconeogénicas de la PEPCK, como facilitar reacciones catapleróticas, y así facilitar el flujo a vías como gliceroneogénesis, síntesis de serina, y vía de las pentosas (Latorre-Muro et al., 2018; Wang y Dong, 2019). Además, la reacción inversa de la PEPCK se facilita al acetilarse, lo cual se aumenta en concentraciones elevadas de glucosa (Latorre-Muro et al., 2018). Otra razón para el aumento de la actividad de PEPCK es facilitar el consumo de glucosa e incrementar la glicólisis (Montal et al., 2015); sin embargo, con la medición realizada en este proyecto no es posible saber la direccionalidad de la reacción, hasta que se determine la concentración de oxoalacetato y fosfoenolpiruvato.

Los datos presentados indican que la expresión, cantidad y actividad de la PEPCK y G6Pasa no tienen una relación directa, ya que los sustratos que contribuyen a la gluconeogénesis pueden entrar en diferente nivel de la vía (Secor y Carey, 2016); como el glicerol producido por la oxidación de lípidos puede entrar a la gluconeogénesis convirtiéndose a glicerol-3-fosfato (G3P) por la glicerol kinasa, y alimentar la vía sin la conversión de piruvato a PEP por la PEPCK (Kalogiannis et al., 2014).

Es importante mencionar que el flujo gluconeogénico no tiene una relación directa con la expresión de genes de G6Pasa y PEPCK (Petersen et al., 2017). Sun (2012) describe que un decremento en más del 90% en *pck1* sólo reduce el 40% del flujo en la gluconeogénesis.

Los datos de calorimetría indirecta indican que durante el ayuno se mantienen altos niveles de oxidación de grasas, correspondiente a valores de RQ alrededor de 0.8 (Baumeier et al., 2015; Secor y Carey, 2016; Marosi et al., 2018). En realimentación aguda (o día 3) y los demás días de alimentación, se restablecen los valores promedios de RQ 1.0, similares a **AL** indicando la oxidación predominante de carbohidratos (Baumeier et al., 2015). Es interesante mencionar que Baumeier (2015) indica que, en tratamientos de duración mayor de 10 semanas, los valores de RQ en alimentación son mayores a 1.0, teniendo un proceso de lipogénesis adaptativa al tratamiento de ayuno intermitente.

Conclusión

Se encontró que después del ayuno intermitente de 10 días, hay diferencias entre grupos de condiciones de ayuno intermitente, *ad libitum*, y ayuno de una ocasión o agudo. No hay una ganancia de peso con el tratamiento de ayuno intermitente debido a la disminución de la ingesta calórica en comparación con condiciones *ad libitum*; el nivel de expresión génica de las enzimas claves de la gluconeogénesis (PEPCK y G6Pasa) es 40% mayor después de un ayuno agudo en comparación con *ad libitum*, pero disminuye después del tratamiento de ayuno intermitente, sin encontrarse diferencias con *ad libitum*; el nivel de proteína de PEPCK aumenta 80% en ayuno agudo en comparación con *ad libitum*, y tiene una tendencia de aumento en ayuno intermitente sin tener diferencias significativas con *ad libitum*; los experimentos de actividad enzimática demostraron que ambas enzimas tienen tendencias diferentes entre ellas, indicando que la gluconeogénesis no tiene la misma tasa en sus reacciones.

Los niveles de glucosa y glucógeno tienden a disminuir en condiciones de ayuno (agudo o intermitente) en comparación con *ad libitum* y, a aumentar en condiciones de alimentación en comparación con su par de ayuno.

El coeficiente respiratorio (RQ), un parámetro que señala el tipo de sustrato. Los valores obtenidos durante alimentación del grupo de ayuno intermitente indican que se están utilizando principalmente carbohidratos, y durante el ayuno, se están usando lípidos.

Perspectivas

- Cuantificar el piruvato y oxoalacetato, para conocer la direccionalidad de la actividad enzimática de la PEPCK.
- Evaluar si existe lipogénesis en ayuno intermitente más largo.
- Cuantificar parámetros hormonales como insulina, glucagón, y corticosterona.
- Cuantificar la zonación hepática de la gluconeogénesis por inmunohistoquímica.
- Evaluar si los efectos del ayuno intermitente de 10 días, permanecen si se restablecen las condiciones de acceso libre al alimento.

Bibliografía

Adeva-Andany, M.M., Pérez-Felpete, N., Fernández-Fernández, C., Donapetry-García, C., Pazos-García, C., 2016. Liver glucose metabolism in humans. *Biosci. Rep.* 36.

Ahmet, I., Wan, R., Mattson, M.P., Lakatta, E.G., Talan, M., 2005. Cardioprotection by Intermittent Fasting in Rats. *Circulation* 112, 3115–3121.

Antoni, R., Johnston, K.L., Collins, A.L., Robertson, M.D., 2017. Effects of intermittent fasting on glucose and lipid metabolism. *Proc. Nutr. Soc.* 1–8.

Báez-Ruiz, A., Escobar, C., Aguilar-Roblero, R., Vázquez-Martínez, O., Díaz-Muñoz, M., 2005. Metabolic adaptations of liver mitochondria during restricted feeding schedules. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 289, G1015-1023.

Baumeier, C., Kaiser, D., Heeren, J., Scheja, L., John, C., Weise, C., Eravci, M., Lagerpusch, M., Schulze, G., Joost, H.-G., Schwenk, R.W., Schürmann, A., 2015. Caloric restriction and intermittent fasting alter hepatic lipid droplet proteome and diacylglycerol species and prevent diabetes in NZO mice. *Biochim. Biophys. Acta* 1851, 566–576.

Buono, R., Longo, V.D., 2018. Starvation, Stress Resistance, and Cancer. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 29, 271–280.

Calabrese, E.J., Mattson, M.P., 2017. How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine? *NPJ Aging Mech. Dis.* 3, 13.

Challet, E., 2010. Interactions between light, mealtime and calorie restriction to control daily timing in mammals. *J. Comp. Physiol. [B]* 180, 631–644.

Chausse, B., Vieira-Lara, M.A., Sanchez, A.B., Medeiros, M.H.G., Kowaltowski, A.J., 2015. Intermittent Fasting Results in Tissue-Specific Changes in Bioenergetics and Redox State. *PLOS ONE* 10, e0120413.

Davies, K.J.A., 2016. Adaptive homeostasis. *Mol. Aspects Med.* 49, 1–7.

De Ita Pérez, D.L., 2010. Estudio de la distribución zonal de la proteína reloj PER1 hepática durante la expresión del oscilador sincronizado por alimento. Universidad Nacional Autónoma de México, Juriquilla, Querétaro.

Díaz-Muñoz, M., Vázquez-Martínez, O., Báez-Ruiz, A., Martínez-Cabrera, G., Soto-Abraham, M.V., Ávila-Casado, M.C., Larriva-Sahd, J., 2010. Daytime food restriction alters liver glycogen, triacylglycerols, and cell size. A histochemical, morphometric, and ultrastructural study. *Comp. Hepatol.* 9, 5.

Froy, O., Chapnik, N., Miskin, R., 2009. Effect of intermittent fasting on circadian rhythms in mice depends on feeding time. *Mech. Ageing Dev.* 130, 154–160.

Gastaldelli, A., Gaggini, M., DeFronzo, R., 2017. Glucose kinetics: an update and novel insights into its regulation by glucagon and GLP-1. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 20, 300–309.

Goldstein, I., Hager, G.L., 2018. The Three Ds of Transcription Activation by Glucagon: Direct, Delayed, and Dynamic. *Endocrinology* 159, 206–216.

Grossutti, M., Dutcher, J.R., 2016. Correlation Between Chain Architecture and Hydration Water Structure in Polysaccharides. *Biomacromolecules* 17, 1198–1204.

Hatting, M., Tavares, C.D.J., Sharabi, K., Rines, A.K., Puigserver, P., 2017. Insulin regulation of gluconeogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*

Hopgood, 1973. Synthesis and degradation of phosphoenolpyruvate carboxylase in rat liver and adipose tissue. Changes during a starvation-re-feeding cycle. *Biochem. J.* 134, 445–453.

Johnstone, A.M., 2007. Fasting - the ultimate diet? *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* 8, 211–222.

Jungermann, K., 1987. Metabolic zonation of liver parenchyma: significance for the regulation of glycogen metabolism, gluconeogenesis, and glycolysis. *Diabetes. Metab. Rev.* 3, 269–293.

Kalogiannis, S., Pagkalos, I., Koufoudakis, P., Dashi, I., Pontikeri, K., & Christodoulou, C. (2014). Integrated interactive chart as a tool for teaching metabolic pathways. *Biochem Mol Biol Educ*, 42(6), 501–506.

Kerndt, P.R., Naughton, J.L., Driscoll, C.E., Loxterkamp, D.A., 1982. Fasting: The History, Pathophysiology and Complications. *West. J. Med.* 137, 379–399.

Kim, K.-H., Kim, Y.H., Son, J.E., Lee, J.H., Kim, S., Choe, M.S., Moon, J.H., Zhong, J., Fu, K., Lenglin, F., Yoo, J.-A., Bilan, P.J., Klip, A., Nagy, A., Kim, J.-R., Park, J.G.,

Hussein, S.M., Doh, K.-O., Hui, C.-C., Sung, H.-K., 2017. Intermittent fasting promotes adipose thermogenesis and metabolic homeostasis via VEGF-mediated alternative activation of macrophage. *Cell Res.* 27, 1309–1326.

Kim, Y.H., Lee, J.H., Yeung, J.L.-H., Das, E., Kim, R.Y., Jiang, Y., Moon, J.H., Jeong, H., Thakkar, N., Son, J.E., Trzaskalski, N., Hui, C.-C., Doh, K.-O., Mulvihill, E.E., Kim, J.-R., Kim, K.-H., Sung, H.-K., 2019. Thermogenesis-independent metabolic benefits conferred by isocaloric intermittent fasting in ob/ob mice. *Sci. Rep.* 9, 2479.

Kouda, K., Nakamura, H., Kohno, H., Ha-Kawa, S.K., Tokunaga, R., Sawada, S., 2004. Dietary restriction: effects of short-term fasting on protein uptake and cell death/proliferation in the rat liver. *Mech. Ageing Dev.* 125, 375–380.

Latorre-Muro, P., Baeza, J., Armstrong, E.A., Hurtado-Guerrero, R., Corzana, F., Wu, L.E., Sinclair, D.A., López-Buesa, P., Carrodeguas, J.A., Denu, J.M., 2018. Dynamic Acetylation of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Toggles Enzyme Activity between Gluconeogenic and Anaplerotic Reactions. *Mol. Cell* 71, 718-732.e9.

Li, G., Xie, C., Lu, S., Nichols, R.G., Tian, Y., Li, L., Patel, D., Ma, Y., Brocker, C.N., Yan, T., Krausz, K.W., Xiang, R., Gavrilova, O., Patterson, A.D., Gonzalez, F.J., 2017. Intermittent Fasting Promotes White Adipose Browning and Decreases Obesity by Shaping the Gut Microbiota. *Cell Metab.* 26, 801.

Li, S., Lin, J.D., 2015. Transcriptional control of circadian metabolic rhythms in the liver. *Diabetes Obes. Metab.* 17 Suppl 1, 33–38.

Liverini, G., Iossa, S., Barletta, A., 1992. Relationship between resting metabolism and hepatic metabolism: effect of hypothyroidism and 24 hours fasting. *Horm. Res.* 38, 154–159.

Longo, V.D., Mattson, M.P., 2014. Fasting: molecular mechanisms and clinical applications. *Cell Metab.* 19, 181–192.

Lu, J., E, L., Wang, W., Frontera, J., Zhu, H., Wang, W.-T., Lee, P., Choi, I.Y., Brooks, W.M., Burns, J.M., Aires, D., Swerdlow, R.H., 2011. Alternate day fasting impacts the brain insulin-signaling pathway of young adult male C57BL/6 mice. *J. Neurochem.* 117, 154–163.

Marosi, K., Mattson, M.P., 2014. BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 25, 89–98.

Marosi, K., Moehl, K., Navas-Enamorado, I., Mitchell, S.J., Zhang, Y., Lehrmann, E., Aon, M.A., Cortassa, S., Becker, K.G., Mattson, M.P., 2018. Metabolic and molecular framework for the enhancement of endurance by intermittent food deprivation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 32, 3844–3858.

Martin, B., Mattson, M.P., Maudsley, S., 2006. Caloric restriction and intermittent fasting: Two potential diets for successful brain aging. *Ageing Res. Rev.* 5, 332–353.

Mattson, M.P., Longo, V.D., Harvie, M., 2017. Impact of intermittent fasting on health and disease processes. *Ageing Res. Rev.* 39, 46–58.

Micó, V., Berninches, L., Tapia, J., Daimiel, L., 2017. NutrimiRAging: Micromanaging Nutrient Sensing Pathways through Nutrition to Promote Healthy Aging. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 915.

Molina-Aguilar, C., Pérez-Sánchez, J., Vázquez-Martínez, O., Rivera-Zavala, J., Díaz-Muñoz, M., 2012. Restricted food access during the daytime modifies the 24-h rhythmicity of apoptosis and cellular duplication in rat liver. *Biol. Rhythm Res.* 43, 25–37.

Montal, E.D., Dewi, R., Bhalla, K., Ou, L., Hwang, B.J., Ropell, A.E., Gordon, C., Liu, W.-J., DeBerardinis, R.J., Sudderth, J., Twaddel, W., Boros, L.G., Shroyer, K.R., Duraisamy, S., Drapkin, R., Powers, R.S., Rohde, J.M., Boxer, M.B., Wong, K.-K., Girnun, G.D., 2015. PEPCK Coordinates the Regulation of Central Carbon Metabolism to Promote Cancer Cell Growth. *Mol. Cell* 60, 571–583.

Noguchi, R., Kubota, H., Yugi, K., Toyoshima, Y., Komori, Y., Soga, T., Kuroda, S., 2013. The selective control of glycolysis, gluconeogenesis and glycogenesis by temporal insulin patterns. *Mol. Syst. Biol.* 9, 664.

Nunn, A.V., Bell, J.D., Guy, G.W., 2009. Lifestyle-induced metabolic inflexibility and accelerated ageing syndrome: insulin resistance, friend or foe? *Nutrition & Metabolism* 6, 16.

Opie, L.H., Newsholme, E.A., 1967. The activities of fructose 1,6-diphosphatase, phosphofructokinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in white muscle and red muscle. *Biochem. J.* 103, 391–399.

Pérez, J.X., Manzano, A., Tauler, A., Bartrons, R., 1998. Effect of starvation on gene expression of regulatory enzymes of glycolysis/gluconeogenesis in genetically obese

(fa/fa) Zucker rats. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* 22, 667–672.

Pérez-Mendoza, M., Rivera-Zavala, J.B., Díaz-Muñoz, M., 2014. Daytime restricted feeding modifies the daily variations of liver gluconeogenesis: Adaptations in biochemical and endocrine regulators. *Chronobiol. Int.* 31, 815–828.

Petersen, M.C., Vatner, D.F., Shulman, G.I., 2017a. Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* 13, 572–587.

Petersen, M.C., Vatner, D.F., Shulman, G.I., 2017b. Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* 13, 572–587.

Piotrowska, K., Tarnowski, M., Zgutka, K., Pawlik, A., 2016. Gender Differences in Response to Prolonged Every-Other-Day Feeding on the Proliferation and Apoptosis of Hepatocytes in Mice. *Nutrients* 8, 176. <https://doi.org/10.3390/nu8030176>

Rohm, M., Savic, D., Ball, V., Curtis, M.K., Bonham, S., Fischer, R., Legrave, N., MacRae, J.I., Tyler, D.J., Ashcroft, F.M., 2018. Cardiac Dysfunction and Metabolic Inflexibility in a Mouse Model of Diabetes Without Dyslipidemia. *Diabetes* 67, 1057–1067.

Rui, L., 2014. Energy Metabolism in the Liver, in: Terjung, R. (Ed.), *Comprehensive Physiology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 177–197.

Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* 3, 1101–1108.

Secor, S.M., Carey, H.V., 2016. Integrative Physiology of Fasting. *Compr. Physiol.* 6, 773–825.

Smith, R.L., Soeters, M.R., Wüst, R.C.I., Houtkooper, R.H., 2018. Metabolic Flexibility as an Adaptation to Energy Resources and Requirements in Health and Disease. *Endocr. Rev.* 39, 489–517.

Stockman, M.-C., Thomas, D., Burke, J., Apovian, C.M., 2018. Intermittent Fasting: Is the Wait Worth the Weight? *Current Obesity Reports* 7, 172–185.

Sun, Z., Miller, R.A., Patel, R.T., Chen, J., Dhir, R., Wang, H., Zhang, D., Graham, M.J., Unterman, T.G., Shulman, G.I., Sztalryd, C., Bennett, M.J., Ahima, R.S.,

Birnbaum, M.J., Lazar, M.A., 2012. Hepatic Hdac3 promotes gluconeogenesis by repressing lipid synthesis and sequestration. *Nat. Med.* 18, 934–942.

Sundfør, T.M., Svendsen, M., Tonstad, S., 2018. Effect of intermittent versus continuous energy restriction on weight loss, maintenance and cardiometabolic risk: A randomized 1-year trial. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 28, 698–706.

Tareen, S.H.K., Kutmon, M., Adriaens, M.E., Mariman, E.C.M., de Kok, T.M., Arts, I.C.W., Evelo, C.T., 2018. Exploring the cellular network of metabolic flexibility in the adipose tissue. *Genes & Nutrition* 13.

Thierion, E., Odom, D.T., 2018. Charting the transcriptional regulatory changes in mouse liver during fasting. *Hepatology* 67, 436–438.

Tigas, S., Sunehag, A., Haymond, M.W., 2002. Metabolic adaptation to feeding and fasting during lactation in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 302–307.

Tinsley, G.M., La Bounty, P.M., 2015. Effects of intermittent fasting on body composition and clinical health markers in humans. *Nutrition Reviews* 73, 661–674.

Vaiserman, A.M., 2011. Hormesis and epigenetics: Is there a link? *Ageing Research Reviews*.

van den Brink, W., van Bilsen, J., Salic, K., Hovenaars, F.P.M., Verschuren, L., Kleemann, R., Bouwman, J., Ronnett, G.V., van Ommen, B., Wopereis, S., 2019. Current and Future Nutritional Strategies to Modulate Inflammatory Dynamics in Metabolic Disorders. *Frontiers in Nutrition* 6.

Van Schaftingen, E., Gerin, I., 2002. The glucose-6-phosphatase system. *Biochem. J.* 362, 513–532.

Varady, K.A., Bhutani, S., Klempel, M.C., Kroeger, C.M., Trepanowski, J.F., Haus, J.M., Hoddy, K.K., Calvo, Y., 2013. Alternate day fasting for weight loss in normal weight and overweight subjects: a randomized controlled trial. *Nutr. J.* 12.

Voet, D., Voet, J.G., Pratt, C.W., 2016. *Fundamentos De Bioquímica/ Fundamental of Biochemistry*. Ed. Médica Panamericana, 4ed.

Wan, R., Camandola, S., Mattson, M.P., 2003. Intermittent food deprivation improves cardiovascular and neuroendocrine responses to stress in rats. *J. Nutr.* 133, 1921–1929.

Wegman, M.P., Guo, M.H., Bennion, D.M., Shankar, M.N., Chrzanowski, S.M., Goldberg, L.A., Xu, J., Williams, T.A., Lu, X., Hsu, S.I., Anton, S.D., Leeuwenburgh, C., Brantly, M.L., 2015. Practicality of Intermittent Fasting in Humans and its Effect on Oxidative Stress and Genes Related to Aging and Metabolism. *Rejuvenation Research* 18, 162–172.

Wimmer, M., Wilmering, B., Sasse, D., 1985. The relation of rat liver wet weight to dry weight. *Histochemistry* 83, 571–572.

Wang, Z., Dong, C., 2019. Gluconeogenesis in Cancer: Function and Regulation of PEPCK, FBPase, and G6Pase. *Trends Cancer* 5, 30–45.

Zhang, X., Yang, S., Chen, J., Su, Z., 2019. Unraveling the Regulation of Hepatic Gluconeogenesis. *Front. Endocrinol.* 9.