



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

**PARTICIPACIÓN DEL EJE HORMONAL GHRELINA-HORMONA DE CRECIMIENTO-IGF-1
DURANTE LA EXPRESIÓN DEL OSCILADOR SINCRONIZADO POR ALIMENTO**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
LIBB ELVIRA DEL CARMEN ARELLANES LICEA

TUTOR:

DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. MARICELA LUNA MUÑOZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

DRA. IVETTE CALDELAS SÁNCHEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MÉXICO SEPTIEMBRE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

A Dios por estar conmigo siempre...Gracias. Te debo todas...

A mis papás -Lourdes y Jesús- por la libertad, por consentirme, por enseñarme, por su apoyo incondicional, por todos sus sacrificios por mí, por dejarme cumplir mis sueños y estar ahí cuando caigo y cuando me levanto. Por ser unos padres intachables, ha sido un privilegio ser su hija. Los amo.

A mis hermanas –Libertad, Tania y Brenda- por su compañía, por su apoyo incondicional a pesar de la distancia física, por siempre estar ahí para apoyarnos, por su cariño y por hacer mi vida más divertida. A mis sobrinos –Nina y Sebastián- porque la vida sin ustedes no sería la misma, los adoro, sus sonrisas y alegrías iluminan mi vida.

In memoriam a abuelita Elvira y mamá Carmen por ser unos ángeles que siguen cuidando de todos nosotros.

Al Dr. Eugenio Bustillos Sánchez y al Lic. Jorge García Torrecilla mi enorme y eterna gratitud, sin ustedes mi salud y el rumbo de mi vida no hubieran sido los mismos. Gracias por su invaluable ayuda y por ser una guía y luz en mí camino.

Amor, no se han inventado aún las palabras que expresen lo mucho que te amo y como agradecer a la vida el habernos cruzado y que me hayas enamorado. Eres el amor de mi vida. Gracias por el tiempo, por tu amistad y tus consejos, las enseñanzas, los regaños, la guía, los increíbles momentos, la crítica constructiva, la lealtad, honestidad, incondicionalidad y estar al pendiente de mí durante mi doctorado desde que nos hicimos amigos y fuiste mi maestro. Te amo tanto Pepe... Recuérdalo siempre.

Agradecimientos

Al Dr. Mauricio, quién fue conmigo un tutor impecable, un ser humano lleno de paciencia y amabilidad. Gracias por su disposición para trabajar y su accesibilidad para discutir los datos y planear los nuevos experimentos, sin importar la hora del día ó el día del calendario. Gracias por la libertad y confianza en todo y gracias por la guía en estos casi 6 años. Gracias por abrirme las puertas de su laboratorio, por su infinita comprensión y humanismo, por su apoyo inigualable.

A la Dra. Maricela, gracias por su orientación, sus críticas académicas y guía, por la hospitalidad durante mi segunda estancia académica, por todas las enseñanzas y el apoyo mi enorme, toda mi gratitud. A mis compañeros y amigos que conocí en el D-01, gracias por el tiempo compartido y su apoyo en todo momento. A la M.C. Martha Carranza Salas, por su apoyo y orientación técnica. Al Dr. Carlos Arámburo de la Hoz, por su crítica aguda y por su disposición en colaboración académica.

A la Dra. Ivette, gracias por ser parte de mi comité tutorial, por su crítica constructiva y su apoyo en todo momento para la orientación, el crecimiento y desarrollo de mi proyecto.

Al CONACYT por el apoyo otorgado a este trabajo con la beca de doctorado 317690 y los proyectos 49047 y 178335.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, un honor y privilegio haber sido parte de ti desde los 17 años y un placer el poder seguir perteneciendo. Al Instituto de Neurobiología por las enseñanzas, facilidades y por haber conocido a académicos y amigos inolvidables y por el Programa de Posgrado en Ciencias Biomédicas.

A mis compañeros y amigos que conocí a lo largo de mi estancia en el B-11, gracias por todas las enseñanzas y el aprendizaje adquirido, por su apoyo con las técnicas, por su crítica para el enriquecimiento de mi proyecto de doctorado y por todos sus comentarios, por las colaboraciones académicas y gracias por los divertidos lab meetings y los festejos.

A la Dra. Olivia Vázquez Martínez y al Sr. Raúl Calderón Aguilar, por su gran apoyo técnico, las asesorías y disposición para el adecuado desarrollo de los experimentos de esta Tesis.

A mi primer inolvidable y enriquecedora estancia académica en Ottawa, Canada: al Dr. Alfonso Abizaid Bucio, por el apoyo para la realización de los experimentos y el aprendizaje de un sistema de trabajo productivo y dinámico. A mis compañeros allá por su amabilidad y todo el apoyo cuando lo necesité.

A los Investigadores Sinodales quienes aceptaron ser parte de mi comité y revisores de mi Tesis: Dr. Rudolf Marinus Buijs, Dr. Manuel Miranda Anaya, Dr. Ranier Gutiérrez Mendoza y Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes, gracias por el tiempo y los constructivos comentarios.

Al posgrado del Doctorado en Ciencias Biomédicas del Instituto de Neurobiología, a Leo, Carmen y Lety, por su infinita paciencia, asesoría y apoyo desde mi admisión, candidatura, todos los congresos y la estancia, tutorales y desde luego la titulación.

A la Lic. Lourdes Lara Ayala, por su amable apoyo y orientación para la realización de las videoconferencias desde el Instituto de Neurobiología y todo su apoyo técnico durante mis exámenes.

A la Universidad del Valle de México campus Querétaro, por permitir mi desarrollo docente y por haber llegado cómo anillo al dedo.

Índice

1. Resumen
2. Abstract
3. Introducción
4. Antecedentes
 - 4.1 Ritmos Biológicos y el Oscilador Sincronizado por Alimento
 - 4.1.1 Clasificación de los ritmos biológicos e importancia fisiológica
 - 4.1.2 Componentes de los sistemas circadianos
 - 4.1.3 Bases moleculares de los ritmos circadianos
 - 4.1.4 El oscilador sincronizado por alimento
 - 4.2 Ghrelina
 - 4.2.1 Síntesis y secreción
 - 4.2.2 Fisiología
 - 4.2.3 Papel en el Oscilador Sincronizado por Alimento
 - 4.3 Hormona del Crecimiento
 - 4.3.1 Síntesis, secreción y regulación por hormonas hipotalámicas
 - 4.3.2 Fisiología
 - 4.3.3 Papel en el oscilador sincronizado por alimento
 - 4.4 Factor de crecimiento similar a insulina-1
 - 4.4.1 Síntesis y secreción

4.4.2 Fisiología

4.4.3 Papel en el Oscilador Sincronizado por Alimento

4.5 Regulación endocrina de la Ingesta del Alimento y el OSA

5. Planteamiento del Problema

6. Hipótesis

7. Objetivos

8. Material y Métodos

8.1 Diseño Experimental

8.2 Ingesta y somatometría

8.3 Extractos de tejidos

8.4 Western Blot

8.5 Mediciones hormonales

8.6 Análisis Estadísticos

9. Resultados

10. Discusión

11. Conclusiones

12. Referencias

13. Publicaciones

Abreviaturas

AAA	Actividad anticipatoria al alimento
AG	Ghrelinina acilada
GH	Hormona del Crecimiento
GHRH	Hormona liberadora de la hormona del crecimiento
GHSR	Receptor de secretagogos de la hormona del crecimiento
IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina-1
OSA	Oscilador sincronizado por alimento
pTAB	Tejido adiposo blanco perigonadal
RT	Restricción temporal de alimento
SS	Somatostatina
UAG	Ghrelinina no acilada

“All truths are easy to understand once they are discovered; the point is to discover them” Galileo Galilei.

1. Resumen

La alimentación en sí misma, es una señal externa ambiental ó *zeitgeber* dominante para órganos periféricos y puede sincronizar ritmos biológicos en estos. La restricción temporal del alimento en la fase de luz, es una estrategia experimental que en algunos roedores, promueve la emergencia de un reloj u oscilador biológico distribuido (i.e. constituido por diversos órganos y tejidos) denominado oscilador sincronizado por alimento (OSA). Las señales endocrinas cuya secreción está regulada por la transición de ciclos de ayuno y alimentación convergen en este oscilador. El presente estudio estuvo dirigido a caracterizar e investigar el sistema hormonal conformado por ghrelina, la hormona del crecimiento (GH) y el factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1) ya que su secreción depende de entre otros, factores rítmicos y nutricionales y los blancos de este sistema hormonal influyen la alimentación y el estado bioquímico de un organismo. Usando un diseño experimental que comprendió ocho tomas de muestras en un día, utilizamos ratas que fueron alimentadas *Ad libitum* (AL) comparando ratas en un protocolo de alimentación inversa (durante la fase de luz) y de acceso restringido temporalmente a 2 horas, por 3 semanas (RT), asimismo investigamos los efectos de un ayuno y realimentación de forma aguda por un día con el fin de

disociar los efectos propios de la emergencia del OSA en contraste a un solo ciclo de ayuno y realimentación.

Llevamos a cabo mediciones de la ingesta y peso corporal diario, expresión de la proteína reloj BMAL1, somatometría de órganos periféricos y determinamos la concentración de ghrelina total, acilada y no acilada, GH e IGF-1, tanto en suero como en su sitio principal de síntesis (estómago, hipófisis e hígado, respectivamente).

Durante la RT, la expresión de la proteína reloj BMAL1 estuvo sincronizada a la alimentación restringida en la hipófisis y en el hígado; las ratas exhibieron una hiperfagia aguda, distensión estomacal con un lento vaciamiento gástrico, un cambio de fase en la masa del hígado hacia el periodo de oscuridad y una disminución de la masa del tejido adiposo blanco perigonadal.

La secreción de ghrelina total durante el periodo de 24 h incrementó en el grupo RT como resultado de la elevación de la forma no acilada. En contraste, la concentración en suero de GH e IGF-1 disminuyó, con una modificación del patrón diario posterior a la ingesta restringida sólo de GH. En el grupo RT, el contenido proteico de ghrelina en el estómago y de GH en la glándula pituitaria disminuyó, en tanto el contenido hepático de IGF-1 permaneció sin cambios. Los patrones diarios y la síntesis de estas hormonas presentaron una adaptación reostática; esta respuesta adaptativa suscitada que implica a los componentes endocrinos aquí estudiados, sugiere que podría estar asociada a la regulación metabólica, conductual y a procesos fisiológicos que ocurren en la sincronización por alimento durante el paradigma experimental de la restricción temporal de alimento en la fase de luz y la actividad asociada del OSA, con una declinación de las funciones anabólicas hacia el manejo eficaz de nutrientes.

“It is the weight, not numbers of experiments that is to be regarded” Isaac Newton.

2. Abstract

Feeding time is the dominant *zeitgeber* for peripheral oscillators. Daytime restricted feeding promotes the re-alignment of the food entrained oscillator (FEO). Endocrine cues which secretion is regulated by the transition of fasting and feeding cycles converge in the FEO. The present study aimed to investigate the ghrelin, growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF)-1 system because their release depends on rhythmic and nutritional factors, and the output from this system influences feeding and biochemical status. In a daily sampling approach, rats that were fed *Ad libitum* (AL) were compared with rats on a reversed (daytime) and restricted feeding schedule by 3 weeks (dRF; food access for 2 h), also assessing the effect of acute fasting and refeeding.

We undertook measurements of clock protein BMAL1 and performed somatometry of peripheral organs and determined the concentration of total, acylated and unacylated ghrelin, GH and IGF-1 in both serum and in its main synthesising organs. During dRF, BMAL1 expression was synchronised to mealtime in hypophysis and liver; rats exhibited acute hyperphagia, stomach distension with a slow emptying, a phase shift in liver mass towards the dark period and decrease in mass perigonadal white adipose tissue. Total ghrelin secretion during the 24-h period increased in the dRF group as a result of elevation of the unacylated form. By contrast, GH and IGF-1 serum concentration fell, with a modification of

GH daily pattern after mealtime. In the dRF group, ghrelin content in the stomach and pituitary GH content decreased, whereas hepatic IGF-1 remained equal.

The daily patterns and synthesis of these hormones had a rheostatic adaptation. The endocrine adaptive response elicited suggests that it may be associated with the regulation of metabolic, behavioural and physiological processes during the paradigm of daytime restricted feeding and associated FEO activity; a decline of anabolic functions towards the efficacious handling of nutrients.

“No estudio por saber más, sino por ignorar menos”. Sor Juana Inés de la Cruz.

3. Introducción

Las manipulaciones experimentales que implican diferentes regímenes de alimentación y cambios en la exposición de los individuos a sincronizadores ambientales, en particular los no fóticos como el alimento, tienen importantes repercusiones en los organismos que se han estudiado, desde hace varias décadas.

El alimento es un *zeitgeber* que es sentido por diferentes órganos y sistemas secuencialmente y produce una amplia variedad de efectos dependiendo de su composición y su administración. En animales nocturnos como la rata, cuya fase de actividad y forrajeo se dan en la fase de oscuridad, representan un modelo en el cuál, se puede modificar en dos aspectos la alimentación: temporal e inversión hacia la fase de descanso, esto es durante la fase de luz.

Los antecedentes al presente trabajo, utilizando como organismo modelo a la rata, han analizado aspectos de lesiones en diversas áreas del sistema nervioso, actividad locomotriz, mediciones endocrinas, de metabolitos, de proteínas reloj y cambios funcionales en el hígado y otros tejidos periféricos durante la sincronización por alimento.

En el presente proyecto estudiamos, la participación de tres hormonas interconectadas: -ghrelina, GH e IGF-1- en la emergencia del oscilador sincronizado por alimento posterior a 21 días de alimentación restringida, con el objetivo inicial de caracterizar su síntesis y concentraciones en suero a lo largo del día y aspectos de la sincronización al alimento al

medir la proteína reloj BMAL1 y somatometría de diversos tejidos periféricos. Lo anterior para elucidar las variaciones diarias de estas hormonas a diferentes niveles, en función de la alimentación y asociarlos a cambios fisiológicos y metabólicos en el OSA cómo reguladores endocrinos las hormonas componentes de este sistema. La relevancia del estudio radica en qué es el primero en dónde se estudia de forma sistematizada estas hormonas, ya que presentan retroalimentación funcional entre ellas y regulan entre otras el crecimiento, apetito y el metabolismo de macronutrientes y en el contexto del OSA no se conocen en conjunto, su síntesis, secreción y su papel en este oscilador.

En la discusión de los resultados se resaltan los aspectos más relevantes y que sirvieron como base para establecer las conclusiones y los alcances de la presente tesis.

A partir de este trabajo se publicaron tres artículos, uno original y dos revisiones, además de una extensión del proyecto que se encuentran en curso experimental. Los artículos se muestran contenidos dentro del escrito de Tesis.

“A los científicos en particular y a todo hombre de ciencia recomiendo que conserven siempre el entusiasmo por la verdad que han tenido desde la primera hora, pero que al mismo tiempo le den por compañera inseparable a la crítica más severa... Nunca afirmen nada que no pueda ser demostrado fehacientemente y de manera sencilla y decisiva. Tengan el culto espíritu crítico, que reducido a sí mismo no despierta ideas ni estimula grandes propósitos, pero sin el cual todo es caduco. Este espíritu es un don a cultivar. Él tiene siempre la última palabra”. Louis Pasteur.

4. Antecedentes

4.1 Los Ritmos Biológicos

La presencia de ritmos biológicos es una característica fundamental en los seres vivos y un mecanismo adaptativo ante las diversas fluctuaciones cíclicas que se presentan en su medio ambiente externo. Todos los organismos que se han estudiado contienen osciladores biológicos que gobiernan sus procesos biológicos, desde el nivel subcelular como actividades metabólicas, celulares ó reproductivas, hasta diversas conductas y procesos de aprendizaje (Golombek, 2002; Koukkari y Sothorn, 2006).

En los sistemas vivos, la recurrencia de cualquier evento dentro de un sistema biológico a intervalos más o menos regulares puede ser considerada como un ritmo biológico. Dentro de los criterios para clasificar a los ritmos se incluyen: su frecuencia, el sistema biológico que lo presenta, la clase de procesos endógenos que lo genera, la función que éste cumple y su adaptación a los ciclos geofísicos (Aschoff, 1981).

Los ritmos biológicos se ajustan a los ciclos ambientales, siendo el más conspicuo y mejor estudiado el ciclo de luz y oscuridad generado por la sucesión entre el día y la noche. Un sincronizador ambiental, llamado también *zeitgeber* (del Alemán, dador de tiempo), ajusta los ritmos diarios. Sin embargo, aún en la ausencia del sincronizador ambiental, los ritmos

biológicos se mantienen, dada su propiedad endógena, por ser sustentados por un mecanismo interno de temporalización en los seres vivos, conocido como reloj biológico (Golombek, 2002; Koukkari y Sothorn, 2006; Pittendrigh, 1993).

El término reloj biológico, se refiere a las estructuras anatómicas y los mecanismos utilizados por los organismos para estimar el tiempo (Fig. 1), ajustar dicha estimación al tiempo geofísico, y generar la organización temporal interna que los caracteriza, como una propiedad fundamental en la adaptación hacia los cambios cíclicos ambientales (Pittendrigh, 1993).

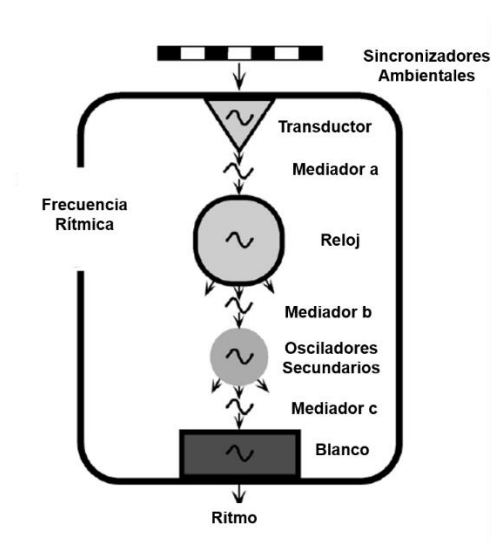


Figura 1: Los ritmos biológicos. Diagrama simplificado del mecanismo de cronometría circadiano (Modificado de Haus, 2007).

4.1.1 Clasificación de los ritmos biológicos e importancia fisiológica

Los ritmos biológicos se clasifican de acuerdo a la frecuencia de su oscilación y pueden ser circadianos, ultradianos e infradianos. La denominación circadiano (del Latín circa, cerca,

alrededor y días, día) se usa para referirse a los ritmos con periodos de entre 20 y 28 h, en general cercanos a las 24 h; los ritmos ultradianos tienen periodos más cortos que los circadianos y los ritmos infradianos, presentan periodos mayores en referencia a los circadianos (Refinetti, 2006).

Los ritmos biológicos se consideran como procesos homeostáticos del tipo predictivo o anticipatorio, en los cuales los mecanismos endógenos le permiten anticipar los cambios que ocurrirán un tiempo más tarde, es decir, de una manera pro-activa (Golombek, 2002; Dibner et al, 2010).

La interpretación fisiológica de los ritmos biológicos está asociada al concepto de reostasis. Esta noción se refiere a los procesos fisiológicos encargados de adaptar las funciones orgánicas a los cambios en las necesidades del organismo, o a las condiciones del ambiente en las que el organismo se encuentra; en general se refiere a la fisiología del cambio. Esto es, el punto de regulación de diversos procesos fisiológicos no puede ser único ni absoluto, porque obligaría hacia demandas energéticas que limitarían la capacidad adaptativa de un organismo. Por el contrario, el concepto de reostasis sugiere que el ajuste del punto de referencia de regulación de una variable fisiológica, cambia en función de las necesidades del organismo, puestas por las condiciones particulares del individuo respecto a su desarrollo o por el escenario ambiental que lo rodea (Mrosovsky, 1990; Gruart et al., 2002; Aguilar-Roblero, 2007).

Entre las propiedades de los ritmos circadianos es pertinente destacar que: están determinados genéticamente, compensan los cambios de la temperatura, no presentan una retroalimentación conductual y la mayoría se sincroniza por factores definidos del entorno. En

general, los ritmos biológicos son un programa de adaptación al medio cíclico y conllevan a una organización temporal de las actividades bioquímicas, fisiológicas y conductuales (Menaker 1969; Gruart et al., 2002).

Los ritmos circadianos se presentan en una gran variedad de grupos de organismos y se manifiestan en una vasta diversidad de funciones, por ejemplo, en procariontes unicelulares como las cianobacterias, se presentan en la fijación de nitrógeno, la fotosíntesis y la mitosis; en tanto que, en organismos eucariontes pluricelulares como la mosca de la fruta, los ritmos circadianos se reconocen en la locomoción, el sueño y la sensibilidad olfativa (Herzog, 2007). Diversas funciones en los seres humanos, muestran un orden temporal interno (Fig. 2), de tal manera que, las variables catabólicas suelen tener sus máximos durante el día, mientras que las anabólicas suelen tener sus picos de activación durante la noche siendo ejemplos de ritmos circadianos en esta especie (Golombek, 2002; Buijs y Kalsbeek, 2001).

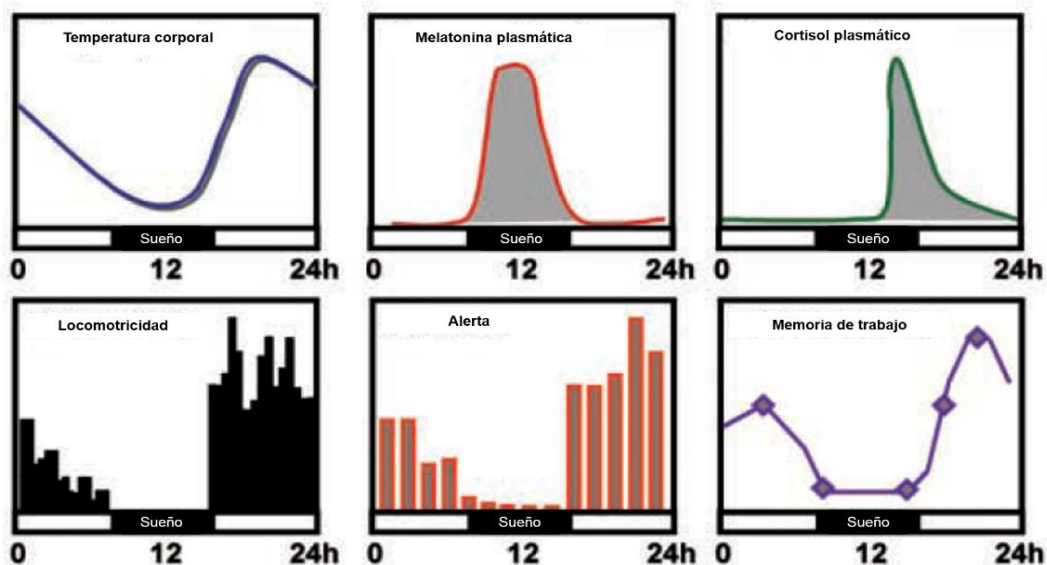


Figura 2: Ejemplos de ritmos circadianos en los seres humanos sincronizados al ciclo luz oscuridad. (Modificado de Challet y Mendoza, 2009).

4.1.2 Componentes de los sistemas circadianos

En los sistemas circadianos se reconocen tres componentes principales cuya interacción permite la generación de las fluctuaciones diarias y su ajuste al ciclo de rotación terrestre: a) el oscilador o marcapaso circadiano y los osciladores secundarios, b) las vías de entrada (aférentes) que sincronizan a los osciladores y c) las vías de salida (eferentes) que transmiten la información temporal a los osciladores periféricos, que regulan ritmos bioquímicos, fisiológicos y conductuales (Guido y de la Iglesia, 2002; Lowrey y Takahashi, 2004).

El núcleo supraquiasmático (NSQ) es el principal oscilador circadiano en los mamíferos (Stephan y Zucker, 1972; Moore, 1992). Es una estructura bilateral localizada en el hipotálamo ventral anterior, dorsal al quiasma óptico, rostral a las comisuras supraópticas y ventrolateral al receso quiasmático del tercer ventrículo (Aguilar-Roblero et al., 2002). El NSQ humano a diferencia de otros mamíferos, presenta un número mayor de neuronas inmunoreactivas al péptido neurotensina, distribuidas en todo el núcleo y exhibe un gran número de neuronas con neuropéptido Y (NPY). También se observan dos regiones distintas descritas como un centro, conteniendo neuronas que expresan péptido intestinal vasoactivo (VIP) y NPY, y una zona periférica con abundantes neuronas que contienen arginina vasopresina (AVP) (Aguilar-Roblero et al., 2002). Sin embargo, en la regulación y expresión de los ritmos circadianos participan osciladores periféricos presentes en diversos tejidos, que se ha propuesto que potencian el mensaje del oscilador central ó marcapasos y lo retroalimentan (Buijs, 2001).

La información fótica es recibida en la retina por las células ganglionares que contienen el pigmento fotosensible melanopsina, y es proyectada al NSQ vía el tracto retino-hipotalámico (Lowrey y Takahashi, 2004). Sin embargo el NSQ, además de las entradas fóticas, es responsivo a entradas no fóticas vía el núcleo dorsal y medio del Rafé, así como de la hojuela intergeniculada (Dibner et al., 2010). Las neuronas del NSQ proyectan a otras estructuras hipotalámicas cómo el núcleo dorsomedial ó paraventricular, aunque también ejercen su influencia vía señales humorales, regulando así el patrón hormonal de secreción rítmica de cortisol, hormona luteinizante, melatonina, así como la temporalidad del ciclo sueño/vigilia en los seres humanos (Fig. 2). Relacionado a este último, el sueño de ondas lentas promueve importantes efectos regulatorios positivos sobre la secreción de la GH (Buijs y Kalsbeek, 2001; Morris et al., 2011).

4.1.3 Bases moleculares de los ritmos circadianos

Los genes reloj son definidos como genes cuyos productos proteínicos son componentes necesarios para la generación y regulación de ritmos circadianos, esto es, proteínas que programan el mecanismo circadiano oscilatorio molecular en las células. Los ritmos de los genes reloj se originan de ciclos complejos de asas de retroalimentación autoregulatoria positivas y negativas de transcripción y traducción, que se regulan a nivel de interacciones proteína-proteína, fosforilación, acetilación, metilación, estado rédox, translocación nuclear y degradación de proteínas (Herzog, 2007; Lowrey y Takahashi, 2004; Bellet y Sassone-Corsi, 2010).

En mamíferos, esta asa de retroalimentación puede describirse desde los genes reloj Clock (circadian locomotor output cycles kaput) y Bmal1 (brain and muscle ARNT-like protein-1). El mRNA y la proteína de Clock se encuentran expresados constitutivamente en el NSQ, en tanto que el transcrito de Bmal1 tiene un pico en la mitad de la noche circadiana. CLOCK y BMAL1 (Fig. 3) heterodimerizan formando un complejo que activa la transcripción de genes blanco que contienen regiones promotoras en cis conocidas como caja E, como los genes Period (Per1-3) y Cryptochrome (Cry1-2). Las proteínas PER y CRY forman complejos hetero-multiméricos que anulan la actividad transcripcional del complejo CLOCK:BMAL1. El complejo proteico CLOCK:BMAL1 regula también la expresión de productos llamados genes controlados por genes reloj que son importantes en mediar la expresión circadiana particular de cada tejido y órgano (Lowrey y Takahashi, 2004).

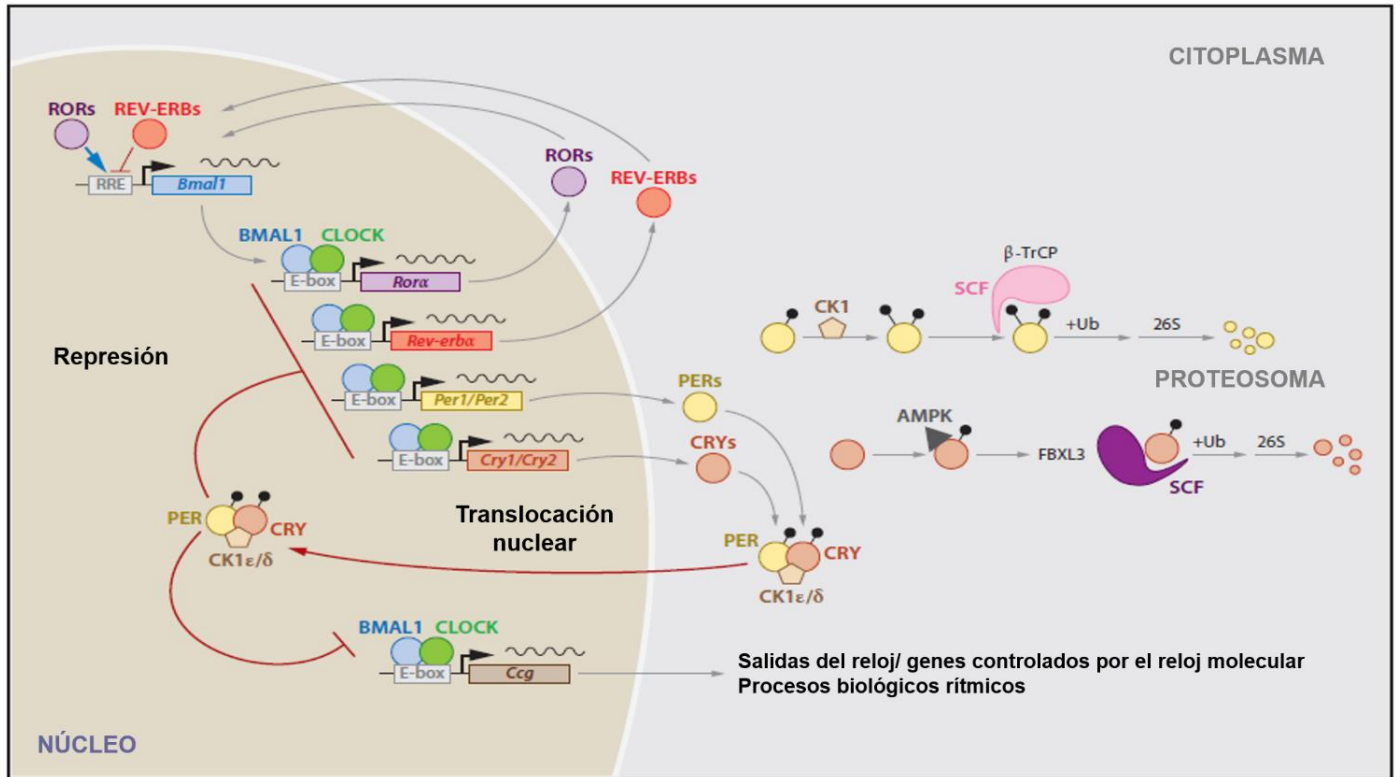


Figura 3: Mecanismo molecular del reloj circadiano en los mamíferos. Algunas de las siglas de los genes están descritas en el texto. RORs: receptor huérfano relacionado al receptor de ácido retinoico. REV-ERBs: receptor nuclear α y β . RRE: Elemento de respuesta a REV. CK1 ϵ/δ : caseína cinasa 1 ϵ/δ . SCF: proteína Skp-1-culina-caja F. β TrCP: proteína que contiene repeticiones de transducina β . +Ub: ubiquitina ligasa. 26S: complejo proteosomal. AMPK: cinasa de AMP. FBXL3: proteína 3 con caja F y repeticiones ricas en leucina. (Modificado de Mohakw, et al., 2012).

Los humanos y los vertebrados en general, tienen un conjunto similar de genes reloj que se expresan en la mayoría de las células. Se ha reportado que las células de sangre periférica mononucleares son un marcador de la expresión de estos genes y se han demostrado alteraciones en la expresión de genes reloj (BMAL1 y PER1-3) en pacientes con diabetes tipo 2 contra controles sanos (Cermakian y Boivin, 2009), reflejando un efecto del estado metabólico sobre algunos genes reloj.

Adicionalmente, dentro de las publicaciones logradas en este proyecto de doctorado, la siguiente revisión (Arellanes-Licea et al., 2014a), en la cuál mi participación fue revisar literatura actual del impacto metabólico y patológico de las mutaciones en el asa de retroalimentación positiva de los genes reloj y el papel de genes reloj, nutrición, entre otros, en el envejecimiento:

Review Article

The Circadian Timing System: A Recent Addition in the Physiological Mechanisms Underlying Pathological and Aging Processes

Elvira Arellanes-Licea, Ivette Caldelas, Dalia De Ita-Pérez and Mauricio Díaz-Muñoz*

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Ciudad de México 04510, D.F., MÉXICO

[Received October 5, 2013; Revised December 9, 2013; Accepted January 5, 2014]

4.1.4 El oscilador sincronizado por alimento

La ingestión del alimento es esencial para la supervivencia de los animales. El alimento ejerce una fuerte influencia metabólica y fisiológica hacia los tejidos, órganos y sistemas, de tal manera que el acto de la alimentación da múltiples señales que permiten la coordinación entre diversos órganos digestivos y la integración de éstas en diferentes áreas en el sistema nervioso central (SNC) (Refinetti, 2006). Cuando se restringe el acceso al alimento, se favorece la expresión de un reloj biológico que se sincroniza en función de la disponibilidad de nutrientes denominado Oscilador Sincronizado por Alimento (OSA) (Stephan, 2002).

En contraste con el oscilador sincronizado por luz, aún no se conoce el sustrato anatómico del OSA, el cual, para su expresión requiere de horarios restringidos temporalmente (RT) de

alimentación. El OSA, podría consistir de un sistema distribuido, que resida en una red de estructuras acopladas constituido por estructuras del SNC (que actúan como sensores del estado energético del organismo) como diferentes núcleos hipotalámicos, además de órganos periféricos (que controlan la asimilación, distribución y almacenamiento de nutrientes) como el hígado ó el estómago, por asas de retroalimentación a través de señales nerviosas ó humorales (Davidson, 2006; Escobar et al., 2008; Aguilar-Roblero y Díaz-Muñoz, 2010).

En el caso de los mamíferos, los ritmos circadianos conductuales y fisiológicos son sincronizados por el NSQ. El OSA es un oscilador circadiano semi-independiente del NSQ ya que se ha demostrado una red neuronal de interacción entre el NSQ y el hipotálamo dorsomedial en dónde este último inhibe la actividad del NSQ, lo que permite la actividad locomotriz (Acosta-Galvan, et al, 2011) cuya característica principal es que éste se manifiesta ante la RT. Se sabe que animales con lesión del NSQ mantuvieron la actividad anticipatoria al alimento (AAA), por lo que se postuló la existencia de otro oscilador circadiano, y que es susceptible de ser sincronizado por alimentación restringida temporalmente (Clarke y Coleman, 1986; Stephan, 2002). La caracterización de este oscilador, incluye pruebas conductuales (actividad locomotriz de anticipación al alimento) y el estudio de la participación de diferentes núcleos hipotalámicos y tejidos periféricos implicados en el metabolismo de nutrientes (Mistlberger 1994 y 2011).

Los roedores en condiciones de laboratorio, tienen un libre acceso al alimento a lo largo del día, y por lo tanto no buscan activamente por su alimento, a diferencia de los animales que se encuentran en su hábitat natural, donde el alimento no siempre está disponible, espacial o temporalmente, por lo que éstos tienen que poseer estrategias que les permitan tener mayor

eficiencia en la adquisición de su ingesta calórica (Schibler et al, 2003); a pesar de este hecho, los roedores en condiciones de experimentación en bioterios de laboratorio, conservan el patrón nocturno de ingesta del alimento.

Cuando el alimento funciona como una señal de tiempo ó *zeitgeber*, los organismos logran responder ante dicho estímulo con la manifestación de un cambio conductual, bioquímico y fisiológico reconocido la AAA, la cual se ha descrito en mamíferos (Mistlberger, 1994). La AAA es una salida del OSA, un fenómeno que implica cambios conductuales (aumento de actividad locomotora, búsqueda de alimento y mayor ingesta de agua) y fisiológicos (aumento de temperatura y corticosterona circulante y modificaciones en el estado energético en el hígado, entre otras) y que se presenta como un fenómeno que aparece horas previas (2-3 h) al acceso al alimento (Lima et al, 1981; Díaz-Muñoz et al, 2000; Stephan, 2002; Luna-Moreno et al., 2009) en alerta y preparación para que el organismo aproveche los nutrientes.

La AAA está asociada a la emergencia de un oscilador circadiano genuino: 1) No se presenta sí la disponibilidad de alimento esta fuera de los límites circadianos, 2) Persiste aún en condiciones constantes (luz u oscuridad) y en ausencia de señales medioambientales no fóticas, distintas al alimento, 3) desaparece enseguida de dar alimento *Ad libitum* y persiste en condiciones de ayuno durante varios días, 4) es susceptible a retrasos o avances en su fase debido a cambios en el horario de presentación del zeitgeber y 5) es susceptible a mutaciones en algunos genes reloj (Mistleberger, 1994; Stephan, 2002; Davidson, 2006).

Mecanísticamente, se propone que el OSA consiste en un asa de retroalimentación sostenida entre núcleos hipotalámicos de regulación de la alimentación y órganos periféricos que participan en la ingesta y el procesamiento de nutrientes, con la capacidad de

sincronizarse por un estímulo no fótico, el alimento (Aguilar-Roblero y Díaz-Muñoz, 2010; Blum et al, 2011). La fisiología del OSA tiene un componente reostático que se definió anteriormente y pertenece a la definición de reostasis reactiva, porque ocurre en respuesta a un estímulo, el cual puede o no ser encontrado por un organismo (Mrosovsky, 1991).

Recientemente, el OSA se ha definido como una propiedad emergente que lleva al organismo a un estado anticipatorio generalizado, con el propósito de optimizar el manejo de nutrientes y la producción de energía (Aguilar-Roblero y Díaz-Muñoz, 2010). También se han propuesto modelos del funcionamiento del OSA (Fig. 4), que abarcan un marcapasos agregado en donde el alimento es el sincronizador que afecta directamente a osciladores en el SNC y posteriormente a periféricos e impacta en la recompensa, el estado de alerta y la reostasis hacia la actividad anticipatoria al alimento (AAA), en otro modelo se considera como un marcapasos distribuido en el cual el alimento incide directamente sobre osciladores periféricos, modulando la reostasis, el estado de alerta y la recompensa en el OSA hacia la AAA y finalmente un modelo en el cual existen osciladores independientes en donde el alimento influye sobre el sistema olfativo y gustativo así como en la conducta y el metabolismo siendo distintos componentes del OSA y cuyas funciones se interconectan hacia la recompensa, el estado de alerta y la reostasis teniendo como salida la AAA (Blum, et al., 2011).

La sincronización por alimento de osciladores periféricos y la actividad anticipatoria al alimento es una salida de la expresión del OSA, la cual implica cambios conductuales y también metabólicos horas previas al acceso al alimento (Báez-Ruiz et al., 2005; Green et al., 2008; Báez-Ruiz et al., 2008; Aguilar-Roblero y Díaz-Muñoz 2010; Mendoza et al., 2010). También se ha propuesto que la anticipación al alimento, puede recaer en una red de relojes

en el sistema nervioso central (SNC), implicando sistemas metabólicos y de recompensa así como el cerebelo (Challet y Mendoza, 2010).

Las respuestas fisiológicas del apetito y la saciedad podrían estar implicadas en la sincronización de osciladores circadianos periféricos (Mendoza, 2006). En modelos de roedores donde se ha estudiado el OSA, durante la AAA se han presentado cambios en metabolitos tales como un aumento en la liberación de ácidos grasos libres (AGL) e incremento en cuerpos cetónicos y disminución en la glucemia, además, se ha reportado que justo durante la manifestación de la AAA, se presenta un vacío marcado del contenido gástrico, lo cual sugeriría una participación del estómago (Escobar et al., 1998; Martínez-Merlos et al., 2004; Rivera-Zavala et al., 2011; Pérez-Mendoza et al., 2014). El perfil bioquímico y fisiológico del hígado en particular y organelos como la mitocondria, adoptan un nuevo nivel de regulación y adaptación, constituyendo un estado reostático (Luna-Moreno et al., 2007; Díaz-Muñoz et al., 2000), bioquímicamente existen modificaciones en distintos parámetros fisiológicos hepáticos como el aumento en la síntesis de ATP, manejo de equivalentes reductores (NADH, NADPH) y consumo de oxígeno mitocondrial (Báez-Ruiz et al., 2005), la tendencia a mantener un estado reducido e hipotiroideo durante la AAA y oxidado e hipertiroideo al final de la alimentación (Aceves et al., 2003), cambios en la expresión de genes implicados en gran cantidad de procesos celulares, incluyendo genes reloj (Polidarová et al., 2011).

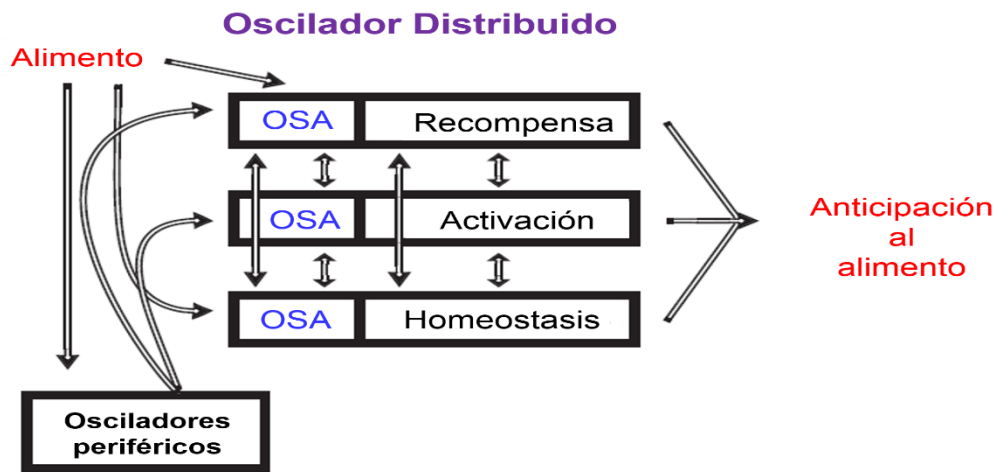
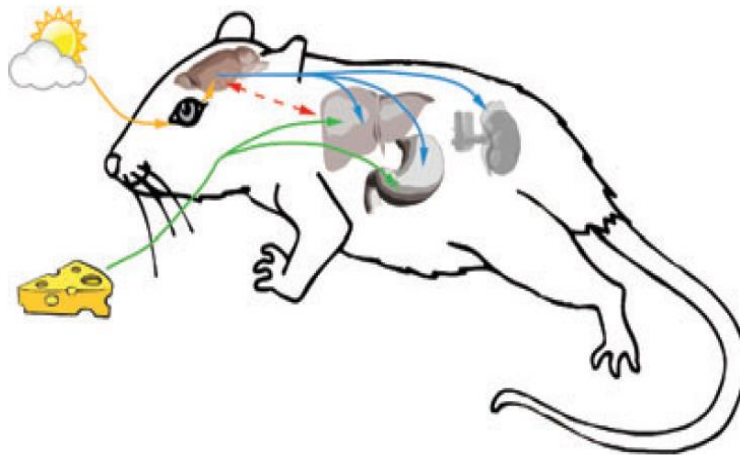


Figura 4: La caricatura muestra dos sincronizadores: un estímulo fótico y el otro no fótico (el alimento) en un modelo experimental. Las líneas verdes muestran cómo el sistema digestivo está en relación con el sistema nervioso (líneas azules) y la línea discontinua roja indica señales hormonales entre ambos sistemas. El modelo de cajas abajo, define al OSA como oscilador distribuido, con al menos tres componentes; dos conductuales (circuitos de recompensa y actividad locomotriz) y uno que regula la homeostasis entre otros, de energía, mostrando una salida: la actividad anticipatoria al alimento. (Modificado de Antle y Silver, 2009; Blum et al., 2011).

Durante la sincronización por alimento, de las distintas señales hormonales estudiadas, se encuentran hormonas como los glucocorticoides, insulina, leptina y glucagon (Krieger et al.,

1977; Díaz-Muñoz et al., 2000; Luna-Moreno et al., 2009; Davidson y Stephan, 1999; Martínez-Merlos et al., 2004; Pérez-Mendoza et al., 2014). La importancia de las señales endocrinas como un sistema regulatorio y una salida del OSA, han sido sugeridas (Carneiro y Araujo, 2009; Aguilar-Roblero y Díaz-Muñoz, 2010). Sin embargo, aquellas hormonas cuya secreción y papel fisiológico se dan en respuesta a la alternancia entre el ayuno y la alimentación restringida, aún no han sido estudiadas de manera sistemática, en particular la ghrelina, la GH y el IGF-1, por lo que su caracterización forma parte del objetivo principal este proyecto y las hormonas del sistema endocrino ghrelina, GH e IGF-1 y su interrelación son descritas a continuación.

Adicionalmente, dentro de las publicaciones logradas en este proyecto de doctorado, la siguiente revisión (Arellanes-Licea y Díaz-Muñoz, 2012) explica y muestra un modelo funcional de este sistema hormonal y ahonda en la fisiología de ghrelina, GH e IGF-1:

www.medigraphic.org.mx



Revista de Endocrinología y Nutrición
Vol. 20, No. 2 • Abril-Junio 2012 • pp 74-87

Revisión monográfica

Ritmicidad biológica de la secreción de ghrelina, GH e IGF-1, y su regulación por la alimentación

Elvira Arellanes-Licea,* Mauricio Díaz-Muñoz*

4.2 Ghrelina

4.2.1 Síntesis y secreción

La ghrelina (PM 3.37 kDa) es una hormona peptídica de 28 aminoácidos, con una modificación cotraduccional consistente en un grupo octanoil en la serina 3 y se le denomina ghrelina acilada (AG); aunque también se encuentra la forma no acilada ó ghrelina des-octanoilda (UAG). Alrededor del 70 - 90% de la concentración en plasma de ghrelina es UAG, explicado en parte por la corta vida media de la AG la cual es de ~8 minutos (Kojima et al., 1999; Hosoda y Kangawa, 2004). Se expresa y secreta principalmente en el estómago, por las células endocrinas de la glándula oxíntica; con síntesis en cantidades menores por otros órganos como el intestino, páncreas, placenta, riñón, testículos y el núcleo arcuato del hipotálamo (Kanamoto, 2004). Específicamente en ratas, las células que contienen ghrelina se localizan en la curvatura mayor de la pars glandularis y en la curvatura menor del estómago, en tanto en el estómago humano se localizan distribuidas en todas las regiones de éste aunque principalmente en el fondo (Li et al., 2011). La región promotora de su gen contiene cajas E, muy probablemente blanco de genes reloj que le confieran una síntesis regulada temporalmente (LeSauter et al., 2009).

La ghrelina total, es secretada en respuesta al ayuno, estimula el apetito y promueve la liberación de la hormona del crecimiento (GH) (Stanley et al., 2005; LeRoith et al., 2001); además, provoca un balance positivo de energía, controla la movilidad gástrica, la secreción de HCl, modula la función pancreática endocrina y el metabolismo de la glucosa, también ejerce efectos cardiovasculares y promueve la proliferación de adipocitos del tejido adiposo blanco (Wells, 2009; Veldhuis y Bowes, 2010; Lanfranco et al., 2010; Broglio et al., 2006).

La regulación de la secreción de ghrelina se no se conoce del todo. Sin embargo, la alimentación, glucosa (hiperglucemia) ó insulina la modulan disminuyéndola. Además se sabe que la somatostatina ejerce una fuerte inhibición de su secreción; en tanto, el sistema colinérgico la estimula. En condiciones patológicas, los niveles circulantes de ghrelina están reducidos en la obesidad, pero incrementados en la malnutrición, caquexia, y anorexia nerviosa (Veldhuis y Bowes, 2010).

4.2.2 Fisiología

Existen dos tipos de receptores de ghrelina, llamados growth hormone secretagogue receptor (GHSR), denominados 1a y 1b (Fig. 5). El tipo 1a es funcional y posee 7 dominios transmembranales, con expresión en somatotropos, núcleo arcuato, mucho menor en tiroides, páncreas, bazo, miocardio, adrenales, testículo, ovario e hígado, con una Kd de 0.1 nM (Gnanapavan et al., 2002; Davenport et al., 2005). La ghrelina activa una fosfolipasa-C específica de fosfatidilinositol a través de una proteína $G_{11\alpha}$ generando inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). El IP_3 desencadena la liberación de calcio de depósitos intracelulares, en tanto que el DAG activa a la proteína cinasa C. En somatotropos, la activación del receptor de ghrelina, lleva a la despolarización de la membrana, lo cual conduce a un incremento en las corrientes de canales de calcio tipo L y T. En células de hepatoma, la ghrelina induce la activación de blancos activados por insulina como el sustrato del receptor de insulina-1 (IRS-1), que es un intermediario en la transducción de señales de varias hormonas, a su vez IRS-1 inhibe la actividad de Akt y se regula a la alta la gluconeogénesis (Camiña et al., 2003). En el hipotálamo, la ghrelina regula el balance de energía vía AMPK (cinasa dependiente de AMP) (López et al., 2008).

Sin embargo, la ausencia de ghrelina total en modelos murinos ha demostrado que tiene un papel redundante en la regulación del apetito y cuyo el animal es sometido a una dieta alta en grasas la ghrelina tiene un papel prominente en la determinación del tipo de sustrato metabólico que es usado para la mantención del balance de energía, es decir, esta hormona disminuye la utilización de grasas y protege contra la obesidad de inicio temprano inducida por la dieta, fenotipo que también se presenta en ratones carentes del GHSR (Wortley et al, 2004 y 2005; Zigman et al., 2005; Sun et al., 2003).

Existe una regulación fisiológica de la ghrelina acilada, su receptor y la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH), sobre la regulación de la secreción de GH: la GHRH interactúa con el GHSR y en consecuencia modifica la vía de señalización de AG, específicamente GHRH se une al GHSR, incrementando la capacidad de unión a su ligando natural y no compite por la unión de AG, aumenta la afinidad a esta y despliega una cooperatividad positiva de unión (Casanueva et al., 2008). En seres humanos se ha encontrado que, en un grupo de pacientes con una lesión orgánica principalmente en el área hipotalámica, la ghrelina sola ó en combinación con GHRH no son capaces de liberar GH significativamente (Popovic et al., 2003).

En relación más directa, el GHSR está localizado en las neuronas positivas a GHRH; la AG incrementa la liberación de GHRH y disminuye la de somatostatina de explantes hipotalámicos e incrementa la excitabilidad de las neuronas que sintetizan GHRH ya que aumenta su proporción de disparo de potenciales de acción (Feng et al., 2011). Finalmente, el GHSR ha sido implicado en la regulación positiva en neuronas del núcleo arqueado de la expresión de GHSR, siendo otra vía por la cual la AG potencia la secreción de GH (Mano-

Otagiri, 2006), aunado a la acción directa de la AG sobre la secreción de GH a través de la expresión de su receptor en somatotropos (Kojima, et al., 1999).

4.2.3 Papel en el Oscilador Sincronizado por Alimento

Sobre el papel de la ghrelina en el OSA, al eliminar genéticamente su receptor GHSR-1a en ratones, se observó que la AAA disminuye, por lo que se sugirió que las células secretoras de ghrelina forman parte del OSA (LeSauter et al., 2009) Otro estudio, usando también un ratón deficiente del receptor de ghrelina (GHSR KO), muestra que la AAA se atenúa, correlacionándolo con un menor nivel de expresión de c-Fos en diversos núcleos hipotalámicos relacionados con la actividad locomotriz (Blum et al., 2009).

Los efectos fisiológicos de la UAG incluyen que la administración intracerebroventricular de ghrelina no acilada en roedores con alimentación libre estimuló la ingesta de alimento durante la fase de luz, independiente del GHSR-1a, no así la inyección intraperitoneal (Toshinai et al., 2001). Recientemente, se ha encontrado que la UAG es un péptido activo con acciones metabólicas (en lípidos por ejemplo) y no neuroendocrinas incluyendo acciones cardiovasculares y con efectos antiproliferativos mediados por un receptor distinto al GHSR-1a (Lanfranco et al., 2010).

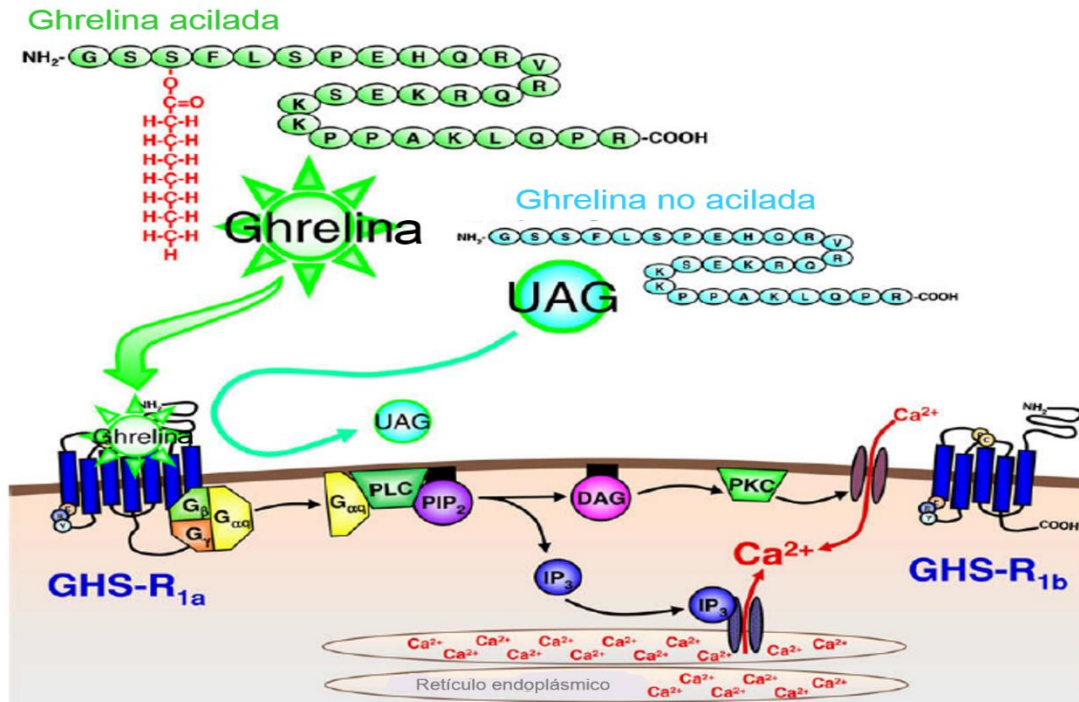


Figura 5: Isoformas de ghrelina y señalización por ghrelina acilada por el receptor GHSR. (Modificado de Wells, 2009).

4.3 Hormona del Crecimiento

4.3.1 Síntesis, secreción y regulación por hormonas hipotalámicas

La hormona del crecimiento (GH) es una proteína que contiene 191 aa en la mayoría de los vertebrados estudiados, de PM 22 kDa en su forma principal. Dentro de su estructura contiene cuatro residuos de cisteína conservados en las GH de todas las especies estudiadas, con lo que se forman dos puentes disulfuro (posiciones de aa 53-164 y 181-189) dando origen a una asa central grande y una más pequeña cercana al extremo carboxilo terminal. Las estructuras secundaria y terciaria de la GH están formadas por cuatro hélices α antiparalelas (Scanes, 1995).

Es una hormona secretada por los somatotropos de la hipófisis anterior (Pars distalis) de forma pulsátil y es regulada (Fig. 6) por el estado nutricional, la edad, situaciones de estrés, diferentes hormonas, estimulada por la neurohormona hormona liberadora de GH (GHRH) e inhibida por la somatostatina (SS), ambas hipotalámicas (Harvey, et al., 1995; Clemmons, 2004). En los seres humanos hombres adultos, su secreción tiene un patrón circadiano y presenta dimorfismo sexual, mientras que en roedores es ultradiano con una frecuencia de 3.3 h (Tannenbaum y Martin, 1976; Inagaki et al., 2006; Goldenberg y Barken, 2007).

La GHRH es una hormona hipotalámica, en rata consta de 43 aminoácidos que se expresa principalmente en el núcleo arcuato de mamíferos y que tiene como principal función estimular la secreción de GH a través de la unión específica a su receptor (Bloch et al., 1983), el GHRHR, es miembro de la familia de receptores acoplados a proteínas G cuya activación incrementa la concentración de cAMP citoplasmática y activa la vía de señalización de la proteína cinasa A (PKA) (Gaylinn et al, 1993). Adicionalmente, la GHRH estimula la proliferación, diferenciación y crecimiento de los somatotropos (Billestrup et al., 1986). Se le ha atribuido también que participa en otros procesos como la modulación del apetito y la regulación del sueño (Ehlers et al., 1985).

La SS por el otro lado, como un regulador hipotalámico crítico de la síntesis y secreción de GH, es un tetradecapéptido cíclico, en mamíferos, existen dos variantes moleculares: SS14 y SS28. Aislada originalmente en el hipotálamo de mamíferos, fue identificada como una inhibidora de la secreción de GH. Se sabe que la SS es un péptido multifuncional ampliamente distribuido a lo largo del sistema nervioso central y en tejidos periféricos (Reisine y Bell, 1995). Sus funciones incluyen la modulación de la neurotransmisión, secreción y proliferación celular (Patel, 1999) y la inhibición de la secreción de varias

hormonas (Florio et al., 1994). Su actividad biológica es mediada por una familia de receptores acoplados a proteínas G (SSR) con 5 subtipos (Patel, 1999).

La SS es el principal regulador negativo de la secreción de GH, ésta función inhibitoria se mantiene conservada en diferentes organismos. En mamíferos, la SS es esencial para mantener la pulsatilidad de la secreción de GH y se ha propuesto un modelo en el que GHRH y SS deben de ser secretadas alternadamente para estimular e inhibir esta secreción de GH (Tannenbaum et al., 1989).

4.3.2 Fisiología

El receptor de GH (GHR) es una proteína transmembranal que forma parte de la superfamilia de receptores de citocinas, que se homodimeriza por la unión del ligando y transduce a través de la familia de proteínas cinasas de tirosinas del tipo Janus cinasa (JAK) 2- transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT) 5, activando diferentes proteínas intracelulares entre ellos el IRS-1 (Pilecka et al., 2006). Durante el ayuno ocurre una disminución del GHR (Harvey, 1995; Clemmons y Underwood, 1991).

La actividad de la hormona del crecimiento por la unión a su receptor forma un complejo heterotrimérico, debido a que cada molécula de GH puede interaccionar con dos unidades del receptor a través de los dos sitios de unión que éste posee. El primero incluye la hélice 4 desde su región central hasta la región carboxilo terminal, mientras que el segundo sitio incluye la hélice 3 y la hélice 1 (Juárez-Aguilar et al., 1999). De esta manera, se forma un heterotrímero con atracciones intermoleculares, entre la hormona y las dos unidades del receptor, y entre ambos receptores a su vez (de Vos et al., 1992).

Los efectos que desencadena la GH, están relacionados con el crecimiento y el desarrollo de los organismos, además esta hormona regula diversos procesos fisiológicos, como el metabolismo de carbohidratos (favorece la gluconeogénesis y la hiperglucemia), de lípidos (regula el desarrollo de pre-adipocitos, aumenta la lipólisis y la oxidación hepática de lípidos) y de proteínas (promueve la síntesis de proteínas), además de que puede tener efectos contrarios a los de la insulina (LeRoith, 2001; Nørrelund, 2005). Una de las acciones más importantes de la GH, es el promover la síntesis de los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-1 y -2) en diversos tejidos, en particularmente en el hígado y de sus proteínas de unión a IGF-1 plasmáticas (IGFBP 1-7) y la subunidad ácido lábil (ALS). También, exhibe actividad sobre la proliferación y diferenciación celular. Estos efectos pueden ser directos sobre las células blanco o mediados a través de otros mensajeros, como es el caso del IGF-1, es decir serían efectos indirectos de la GH (Harvey 1995).

4.3.3 Papel en el Oscilador Sincronizado por Alimento

Por otro lado, sobre su participación en el OSA, se ha mostrado que en ratas, la hipofisectomía no evita la AAA, aunque si abole el aumento en la temperatura corporal pre-prandial (Davidson y Stephan, 1999). Sin embargo, este estudio también señala que las hormonas hipofisarias no necesariamente actuarían a nivel conductual, dejando abierta la posibilidad de ejercer un papel en la regulación del metabolismo característico del protocolo de restricción temporal de alimento, en el que se manifiesta el OSA, lo cual hasta el momento no ha sido estudiado.

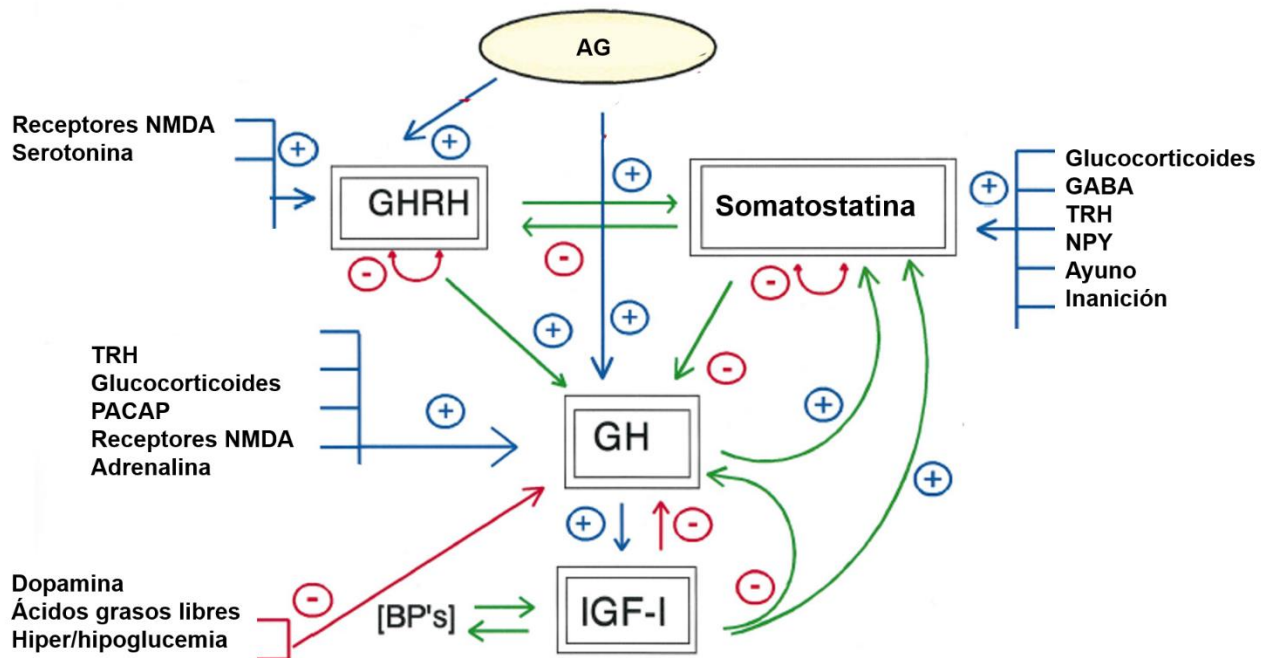


Figura 6: Regulación de la secreción de GH en rata, por algunos moduladores centrales y periféricos. La figura muestra en azul los estímulos positivos, en rojo los estímulos negativos y en verde la retroalimentación del propio eje al nivel del eje somatotrópico. Las siglas denotan: Receptores NMDA: receptores de glutamato N-meti-D-aspartato. GABA: ácido gama aminobutírico. TRH: hormona liberadora de la TSH. NPY: neuropéptido Y. PACAP: péptido activados de la adenilato cilcasa. BP's: proteínas de unión a IGF-1 (Modificado de Giustina y Veldhuis, 1998).

4.4 Factor de Crecimiento Similar a Insulina-1

4.4.1 Síntesis y secreción

El factor de crecimiento similar a insulina-1 (IGF-1), que es estructural y funcionalmente similar a la insulina (Froesch, 1985), es un polipéptido de 70 aa, PM 7.64 kDa. El IGF-1 circulante es sintetizado y secretado principalmente por el hígado, aunque la mayor parte de

los tejidos pueden producirlo y participa en el control del crecimiento celular en múltiples tejidos y órganos. También regula otros procesos anabólicos, como el estimular el transporte de aminoácidos y la síntesis de proteínas (Clemmons y Underwood, 1991).

Su síntesis y secreción depende de la GH, como fue explicado anteriormente, pero también de la disponibilidad de nutrientes. Su secreción disminuye en la inanición ó privación de nutrientes como proteínas y la malnutrición (Isley et al., 1983; Yakar et al., 1999; Stratikopoulos et al., 2008). En el torrente sanguíneo, existen siete tipos de proteínas transportadoras solubles de unión a IGF-1, las IGFBPs, de alta afinidad, que controlan su transporte, eflujo del compartimento vascular, la vida media y su asociación con el receptor de IGF-1; la ingesta de nutrientes es uno de los reguladores principales de las concentraciones plasmáticas de estas proteínas, el ayuno prolongado ó la deficiencia de proteínas da como resultado una disminución en la concentración en suero de IGFBP-3 (Clemmons y Underwood, 1991). La IGFBP-3 junto con otra proteína llamada subunidad ácido lábil, se unen al IGF-1 y forman un complejo heterotrimérico necesario para la unión al receptor.

Adicionalmente a los efectos similares a insulina, el IGF-1 exhibe un amplio rango de acciones biológicas que incluyen la proliferación y diferenciación celular, protección de la degradación de proteínas y es un factor anti-apoptótico, así como regulador de la GH (Párrizas y LeRoith, 1997). El IGF-1 está constituido de 4 dominios (A, B, C y D) y aunque su estructura es conservada, existen dos regiones que muestran una gran divergencia con otras especies, particularmente en los dominios C y D (Upton et al., 1998). El IGF-1 circulante ejerce una asa de retroalimentación en la secreción de GH tanto a nivel hipotalámico como a nivel hipofisiario (Giustina y Veldhuis, 1998).

4.4.2 Fisiología

Su receptor, IGF-1R, pertenece a la familia de receptores con actividad de cinasa de tirosina, tiene dos subunidades α y dos subunidades β , se expresa en la mayoría de los tejidos estudiados, aunque en el hígado tiene una expresión baja y es modulado por condiciones en las que se promueve la proliferación celular y tiene una afinidad alta por el ligando de 1×10^{-10} M (Frohman, 1995; Desbois-Mouthon et al., 2006). El IRS-1 es el principal sustrato del IGF-1R en su señalización intracelular el cual funciona como una plataforma de anclaje para otras proteínas que contienen dominios de homología a Src-2 (Taniguchi et al., 2006) Aunque se considera una relación funcional directa en el eje GH-IGF-1, cada hormona puede tener una función independiente (Harvey, 1995).

4.4.3 Papel en el Oscilador Sincronizado por Alimento

Cómo fue mencionado anteriormente, el único estudio en dónde podría estar involucrado el IGF-1 es en ratas hipofisectomizadas, en el cual no se estudiaron efectos metabólicos durante la restricción de alimento sino conductuales (Davidson y Stephan, 2009), esto deja abierto el campo de estudio de esta hormona durante el OSA.

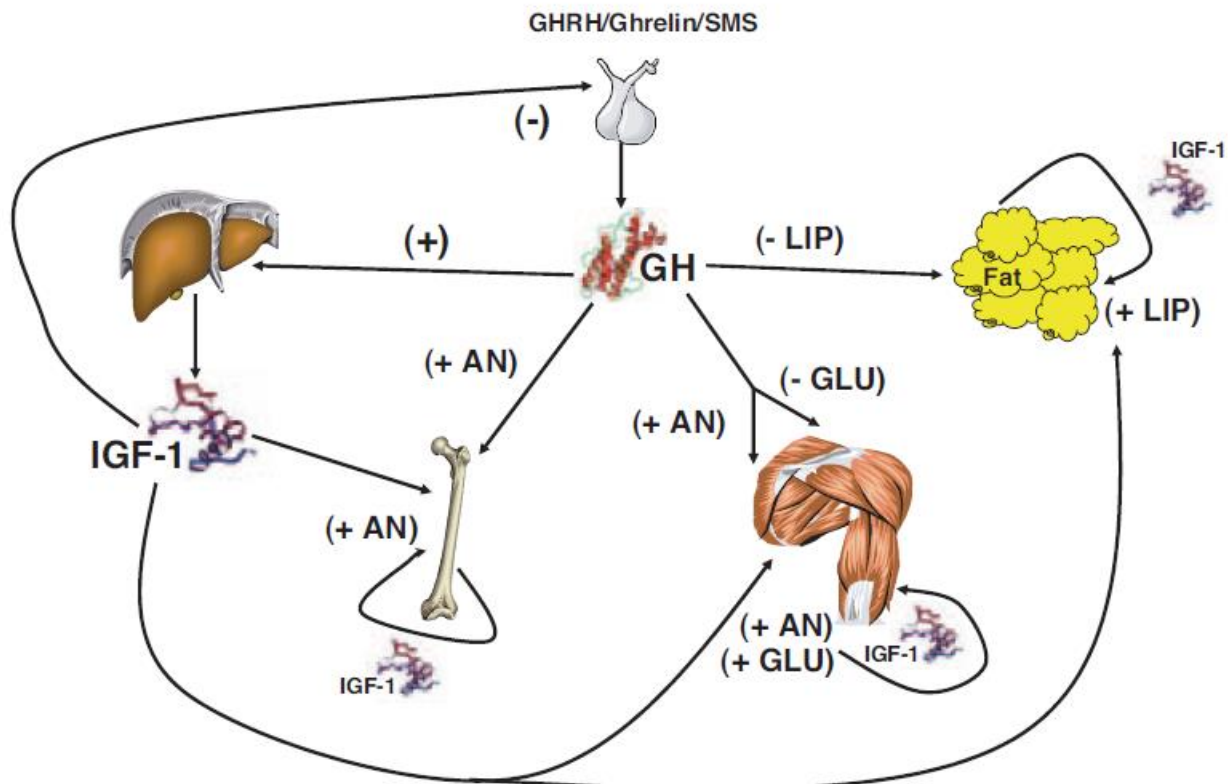


Figura 6: Regulación de la síntesis de IGF-1 y efectos metabólicos del eje somatotrópico en diferentes tejidos. AN: efecto anabólico, LIP: efecto lipolítico, GLU: efecto sobre la homeostasis de glucosa (Modificado de Kaplan y Cohen, 2007).

4.5 Regulación endocrina de la Ingesta del Alimento y el OSA

Los circuitos neuronales a través de los cuales el sistema nervioso (SN) recibe información de tipo nutricional ó metabólica, importantes en la regulación de la homeostasis de energía incluyen: señales olfativas y visuales, señales gustativas y entradas del nervio trigémino, información gastrointestinal y portal-hepática, señales de los nutrientes almacenados e información de las memorias almacenadas y neuropéptidos, así como una regulación

hormonal periférica, sin embargo es un proceso muy complejo (Berthoud, 2004; Schwartz et al., 2000).

El control periférico del apetito incluye a una variedad de hormonas como la ghrelina acilada, insulina, adiponectina, leptina, colecistocinina, polipéptido pancreático y al péptido similar al glucagón-1, entre otras. En conjunto estas hormonas regulan el hambre y la saciedad por su acción en el SN a través de la modulación de neuropéptidos como el neuropéptido Y (NPY), la pro-opiomelanocortina (POMC) y el péptido relacionado a Agouti (AgRP), (Figura 7).

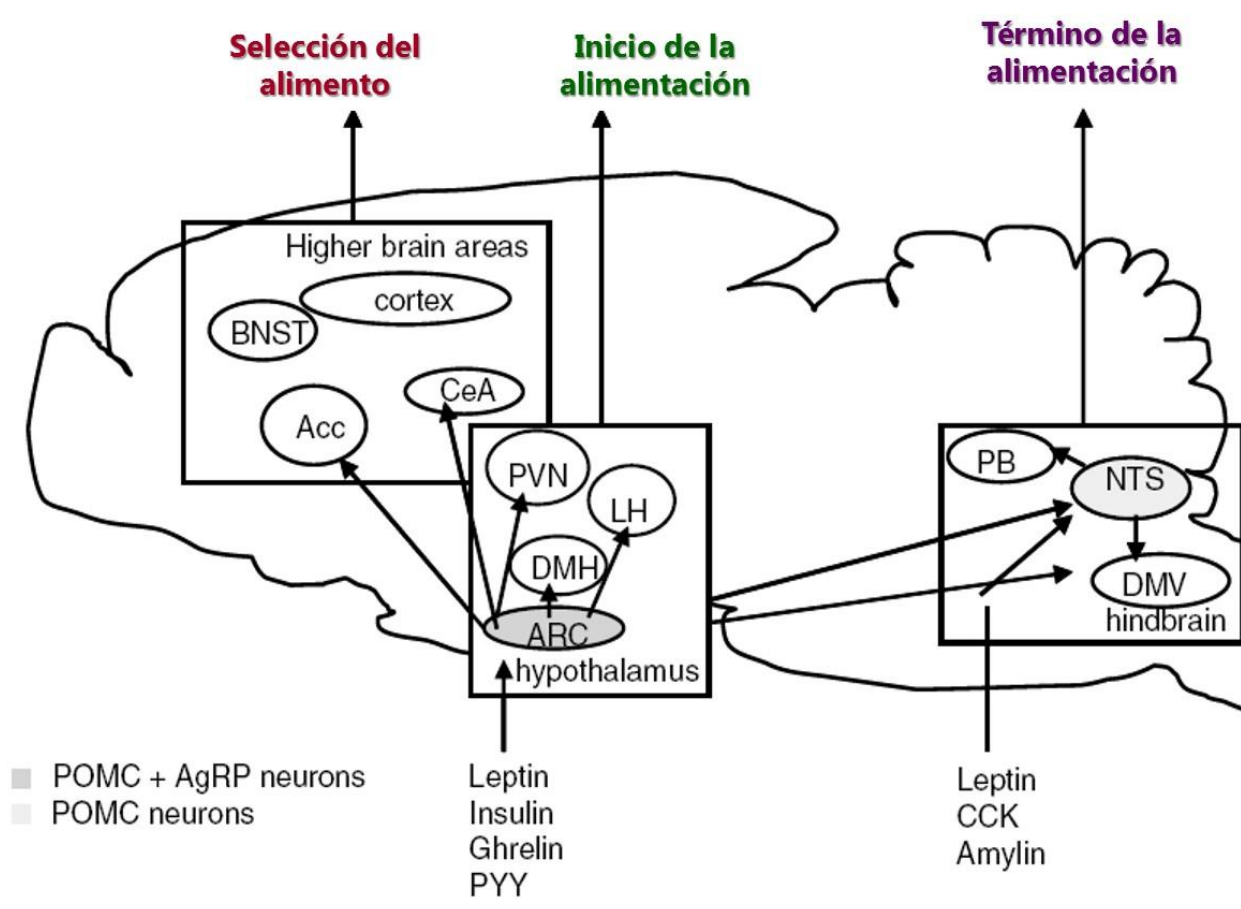


Figura 7: Control fisiológico del apetito por el sistema nervioso y endocrino. Las siglas significan: BNST= Cama del núcleo de la estria terminal, Acc= Núcleo accumbens, CeA=Núcleo central de la amígdala, Corteza cerebral PVN= núcleo paraventricular, LH= Hipotálamo lateral, DMH= Núcleo dorsomedial hipotalámico, ARC= Núcleo

arcuato, PB= Área parabraquial, NTS= Núcleo del tracto solitario, DMV= Núcleo dorsal motor del Vago, Cerebro medio.

En la fisiología del OSA, los niveles estudiados de hormonas (e.g. insulina, glucagon y leptina) y su regulación de las vías metabólicas, es importante considerar su actividad biológica en la regulación del apetito además, tomando en cuenta la hiperfagia que se presentan las ratas durante la restricción temporal de alimento, un candidato posible es la ghrelina acilada por su papel orexigénico (Cummings y Overduin, 2007).

5. Planteamiento del Problema

El funcionamiento del OSA implica una comunicación humoral y/o nerviosa entre órganos periféricos y del sistema nervioso. Por lo tanto, las señales endocrinas, cuya secreción sea regulada por la ingesta de alimento y el estado nutricional del organismo, podrían participar de forma significativa en la fisiología de este oscilador biológico, no se conoce la actividad del sistema coordinado ghrelina-GH-IGF-1.

6. Hipótesis

Durante la emergencia del OSA, las adaptaciones bioquímicas en el hígado, antes y después del acceso al alimento, así como la hiperfagia y la distensión del estómago posterior a la ingesta, darán lugar a cambios en la secreción y en el papel funcional del sistema hormonal ghrelina-GH-IGF-1.

7. Objetivos Generales

En un ciclo de 24 horas y comparando ratas control alimentadas ad libitum (AL) y en horario restringido de alimentación (RT) para promover la emergencia del OSA:

- 1.- Caracterizar el patrón de secreción de ghrelina total, acilada y no acilada, GH e IGF-1.
- 2.- Cuantificar el peso del estómago, hígado, hipófisis y el tejido adiposo blanco perigonadal.
- 3.- Analizar la concentración de ghrelina total, GH e IGF-1 en estómago, hipófisis e hígado respectivamente.
- 4.- Analizar los cambios en la expresión de la proteína reloj BMAL1 en el hígado, estómago e hipófisis.
- 5.- Correlacionar la secreción hormonal con parámetros metabólicos, humorales y conductuales.

“A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en el mar, pero el mar sería menos si le faltara una gota”. Agnes Gonxha Bojaxhiu, Madre Teresa de Calcuta.

8. Material y Métodos

8.1 Diseño Experimental

Individuos Experimentales. Ratas macho adultas *Rattus norvegicus*, de la cepa Wistar, con un peso de 180 ± 20 g al inicio de los experimentos, fueron mantenidas en un ciclo luz-oscuridad 12 h:12 h, con las luces encendidas a la hora geográfica 08:00 h (Zeitgeber Tiempo, ZT=0) a una temperatura constante de 22 ± 1 °C. La intensidad de la luz en la superficie de las cajas promedió 250 lux. Las ratas fueron mantenidas en grupos de 4-5 individuos en cajas de acrílico transparente con acceso libre al alimento y al agua (5001 rodent diet de LabDiet, MI, USA) a no ser que se especifique algo diferente. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados y conducidos de acuerdo a la guía Institucional para el cuidado y uso de animales bajo experimentación biomédica (Universidad Nacional Autónoma de México) y conforme a Estándares Éticos Internacionales (Portaluppi, 2010).

Diseño Experimental. El procedimiento experimental (realizado de acuerdo a Davidson y Stephan, 1999) se siguió con algunas modificaciones. Las ratas fueron asignadas al azar a los siguientes grupos experimentales:

a) Ratas control con alimentación ad libitum (Grupo AL) por 3 semanas.

b) Ratas con un estímulo doble: restricción temporal de alimento e inversión de la alimentación a la fase de luz, con una actividad aumentada del OSA (grupo RT) con 2 h de acceso al alimento diariamente de ZT 4-6 h por 3 semanas.

Incluimos grupos control con condiciones de alimentación aguda:

c) Ratas con un ayuno por un periodo simple de 21 h y sacrificadas en ZT 3 h (grupo F) y

d) Ratas con un ayuno simple de 22 h, posteriormente realimentadas por 2 h de ZT 4-6 h, y sacrificadas en ZT 6 h (grupo R).

Los individuos de los grupos AL y RT ($n = 4-5$) fueron sacrificados por decapitación cada 3 h en los horarios de Zeitgeber: 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, y 21 h para un muestreo para completar 24 h.

8.2 Ingesta y somatometría

La ingesta de alimento y el peso corporal fueron registrados en ZT 2 h diariamente de ratas mantenidas en grupos de 4 por caja: ratas AL ratas (posterior a 24 h de alimentación) y ratas RT (posterior a 2 h de alimentación) por 3 semanas. Al final del protocolo de alimentación, los pesos corporales (PC) de las ratas fueron determinados 20 minutos antes del sacrificio. La hipófisis completa fue cuidadosamente desprendida de las meninges y removida. Los estómagos fueron disectados incluyendo el contenido estomacal. Todos los lóbulos hepáticos fueron extraídos. El tejido adiposo blanco (WAT) perigonadal fue escindido, removiendo las gónadas y los vasos sanguíneos. Todos los tejidos fueron pesados rápidamente y pesados en fresco y puestos en hielo seco; esta medición fue normalizada al PC de cada rata.

8.3 Extractos de tejidos

Extractos de tejidos para determinaciones hormonales y Western Blot. Extractos hipofisarios básicos para la determinación de GH: después de disectar la glándula pituitaria, fueron puestas inmediatamente en hielo seco y almacenadas a -70°C . A cada muestra se le añadieron 100 μl de TBS 50 mM, pH 9, conteniendo el cóctel de inhibidores Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), el tejido fue homogenizado manualmente con un homogenizador de vidrio. El homogenado se transfirió a un nuevo tubo, y se adicionaron 30 μl del mismo amortiguador al primer homogenizador de vidrio para remover los restos de tejido y fue mezclado con el resto del tejido. Las muestras fueron agitadas a 4°C por 2 h y centrifugadas a 10,000 rpm por 20 min a 4°C , y el supernadante (enriquecido en GH) se recuperó. Extractos de proteínas solubles hipofisarias: A cada glándula recién descongelada, se le añadieron 100 μl de buffer 1X RIPA frío (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) conteniendo el cóctel de Complete Protease Inhibitor, amortiguador de homogenado de proteínas solubles (HB). El tejido se homogenizó automáticamente con un homogenizador de vidrio 5 veces, el homogenado se transfirió a un tubo nuevo, y el tejido remanente fue recuperado lavando el homogenizador con 50 μl del mismo buffer. Los tubos fueron centrifugados a 12,000 rpm por 20 min a 4°C , y el sobrenadante se colectó cuidadosamente para evitar contaminación con grasas, se alicuotó, y se almacenó a -70°C hasta su uso. Extractos de estómago: los estómagos (todo el tejido) fueron lavados 3 veces en PBS frío para remover cualquier partícula residual del bolo alimenticio y almacenadas a -70°C . El tejido fue descongelado, cortado en piezas pequeñas y mantenido a 4°C en un tubo de vidrio con 4 veces su volumen con HB frío. Los tejidos fueron homogenizados 5 veces con un Polytron PT1200 y después centrifugados a 12,000 g

por 30 min a 4°C (Li et al., 2011). El sobrenadante fué colectado cuidadosamente para evitar contaminación con lípidos, alicuotado y almacenado a -70°C hasta usarlo. Extractos hepáticos: el órgano fué cortado en piezas pequeñas de alrededor de 0.5 cm³, y fueron puestos en tubos individuales y almacenados a -70°C. Las piezas de hígado fueron descongeladas a 4°C e inmediatamente después de descongelarlas, se añadió HB frío (400 µl por pieza); la suspensión fue homogenizada en hielo 5 veces a 70 rpm en un homogenizador teflon-on-glass Potter-Elvehjem por 15-20 s. Después se centrifugaron a 12,000 g por 20 min a 4°C, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo para quitar la contaminación con lípidos, y se sometió a una segunda centrifugación por 10 min. El sobrenadante fué alicuotado y guardado a -70°C. El contenido proteico fue cuantificado por el procedimiento de microensayo basado en el método de Bradford siguiendo las instrucciones del proveedor (Bio-Rad, California, USA).

8.4 Western Blot

Western blotting. Las proteínas solubles de hipófisis, estómago e hígado, fueron procesadas cómo se describió anteriormente. El Western blot fue realizado cómo se ha reportado anteriormente (Alba-Betancourt et al., 2011). Las muestras (50 µg de proteína total) fueron mezcladas con buffers de carga 2X Laemmli, incubadas a 80°C por 5 min, y luego sujetas a electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), de una dimensión bajo condiciones reductoras, usando un gel de poliacrilamide al 10%. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad), bloqueadas por 1 h en leche sin grasa al 5% (p/v) (Bio-Rad), y después incubadas toda la noche a 4°C con los siguientes

anticuerpos por membrana: anti-BMAL1 (ab3350, Abcam, MA, USA) a una dilución 1:1000; anti-growth hormone secretagogue receptor type 1 (GHSR) a una dilución 1:500 (sc 20748, Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, CA, USA), y anti-tubulin (ab56676 Abcam) a una dilución 1:1000 en TPBS conteniendo 1% de leche. Las membranas fueron lavadas 3 veces con la solución TPBS y después incubadas por 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario apropiado, conjugado a fosfatasa alcalina (AP), (anti-conejo para BMAL1, anti-cabra para GHSR, o anti-ratón para tubulina) a una dilución 1:5000 (Santa Cruz Biotechnology). Las bandas fueron visualizadas usando el kit AP conjugate substrate kit (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del proveedor. Los blots fueron escaneados, digitalizados, y analizados con el programa Image J (version 1.38, NIH, USA). La expresión de las proteínas BMAL1 y GHSR están reportadas después de normalizar a la señal de tubulina.

8.5 Mediciones hormonales

Toma de muestras de sangre. La sangre del tronco se colectó en tubos para la separación del suero (BD Vacutainer, BD Diagnostics, NJ, USA). Se colectaron dos muestras de sangre: una para las mediciones de GH e IGF-1 sin algún aditivo, la segunda fue usada para las determinaciones de ghrelina total (tanto AG e UAG) y ghrelina acilada, con la adición de 1 mg/ml de Pefabloc SC (Roche Diagnostics). La sangre fué centrifugada a 3,500 rpm por 15 min a 4°C para obtener el suero. Para la cuantificación de GH e IGF-1, las alícuotas de suero fueron almacenadas a -70°C. En el caso de ghrelina total y acilada, se añadió HCl a una concentración final de 0.05 N a las muestras de suero para promover su estabilidad y posteriormente se almacenaron a -70°C (Hosoda y Kanwaga, 2004).

Mediciones hormonales. La GH fue cuantificada por el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), competitivo cómo se reportó por 33, usado una GH recombinante de rata (National Hormone y Peptide Program, NIDDKD, California, USA). El anticuerpo primario fué levantado en conejo policlonal anti-GH de rata (Millipore, MA, USA), fue usado a una dilución final de 1:60,000. Este anticuerpo es específico para GH de rata y no tiene reactividad cruzada con ninguna otra hormona de la glándula pituitaria (<0.001%). Posteriormente el anticuerpo secundario, conjugado a peroxidasa de rábano (HRP)-anti-IgG de conejo (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) se usó a una dilución de 1:3,000 en 1% (m/v) en leche libre de gras en TPBS (0.01 M fosfato de sodio, 0.15 mM NaCl, 0.05% m/v de Tween 20), pH 7, que se añadió a las muestras y a los estándares. Los anticuerpos secundarios unidos fueron detectados por la reacción con el sustrato 2,2' amino-di-(3-etilbenzotiazolina sulfato) (Roche Diagnostics). Todas las determinaciones fueron realizadas en triplicado con coeficientes de variación inter- e intraensayo de 4.1 y 4%, respectivamente. La ghrelina total fue cuantificada por un kit de ELISA con la configuración sandwich (Linco Research, Millipore) siguiendo las instrucciones del proveedor, y los coeficientes de variación inter- e intraensayo de fueron de 5.7 y 6%, respectivamente. La ghrelina acilada fué medida por un kit de ELISA con la configuración sándwich (Linco Research, Millipore) siguiendo las instrucciones del kit y usando 30 µl de muestra de suero; los coeficientes de variación inter- e intraensayo fueron de 5.9 y 5.4%, respectivamente. La proporción de ghrelina no acilada fue calculada de la proporción de ghrelina acilada a ghrelina total en la misma muestra de suero. El IGF-1 libre fue cuantificado con un kit de ELISA con la configuración sándwich (ALPCO Immunoassays, Salem, NH, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor; las determinaciones fueron realizadas en duplicado con coeficientes de variación inter- e intraensayo de 4.8 y 4.4%, respectivamente. La inmunoreactividad del contenido hormonal

en los extractos de tejido fue medido por ELISA cómo fue descrito en la sección anterior para cada hormona. El contenido total de GH se reporta relativo al peso de la glándula pituitaria, la concentración de proteína total en el extracto hipofisiario y la proteína GH y reportado cómo $\mu\text{g}/\text{hipófisis}$. El contenido de ghrelina total fué medido usando $2 \mu\text{g}$ de proteína total de estómago por pozo para detectar las dos isoformas de ghrelina y se expresó cómo ng de hormona por μg de proteína del estómago. El IGF-1 libre fue cuantificado usando $5 \mu\text{g}$ de proteínas totales hepáticas por pozo para cuantificar la cantidad de IGF-1 libre y fue expresada como ng de IGF-1 por μg de proteínas hepáticas.

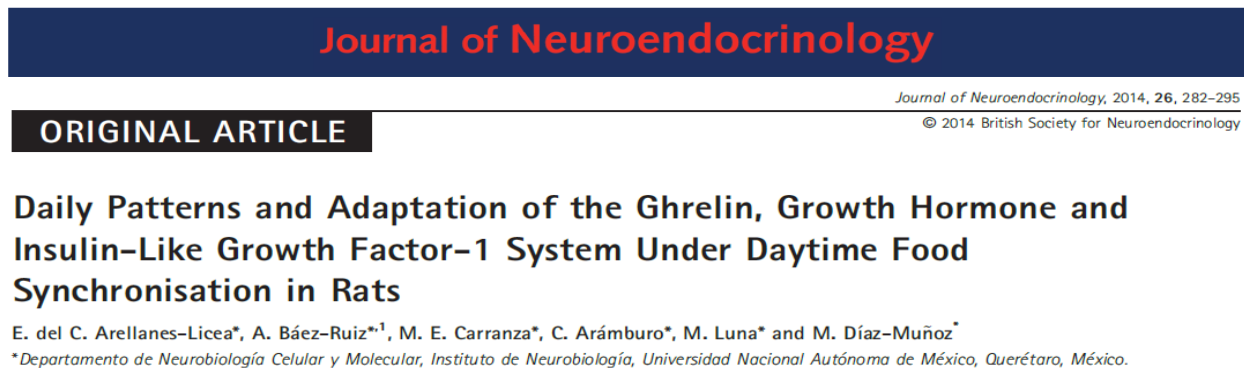
8.6 Análisis Estadísticos

Los datos están representados como el promedio \pm el error estándar de la media (EE). Para probar sí los datos de cada grupo de ratas (AL y RT) exhibieron cambios significativos intragrupo, se realizó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de la prueba post hoc de Tukey de múltiple comparación. Se usó una ANOVA de dos vías para determinar sí la condición alimeticia y el tiempo confirieron un factor de cambio entre esos dos grupos, seguido de la prueba post hoc Bonferroni. La prueba t de Student fue usada para comparar los grupos de condición alimenticia aguda (F y R) y el promedio de la variable en la fase de luz contra la fase de oscuridad. Todos los procedimientos estadísticos fueron analizados usando el programa GraphPad Prism (versión 5.00, CA, USA). El análisis de Cosinor (método de análisis de ritmos biológicos que consiste en ajustar los datos obtenidos a una función sinusoidal) se llevó a cabo por el programa Digital Analysis Sistema Applied to Chronobiology (DISPAC) (Aguilar-Roblero R.).

“Insanity: Doing the same thing over and over again and expecting different results”. Albert Einstein.

9. Resultados

Los resultados de este proyecto de doctorado fueron publicados en el siguiente artículo original:



En esta sección los resultados están en orden distinto al publicado, pero apegado a este, algunas figuras por separado y en el idioma Español:

Ingesta de Alimento y Crecimiento corporal

El peso corporal promedio de las ratas fue menor durante la restricción temporal de alimento, en tanto las ratas con libre acceso al alimento incrementaron su peso corporal en 3 semanas. Este incremento de peso corporal fué para el grupo AL de 61% y de 26% para el grupo RT, al final de los 21 días de tratamiento (Fig. 8A). La conducta de alimentación permaneció estable

en el grupo AL, en contraste la ingesta diaria de alimento en el grupo RT difirió del grupo AL en todos los días experimentales ($P < 0.001$) y mostró intragrupo un aumento significativo después de los 21 días de tratamiento ($P < 0.0001$) (Fig. 8B).

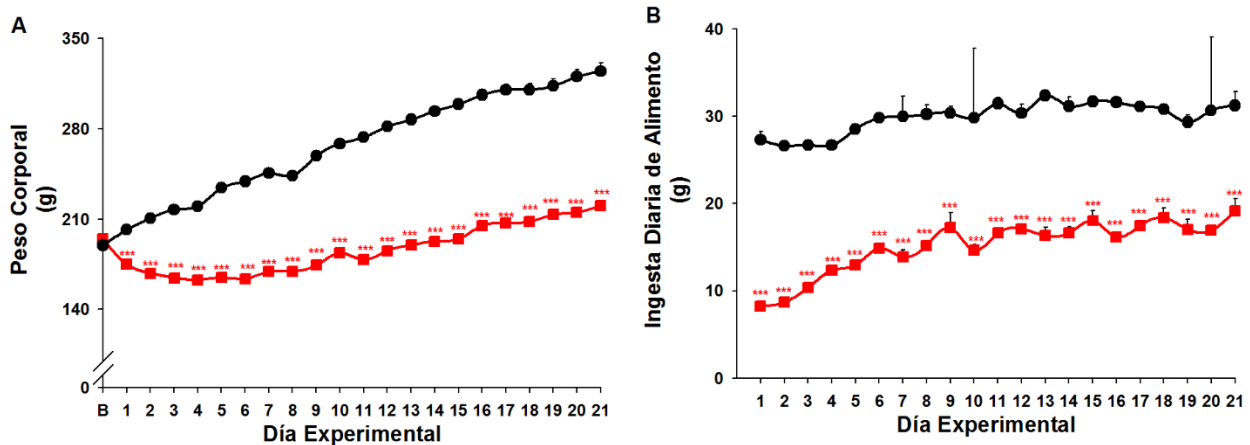


Figura 8: Peso corporal e ingesta de alimento diaria durante la restricción alimento. Los símbolos denotan a los grupos: AL círculos negros y RT cuadros rojos. Los datos se representan el promedio \pm EEM. A: Registro del peso corporal diario, $n = 12$, $P < 0.001$ RT vs. grupo AL en todos los días experimentales, por prueba post hoc Bonferroni. B: Ingesta diaria de alimento, $n = 3$ (4 ratas por caja), $P < 0.001$ RT vs. grupo AL en todos los días experimentales, por prueba post hoc Bonferroni.

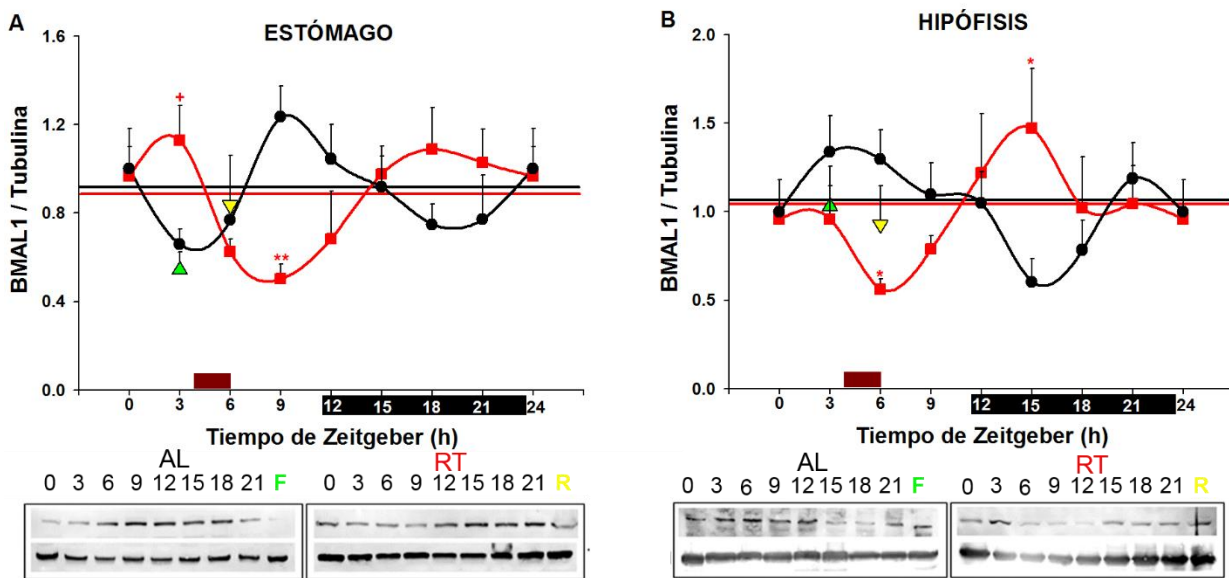
Expresión de la proteína reloj BMAL-1 en tejidos periféricos

Para evaluar la influencia de la RT en la maquinaria del reloj molecular, se analizó la expresión de la proteína reloj BMAL1 a lo largo de 24 h por Western blot. No se encontró ritmicidad en la proporción de BMAL1 a tubulina en las proteínas solubles de estómago en los grupos AL y Grupo RTs (Fig. 9A). El grupo RT mostró una reducción en BMAL1 después de la alimentación al ZT 9 h ($P < 0.01$). La expresión entre los grupos F y R no difirió. Los grupos F y RT al ZT 3 h fué distinta la expresión ya que hubo una elevación de la señal de BMAL1 en el estómago antes de la ingesta del alimento ($P < 0.05$).

La expresión de BMAL1 hipofisiario mostró un ritmo de 24 h en los grupos AL y RT ($P < 0.0001$, Fig. 9B). La acrofase en las ratas AL fué a la mitad del periodo de luz, en tanto, el

pico de BMAL1 en los individuos del grupo RT tuvo una inversión de fase de 12 h. De tal forma, hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los grupos AL y RT tanto en la fase de luz como en la de oscuridad.

Finalmente, hubo una clara oscilación diaria en la expresión de BMAL1 en el hígado ($P < 0.01$) con un patrón similar al encontrado en la hipófisis: un pico diurno en la condición AL, en cambio, en el grupo RT la acrofase fue en la fase de oscuridad (Fig. 9C). Por lo tanto, la cantidad de BMAL1 durante el periodo de luz y de oscuridad cambió significativamente entre estos dos grupos ($P < 0.05$). Los grupos F y R no mostraron una variación diaria en la expresión de BMAL1, y los valores fueron similares a la condición RT.



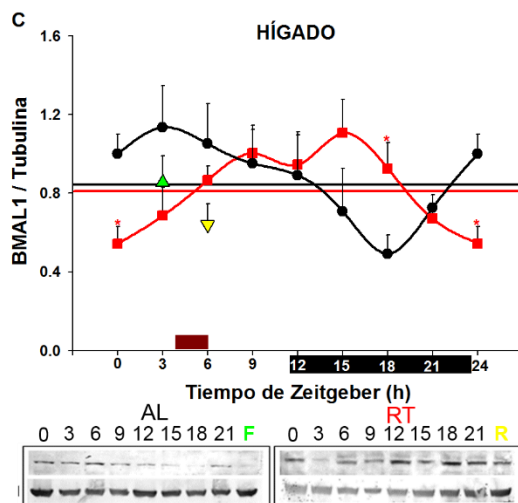


Figura 9: Expresión diaria de BMAL1 en el estómago, hipófisis e hígado durante la restricción de alimento. Los símbolos denotan a los grupos: AL círculos negros, RT cuadros rojos, F triángulo verde y R triángulo invertido amarillo. El rectángulo guinda indica el tiempo de acceso al alimento (ZT 4 a 6 h). Los datos se representan el promedio \pm EEM. La línea horizontal representa el promedio de 24 h. Perfiles diurnos y experimentos de Western blots representativos de BMAL1 en estómago (A), hipófisis (B), e hígado (C). $+P < 0.05$ RT al ZT 3 h vs grupo F. Los símbolos denotan $*P < 0.05$ y $**P < 0.01$ RT vs. grupo AL en el mismo punto temporal, por prueba post hoc Bonferroni.

Somatometría

Para estudiar el efecto de la restricción temporal de alimento en la fase de luz, sobre tejidos metabólicos importantes, se midió la proporción del peso en fresco del órgano disectado al peso corporal (PC). La somatometría del peso del estómago (con contenido) al PC reveló un ritmo claro de 24 h en los grupos AL y RT (Fig. 10A). De acuerdo a observaciones previas (Martínez-Merlos et al., 2004), encontramos un vaciamiento estomacal lento en el grupo RT y un grado remarcable de distensión del órgano. Después de la ingesta (ZT 6 h), se presentó un pico más de 10 veces mayor que el valor previo (ZT 3 h) en el grupo RT para la proporción peso del estómago/PC, y permaneció más alta en todos los puntos experimentales excepto preprandialmente durante la AAA al ZT 3 h y al final de la fase de oscuridad, al ZT 21 h. El valor promedio de esta proporción a lo largo del periodo de 24 h fué 170% mayor en el grupo RT que en el grupo AL ($P < 0.0001$), y ésta fue mayor durante las

fases de luz ($P < 0.0001$) y de oscuridad ($P < 0.0001$). En los grupos control de condición de alimentación aguda, ocurrió un incremento significativo de 4 veces en la somatometría del peso del estómago/PC en el ayuno de 22 h y la realimentación de 2 h (grupo R) contra el grupo de 22 h de ayuno (grupo F) ($P < 0.0001$). Sin duda, la distensión del estómago después de la ingesta es claramente más evidente en el grupo RT que con un ciclo simple de ayuno/realimentación ($P < 0.0001$).

La proporción hipófisis/PC, no presenta cambios rítmicos en los grupos AL y RT a lo largo del periodo de 24 h (Fig. 10B). Sin embargo, el grupo AL mostró un incremento significativo en la proporción hipófisis/PC en la fase de oscuridad que en la fase de luz ($P < 0.05$), y los valores nocturnos en el grupo AL también fueron mayores que los del grupo RT ($P < 0.05$).

La proporción del peso del hígado al PC (Fig. 10C) mostró un ritmo de 24 h en tanto el grupo AL y el grupo RT. El grupo control AL mostró un incremento de la proporción peso del hígado/PC durante su periodo de ingesta en la fase de oscuridad (~15%), en tanto en el grupo RT esta proporción mostró un cambio de fase de ~12 h hacia el periodo de acceso al alimento durante la fase de luz. El grupo AL presentó un mayor promedio del peso del hígado/PC que el grupo RT ($P < 0.05$). Los mayores valores de esta proporción ocurrieron durante la fase de luz en el grupo AL ($P < 0.01$) y durante la fase de luz en el grupo RT ($P < 0.0001$). Los grupos control de condición alimenticia (grupos F y R) no mostraron diferencia alguna, y sus valores fueron más similares a los que tuvo el grupo RT.

Con respecto a la somatometría del tejido adiposo blanco (WAT) perigonadal el grupo AL presentó una diferencia intragrupo con un pico al ZT 12 h, aunque sin ajuste Cosinor ($P = 0.84$), en tanto en el grupo RT no se detectó ritmo (Fig. 10D). Sin embargo la restricción

temporal en la fase de luz promovió un decremento significativo de la masa del WAT durante la AAA (ZT 3 h) y también durante la fase de oscuridad en ZT 12, 18 y 21 h con respecto al grupo AL. El valor promedio de la proporción de peso WAT/PC en el periodo de 24 h fue 32% menor en el grupo RT que en el grupo AL ($P < 0.0001$). Para el grupo AL, esta proporción aumentó en la fase de oscuridad ($P < 0.05$), y fue significativamente mayor que en el grupo RT en diferentes puntos temporales (Fig. 10D) tanto en la fase de luz ($P < 0.001$) como en la fase de oscuridad ($P < 0.0001$). Los valores de los pesos del WAT/PC para los grupos F y R no cambió entre ellos y fue similar a los resultados para el grupo RT.

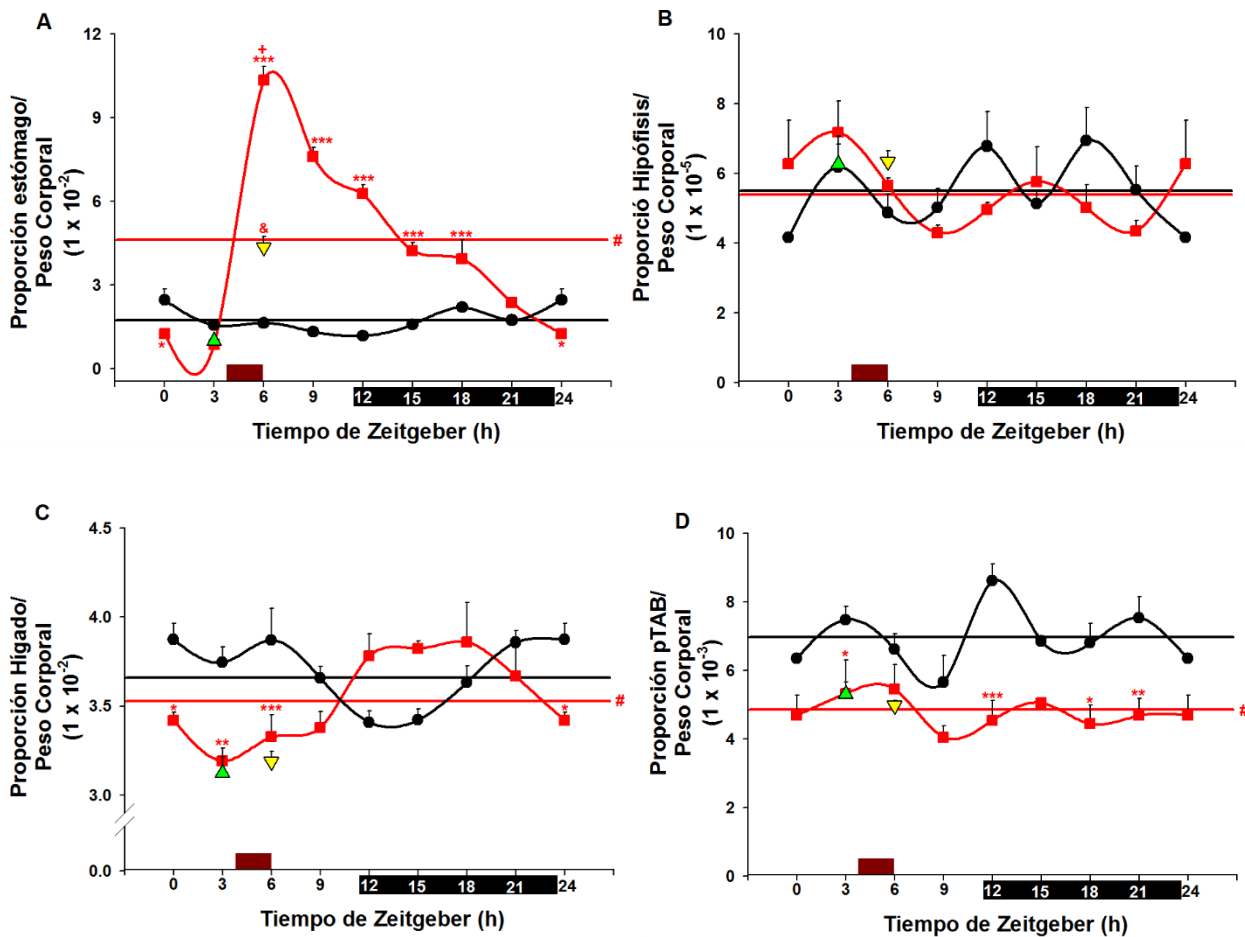


Figura 10: Somatometría de tejidos periféricos durante la restricción de alimento. Los símbolos denotan a los grupos: AL círculos negros, RT cuadros rojos, F triángulo verde y R triángulo invertido amarillo. El rectángulo guinda indica el tiempo de acceso al alimento (ZT 4 a 6 h). Los datos se representan el promedio \pm EEM. La línea horizontal representa el promedio de 24 h. A: Proporción estómago/PC, n = 8, #P < 0.0001 prueba t de Student contra el grupo AL; &P < 0.0001, R contra F; +P < 0.0001, RT al ZT 6 h contra R. B: Proporción hipófisis/PC, n = 8. C: Proporción hígado/PC, n = 8-7, #P < 0.05 prueba t de Student contra el grupo AL. D: Proporción eTAB bilateral/PC, n = 4, #P < 0.0001 prueba t de Student contra el grupo AL. Los símbolos denotan *P < 0.05, **P < 0.01 y ***P < 0.001 RT contra el grupo AL en el mismo punto temporal seguido de la prueba post hoc Bonferroni.

Patrones diarios de secreción del sistema ghrelina, GH, IGF-1

En la caracterización de los patrones diarios de la concentración de ghrelina total en suero durante el re-alineamiento del OSA y las variaciones comparadas contra el grupo con alimentación *ad libitum*, el grupo AL mostró una variación diurna de la ghrelina total en suero, con una mayor concentración durante la fase de luz (P < 0.01) (Fig. 11A). En contraste, el grupo RT mostró un patrón secretorio con dos picos en la ghrelina total en suero, uno durante la AAA (al ZT 3 h), y la otra a la mitad de la fase de oscuridad (al ZT 18 h) (Fig. 11A). El promedio de la secreción de ghrelina total en el grupo AL fue 0.97 ± 0.05 , y para el grupo RT fue de 1.60 ± 0.12 ng/ml, lo cual implicó un aumento significativo del 65% contra el grupo AL y reflejó una mayor concentración de ghrelina total en tanto la fase de luz (P < 0.05) y la fase de oscuridad (P < 0.0001). Además, el grupo control F mostró una mayor concentración de ghrelina total en suero que el grupo R, como se esperaba después de un episodio de ayuno (P < 0.05); sin embargo, esta liberación de ghrelina total no fue distinta del grupo RT al ZT 3 y al 6 h, respectivamente (Fig. 11A).

Con respecto al estudio de los patrones diarios de los componentes de este sistema hormonal, en un ciclo de 24 h, la concentración en suero de GH no mostró algún ritmo en el grupo AL, debido al protocolo de muestreo usado y a la naturaleza ultradiana del patrón de secreción e suero de GH en ratas macho (Tannenbaum y Martin, 1976). En contraste, el valor promedio de la concentración en suero de GH en el grupo RT fue significativamente menor que en el grupo AL, a pesar de un pico justo después del acceso al alimento (al ZT 6 h) (Fig. 11B). El valor promedio de las 24 h de la concentración en suero de GH en el grupo AL fue 59.38 ± 3.28 ng/ml, y en el grupo RT fue de 40.52 ± 2.78 ng/ml, con una disminución significativa del 32% ($P < 0.0001$). No se observaron cambios entre los grupos controles de condición alimenticia (F y R). Sorprendentemente, la concentración en suero de GH al ZT 6 h durante la RT fue mayor que la concentración en el mismo tiempo en el grupo R ($P < 0.05$), mostrando una diferencia notable como consecuencia de la restricción temporal de alimento en la fase de luz, a pesar del similar intervalos de ayuno de ambos grupos.

Con respecto a la caracterización de la secreción de IGF-1 en suero, los grupos AL y RT no mostraron ritmo. Sin embargo, en paralelo a la concentración en suero de GH, el grupo RT mostró un decremento significativo del 30 % en el ciclo de 24 h en la concentración circulante de IGF-1 ($P < 0.0001$) (Fig. 11C). El promedio para el grupo AL fue $2,475 \pm 110$, en tanto en el grupo RT fue de $1,728 \pm 101$ ng/ml, indicando una menor concentración de IGF-1 en el segundo en tanto la fase de luz ($P < 0.01$) y oscuridad ($P < 0.001$). No encontramos diferencias entre los grupos F y R, los cuales tuvieron una concentración de IGF-1 similar a la del grupo RT.

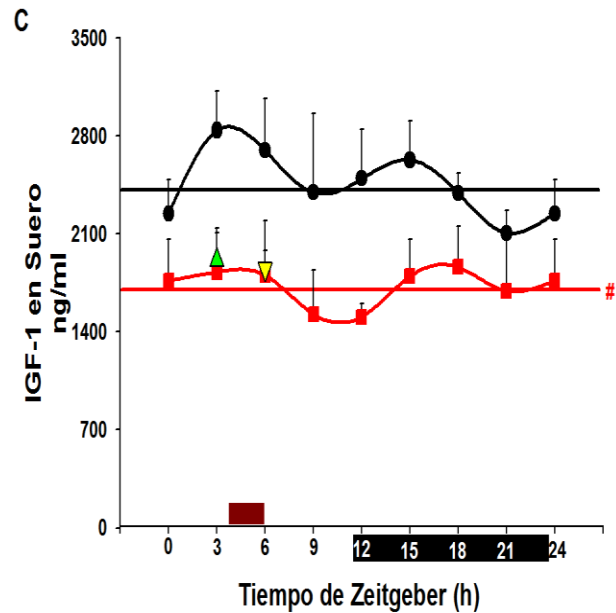
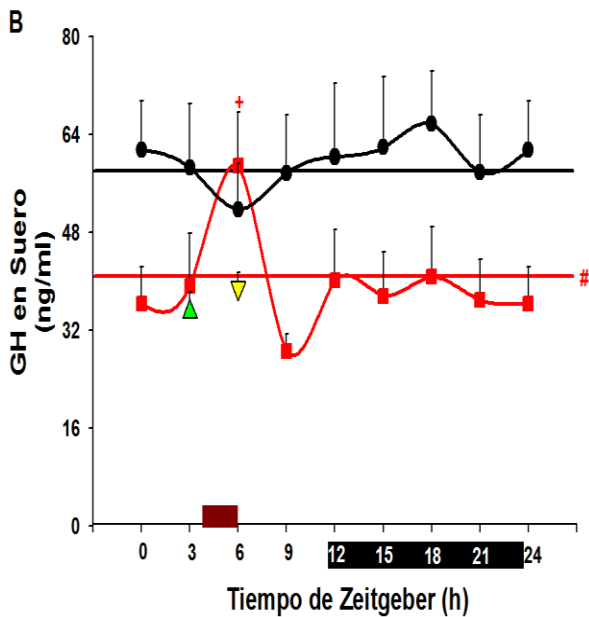
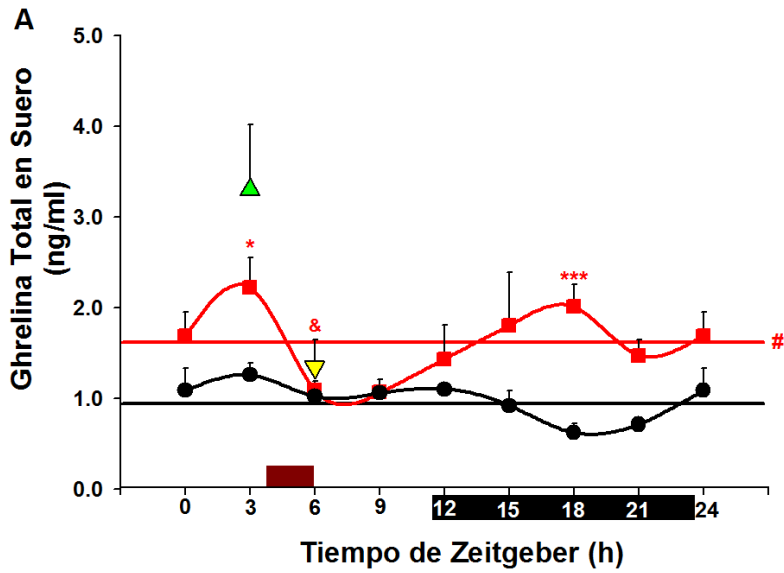


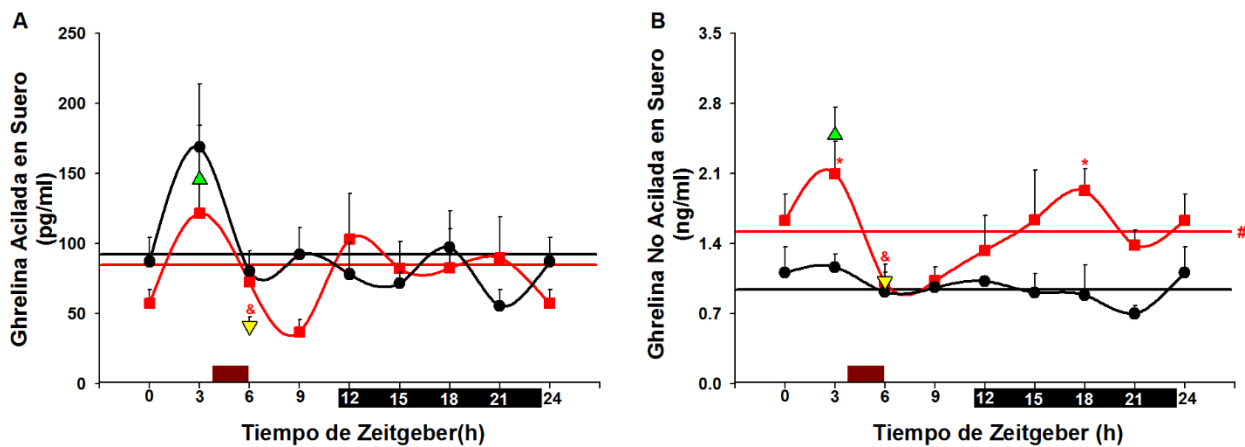
Figura 11: Caracterización de la concentración circulante del sistema ghrelina, GH e IGF-1 durante la restricción de alimento. Los símbolos denotan a los grupos: AL círculos negros, RT cuadros rojos, F triángulo verde y R triángulo invertido amarillo. El rectángulo guinda indica el tiempo de acceso al alimento (ZT 4 a 6 h). Los datos se representan el promedio \pm EEM. La línea horizontal representa el promedio de 24 h. Concentraciones en suero de A: Ghrelina total, $n = 5-6$, # $P < 0.0001$ prueba t de Student contra el grupo AL; & $P < 0.05$ R contra F. B: GH, $n = 8$ excepto en RT al ZT 9 h $n = 4$, # $P < 0.0001$ prueba t de Student contra el grupo AL; + $P < 0.05$ RT al ZT 6 h contra R. C: IGF-1, $n = 4-5$, # $P < 0.0001$ prueba t de Student contra el grupo AL. Los símbolos denotan * $P < 0.05$ y *** $P < 0.001$ RT contra el grupo AL en el mismo punto temporal por prueba post hoc Bonferroni.

Caracterización de la composición de ghrelina total

Para evaluar la composición de la concentración en suero ghrelina total, i.e. la isoforma acilada y no acilada ghrelina (AG y UAG, respectivamente) estas fueron medidas en la misma muestra. La AG en el grupo AL mostró un patrón rítmico que tuvo un pico durante la fase de luz al ZT 3 h ($P < 0.05$) sin ajuste Cosinor (Fig. 12A). Inesperadamente, el patrón del grupo RT no fue rítmico. Los valores promedio en el periodo de 24 h de AG en suero no cambiaron entre los grupos, en el grupo AL fue de 91.24 ± 8.97 , y para el grupo RT fue de 80.62 ± 8.42 pg/ml, sin cambios entre estos dos regímenes de alimentación relacionados al ciclo L/O (Fig. 12A). No hubo diferencias entre los grupos de ayuno y realimentación y el grupo RT; sin embargo, en el ayuno agudo, la concentración en suero de AG fue mayor en el grupo F que en el grupo R ($P < 0.05$).

Al analizar la concentración en suero de UAG, fue similar al patrón de secreción de ghrelina total, por lo cual el grupo AL no exhibió variaciones durante el día, en tanto el grupo RT mostró un patrón con dos picos, al ZT 3 y al ZT 18 h, como se observó para la ghrelina total circulante (Fig. 12B). El valor promedio de la secreción de UAG fue de 0.96 ± 0.06 en el grupo AL y 1.51 ± 0.11 ng/ml en el grupo RT, significando un incremento del 57% en el grupo RT ($P < 0.0001$). Adicionalmente, el grupo RT mostró más UAG circulante en tanto la fase de luz ($P < 0.05$) y oscuridad ($P < 0.001$). Las ratas del grupo F exhibieron una mayor concentración circulante de UAG que el grupo R (Fig. 12B), en tanto la concentración en suero de UAG en el grupo F y el grupo R fue similar al del grupo RT en los mismos puntos temporales.

Para analizar los cambios en las cantidades relativas de AG y UAG circulantes, evaluamos la proporción de UAG/AG (Fig. 12C). Como esperábamos, la concentración de UAG sobrepasó por 7 a 30 veces la concentración de AG en tanto los grupos AL y RT. Para el grupo RT, la proporción UAG/AG fue 66% mayor, en contraste al grupo AL ($P < 0.0001$) y significativamente mayor durante la fase luz ($P < 0.001$), sugiriendo un efecto del tiempo restringido de acceso al alimento. Interesantemente, la proporción UAG a ghrelina total en el suero fue mayor en el grupo RT, incluso mayor al valor de referencia para roedores bajo alimentación *Ad libitum* (Hosoda y Kangawa, 2004). En contraste, en los grupos control de alimentación, la proporción UAG/AG permaneció inalterada, reflejando el hecho de que los cambios en esta proporción son una consecuencia de la restricción alimenticia en la fase de luz (Fig. 12C).



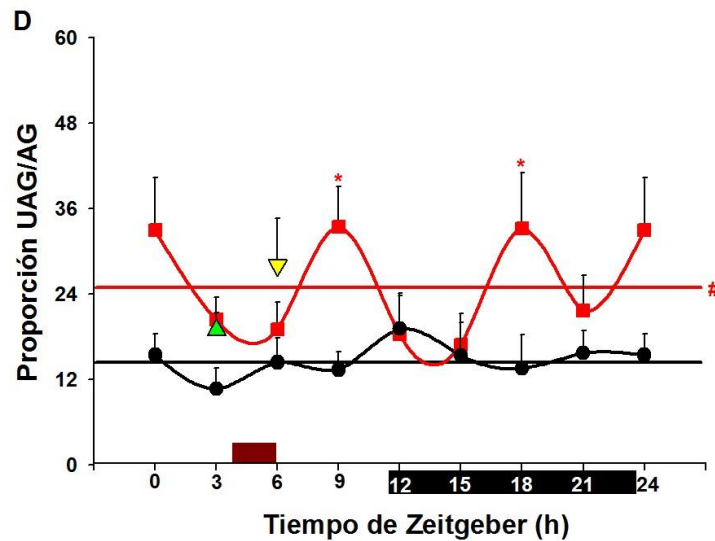


Figura 12: Caracterización de la composición de ghrelina total bajo la restricción de alimento. Los símbolos denotan a los grupos: AL círculos negros, RT cuadros rojos, F triángulo verde y R triángulo invertido amarillo. El rectángulo guinda indica el tiempo de acceso al alimento (ZT 4 a 6 h). Los datos se representan el promedio \pm EEM. La línea horizontal representa el promedio de 24 h. Concentración en suero de A: Ghrelina acilada, $n = 4-5$; $\&P < 0.05$ R contra F. B: Ghrelina no acilada, $n = 4-5$, $\#P < 0.0001$ prueba t de Student contra el grupo AL; $\&P < 0.05$ R contra F. C: Proporción UAG/AG, $n = 4-5$, $\#P < 0.0001$ prueba t de Student contra el grupo AL. Los símbolos denotan $*P < 0.05$ y RT contra el grupo AL en el mismo punto temporal, por prueba post hoc Bonferroni.

Expresión del receptor de ghrelina acilada, GHSR en hipófisis

Debido a que no hallamos diferencias en la secreción de ghrelina acilada en el grupo RT comparado al grupo AL, y para tratar de ahondar en su mecanismo de señalización a nivel posibles cambios en la presencia de su receptor, estudiamos la expresión proteica del GHSR (growth hormone secretagogue receptor 1 a) en un tejido blanco, la hipófisis.

A pesar de no haber encontrado diferencias en la concentración del ligando circulante, la expresión del GHSR incrementó como consecuencia de la restricción temporal de alimento. El perfil diario de la expresión proteica de GHSR en la pituitaria mostró un patrón bifásico en ratas bajo libre acceso al alimento con picos en la mitad de la fase de luz y oscuridad (Fig. 13). En contraste, no se encontró el ritmo en el grupo RT, aunque un incremento de $\sim 40\%$

en el promedio de las 24 h en el nivel del GHSR se observó ($P < 0.05$). Este resultado provino del promedio total diario de los niveles del GHSR para el grupo AL de 1.25 ± 0.12 y el grupo RT de 1.75 ± 0.15 AU (unidades arbitrarias) ($P < 0.05$) (Fig. 13).

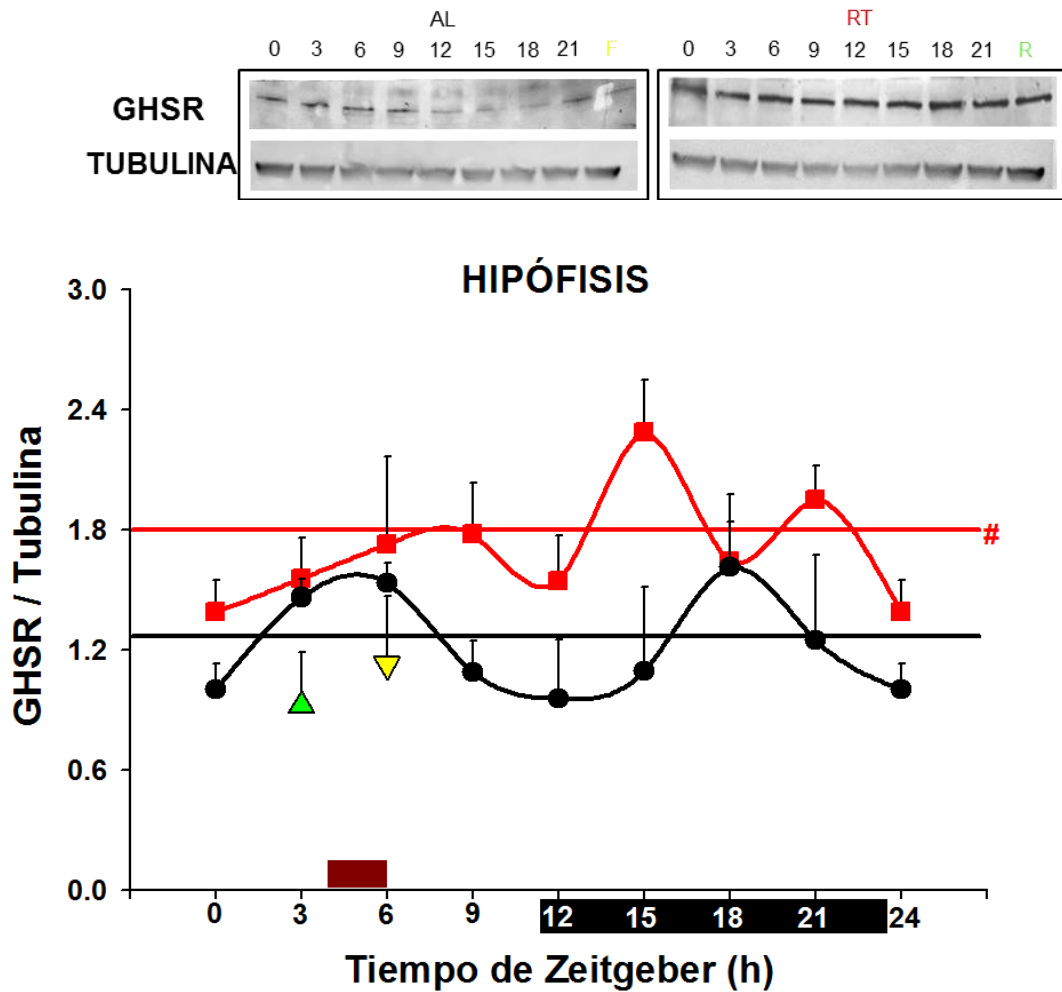


Figura 13: Caracterización de la expresión hipofisiaria del receptor de ghrelina acilada bajo la restricción de alimento. Los símbolos denotan a los grupos: AL círculos negros, RT cuadros rojos, F triángulo verde y R triángulo invertido amarillo. El rectángulo guinda indica el tiempo de acceso al alimento (ZT 4 a 6 h). Los datos se representan el promedio \pm EEM. La línea horizontal representa el promedio de 24 h. Expresión hipofisiaria diaria del GHSR y Western blot representativo, $n = 4$; # $P < 0.05$ prueba t de Student contra el grupo AL.

Contenido proteico en los tejidos principales de la síntesis del sistema ghrelina, GH-IGF-1

Posterior a la cuantificación de la concentración circulante de ghrelina, GH e IGF-1, exploramos si la RT promovió efectos al nivel traduccional en el contenido hormonal en cada uno de los órganos principales de síntesis, i.e. el estómago, la hipófisis y el hígado.

En un muestreo de 24 h, el contenido total de ghrelina (las formas AG y UAG) en los grupos AL y RT no mostraron ritmicidad. Sin embargo, el promedio de las 24 h fué 17 % menor en el grupo RT ($P < 0.05$), presentando 1.91 ± 0.10 contra el grupo AL 2.30 ± 0.14 ng/ μ g de proteínas de estómago (Fig. 14A). Adicionalmente, hubo una caída en el contenido de la ghrelina total en el grupo RT durante la fase de oscuridad ($P < 0.05$), en contraste al incremento de la concentración en suero de ghrelina total observado en este grupo (Fig. 14A). El contenido de ghrelina total de los grupos F y R no varió significativamente, y sus valores fueron similares a aquellos del grupo RT.

Relativo al contenido de GH en la hipófisis, los grupos AL y RT no exhibieron modificaciones a lo largo del día, pero al ZT 18 h el contenido tisular de GH en el grupo RT fue significativamente menor que en el grupo control AL (Fig. 14B). El promedio de las 24 h del contenido de GH en el grupo AL fue de 10.50 ± 0.64 , y de 6.70 ± 0.34 μ g/hipófisis en el grupo RT, lo cual significó una reducción del 36% en el contenido de GH ($P < 0.01$) que fue más evidente durante la fase de oscuridad ($P < 0.05$). No fueron observados cambios en los grupos control de condiciones agudas de alimentación.

La concentración de IGF-1 en el hígado no mostró ritmo en los grupos AL y RT. En contraste a la concentración de IGF-1 circulante, el promedio de las 24 h del contenido en hígado de IGF-1 fue similar en ambos grupos: 0.197 ± 0.015 y 0.194 ± 0.017 ng/ μ g de proteína hepática en los grupo AL y RT, respectivamente. No encontramos diferencias en los grupos control F y R, pero al ZT 3 h, el valor mostrado por el grupo F fue mayor que para el grupo RT (Fig. 14C).

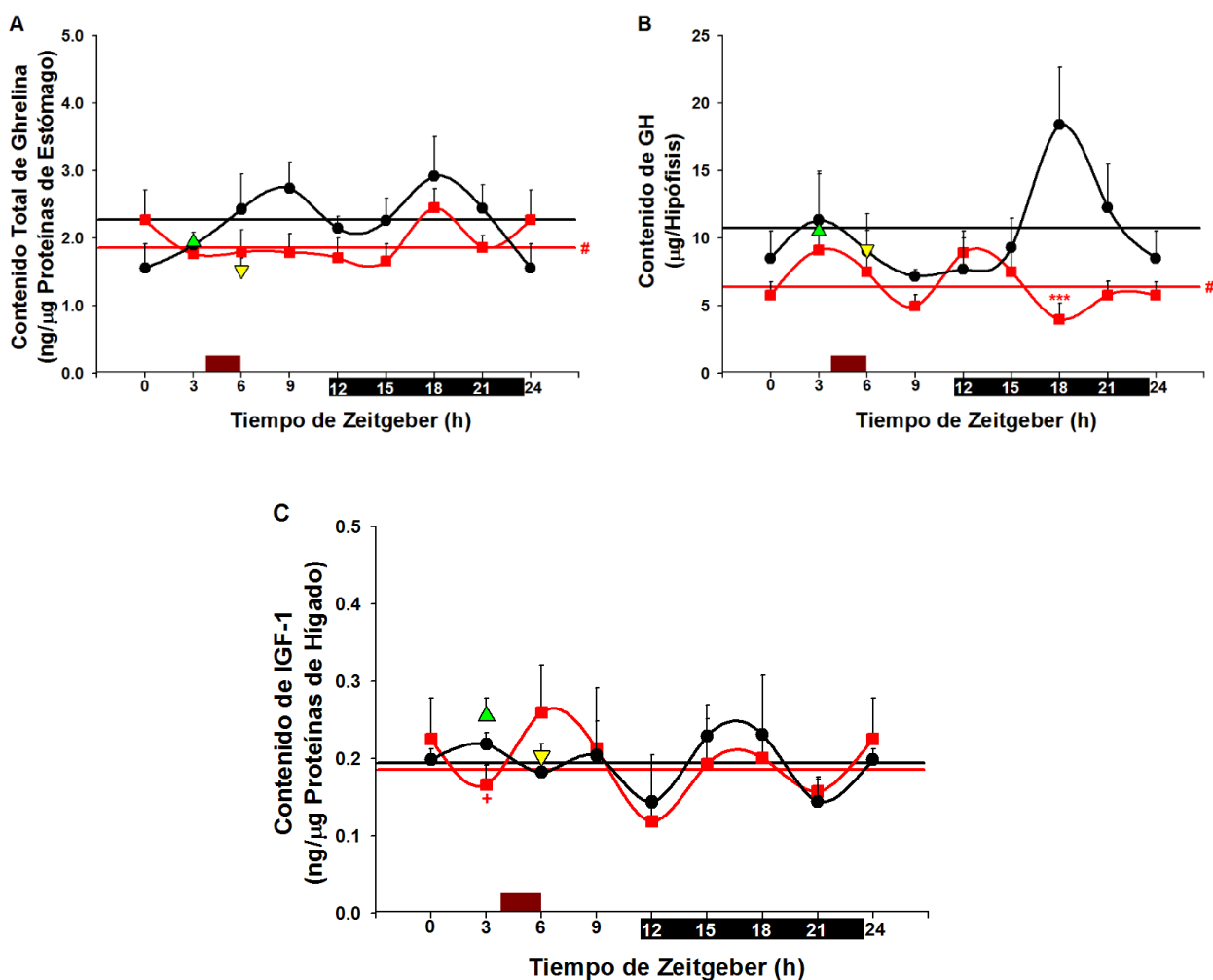


Figura 14: Caracterización del contenido proteico de las hormonas ghrelina, GH e IGF-1 bajo la restricción de alimento. Los símbolos denotan a los grupos: AL círculos negros, RT cuadros rojos, F triángulo verde y R triángulo invertido amarillo. El rectángulo guinda indica el tiempo de acceso al alimento (ZT 4 a 6 h). Los datos se representan el promedio \pm EEM. La línea horizontal representa el promedio de 24 h. A: Contenido de ghrelina total en el estómago, $n = 4$, # $P < 0.05$ prueba t de Student contra el grupo AL. B: Contenido de GH en la hipófisis, $n = 4$, # $P < 0.01$ prueba t de Student contra el grupo AL. C: Contenido de IGF-1 en el hígado, $n = 4$,

+P < 0.05 RT al ZT 3 h contra el grupo F. Los símbolos denotan ***P < 0.001 RT contra el grupo AL en el mismo punto temporal, por prueba post hoc Bonferroni.

“Victory belongs to the most persevering”. Napoleón Bonaparte.

10. Discusión

La presente sección de Discusión de este proyecto, está subdivida en los hallazgos relacionados a las hormonas estudiadas en el eje hormonal: sistema ghrelina, GH e IGF-1, asociados con el acceso al alimento de forma invertida y restringida, una maniobra experimental para inducir la emergencia del OSA en ratas.

Relación entre la ingesta de alimento y el crecimiento corporal

Durante los 21 días de experimentación, las ratas del grupo RT tuvieron un lento incremento en el peso corporal, siendo 32 % menor que el grupo AL en el día 21 de experimentación; sin embargo, al día 21 los individuos de este grupo ingirieron el doble de la cantidad de alimento en comparación con el día 1 (Fig. 8A y B), en este sentido, la conducta de alimentación y las adaptaciones en este grupo ocurrieron en etapas y a pesar de la diferencia significativa de un menor peso corporal e ingesta diaria de alimento contra el grupo control, la proporción de estos dos parámetros no cambia entre los dos grupos. Adicionalmente, como fue reportado por Honma, et al., 1983, al analizar el promedio de la ingesta de alimento por cada 100 g de PC, el valor para las ratas del grupo AL fue de 9.6 y para las ratas del grupo RT de 8.7, al

final de la semana 3, no hubo diferencias significativas entre estos dos grupos experimentales, coincidente con observaciones no publicadas en nuestro grupo de trabajo (Molina-Aguilar, et al., 2014).

Expresión de BMAL1 en tejidos periféricos

La expresión de la proteína reloj BMAL1 fue evaluada como un marcador de sincronización al alimento en osciladores periféricos, debido a que la alimentación restringida es un zeitgeber ó sincronizador (i.e. señal ambiental que acopla ó sincroniza los ritmos biológicos en un organismo).

La expresión diaria de BMAL1 es un parámetro de cómo la maquinaria de cronometraje local circadiano en cada tejido estudiado, funcionó en relación al tiempo de acceso al alimento, el cual es capaz de sincronizar distintos osciladores periféricos. Se conoce que BMAL1 participa en la regulación de la proliferación celular, en mantener la normoglucemia y el metabolismo de lípidos, debido a que influencia blancos moleculares en muchos tejidos, incluyendo el hígado y la glándula pituitaria (Schmutz, et al., 2012; Guillaumon, et al., 2012), lo cual sugiere que las modificaciones en la fase de BMAL1 podrían impactar en distintos procesos en los tejidos estudiados. Adicionalmente, afectaciones en el reloj circadiano en el sistema endocrino ha sido asociado a enfermedades como la diabetes la obesidad (Macheva, et al., 2010).

La cantidad relativa promedio de BMAL1 a lo largo del día en el estómago, hipófisis e hígado fue la misma, entre los grupos AL y RF, los cambios que encontramos fueron al nivel de su patrón de expresión. La expresión de BMAL1 en el grupo AL mostró una clara ritmicidad: un pico en la fase de luz en la hipófisis e hígado, pero también un incremento sutil en la

transición luz-oscuridad en el estómago (Fig. 9). Esta ritmicidad fue modificada por el protocolo de RT, el cual principalmente promovió un cambio de fase de BMAL1 en el estómago (Fig. 9A). Este patrón modificado, es consistente con los reportes de la influencia de un horario de alimentación restringida en el sistema circadiano (Girotti, et al., 2009). Se ha estudiado la expresión de BMAL1 a nivel de su mRNA ó proteínas en ratones con libre alimentación y en ambos estudios se ha encontrado un ritmo circadiano en el estómago (Mazzoccoli, et al., 2012; Hoogerwerf, et al., 2007), sin embargo, no existen reportes con acercamientos similares en ratas.

La complejidad en los patrones de secreción diarios de estas hormonas, puede ser explicada parcialmente por el reloj circadiano, pero otros factores deben ser considerados, que estén implicados en esta regulación como por ejemplo los ciclos de actividad/reposo y de ayuno/re-alimentación.

Específicamente en células oxínticas, los ritmos de PER1, PER2 y ghrelina son sincronizados por señales relacionadas al alimento más que al ciclo LO (LeSauter, et al., 2009), lo cual sugiere fuertemente la participación de BMAL1 como parte de este proceso de sincronización, ya que la expresión de ambas proteínas PER resulta de la inducción transcripcional por BMAL1.

Modificaciones en la somatometría de órganos periféricos

El acercamiento macroscópico a nivel del estudio somatométrico de los individuos en experimentación, abarcó los pesos del tejido de interés relacionados al peso corporal, un parámetro comúnmente usado para el análisis del peso de un órgano en relación a este, para

asociarlo a posibles diferencias en el PC (Bailet, et al., 2004), en el presente estudio, reportamos las mediciones en función del PC dado que las ratas en RT son menores de tamaño que las ratas del grupo AL. Estudiamos no sólo el crecimiento somático que es regulado por GH e IGF-1 (Kaplan y Cohen, 2007), sino también cambios de peso relacionados a las variaciones en la fase del proceso digestivo.

Durante el protocolo de alimentación restringida, encontramos una remarcable hiperfagia, distensión estomacal y un lento vaciamiento gástrico, cómo había sido reportado (Martínez-Merlos, et al., 2004; Lima, et al., 1981) y fue confirmado en el presente estudio (Fig. 10A). Debido a que el vaciamiento del quimo tomó ~18 h, las ratas bajo el esquema de restricción temporal de alimento, tuvieron éste disponible hasta unas horas previas al acceso a la alimentación. Interesantemente, el inicio de la AAA coincide con el vaciamiento por completo de la cámara del estómago. A pesar de que la distensión aguda gástrica por sí misma no afecta secreción de ghrelina, queda por ser estudiado, sí una distensión estomacal mucho más crónica (varios días) podría influenciar la concentración en suero de ghrelina total o la proporción de UAG/AG circulante, ya que ambas condiciones fueron observadas en nuestro estudio.

La alimentación inversa a largo plazo (i.e. privación nocturna del alimento y alimentación durante la fase luz) promovió la reducción en el peso de la glándula pituitaria aunque no proporcional al peso corporal, aunado a una supresión de la GH en suero (Glad, et al., 2011). Los grupos AL y RT no mostraron variaciones en la proporción peso de la glándula pituitaria/PC (Fig. 10B), esto en acuerdo con estudios en los cuales se ha mostrado que la proporción de esta glándula al peso corporal se mantiene estable (Bailey, et al., 2004). Sin embargo, en el presente estudio, el peso promedio de la hipófisis fue 22% menor en las ratas

RT ($P < 0.0001$). Esta reducción significativa, deja abierta la pregunta de si la disminución en el tamaño afecta la adeno y neurohipófisis equitativamente, o si esta altera la proporción de las subpoblaciones celulares de la adenohipófisis.

El hígado es un órgano cardinal en el contexto de la emergencia del OSA, dado su papel como el centro crucial del metabolismo de nutrientes, ya que sensa y regula el estado energético del organismo (Aguilar-Roblero y Díaz-Muñoz, 2010). Previamente, se reportó que la RT está asociada con cambios en la proporción hígado/PC y el contenido hepático de agua a ciertos puntos temporales en la fase luz (Díaz-Muñoz, et al, 2000). En el presente estudio, esta serie de datos comprendió un ciclo completo de 24 (Fig. 10C), encontramos que la RT sólo promueve un cambio de fase en la proporción hígado/PC con el valor máximo varias horas después de la ingesta del alimento. Este resultado indica que la somatometría del hígado está relacionada a la alimentación, pero es independiente del horario de alimentación y del contenido estomacal. Se han reportado adaptaciones bioquímicas en el hígado en las ratas con restricción temporal de alimento en la fase de luz y un cambio metabólico en la dependencia de combustibles de carbohidratos a lípidos (Escobar, et al., 1998; Báez-Ruiz, et al., 2005; Díaz-Muñoz, et al., 2010). Adicionalmente, el estudio de la expresión proteica hepática de receptores activados de proliferación de los peroxisomas (PPAR), reveló que la isoforma γ , la cual regula el metabolismo de triacilglicéridos y controla la esteatosis hepática, aumenta su proporción durante la emergencia del OSA, en particular pre y posprandialmente (Rivera-Zavala, et al, 2011). Tomando en cuenta todos los hallazgos, el hígado es claramente un órgano clave en las respuestas metabólicas y fisiológicas características del re-alineamiento que ocurre en el OSA así como el sitio de síntesis de IGF-1, estimulada por GH.

Con respecto al tejido adiposo blanco (TAB) es otro tejido altamente activo metabólicamente e importante, complejo y la fuente de varias adipocinas (Wang, et al., 2008). Hay una heterogeneidad considerable entre los varios tipos de tejido adiposo, por ejemplo, el visceral está asociado especialmente con la resistencia a la insulina, diabetes mellitus, el síndrome metabólico y un incremento en la mortalidad (Tran y Kahn, 2010).

En la rata, el TAB perigonadal muestra una expresión de genes relacionados a la lipogénesis y lipólisis así como una respuesta rápida al ayuno (Wronska, et al., 2012). Además la secreción de leptina es mayor del TAB subcutáneo que el visceral, y la concentración circulante diurna de leptina durante la RT está reducida, pero tiene un pico después del acceso al alimento (Martínez-Merlos, et al., 2004). Elegimos cuantificar el TAB perigonadal como un acercamiento para elucidar su papel y como blanco de los reguladores endocrinos como GH, IGF-1 y UAG ya que: 1) El IGF-1 tiene un papel adipogénico, promoviendo la diferenciación de preadipocitos a adipocitos, en parte a través de la activación cruzada del IGF-1R por la insulina (Rosen y Spiegelman, 2000); 2) la GH incrementa el número de células precursoras de adipocitos, pero reduce el volumen de adipocitos maduros, por medio de la lipólisis (Blüher, et al., 2005; Fève, 2005); 3) la GH inhibe la diferenciación de preadipocitos epididimales primarios (Delhanty, et al., 2010); y 4) la UAG tiene una acción catabólica en TAB perigonadal, un depósito en este modelo, menos sensible a modificaciones en la masa vía AG (Delhanty, et al., 2010; Wells, 2009). En el presente estudio, la RT promovió una reducción total en la proporción de este tejido (Fig. 10D) que podría ser una consecuencia de algunos de los efectos en el TAB de algunas de las hormonas aquí estudiadas; probablemente predomina un estado catabólico asociado a la

UAG, dado que la concentración circulante diurna fue mayor durante la RT, en tanto las concentraciones de IGF-1 y GH fueron menores.

Caracterización de la concentración en suero de ghrelina total, GH e IGF-1

Relacionado a los patrones diarios, el perfil diurno de la ghrelina total circulante en rata ha sido reportado previamente (Bodosi, et al, 2004). Consistente con su papel como un factor orexigénico, el grupo AL mostró mayor concentración durante la fase de reposo y el grupo F debido al ayuno. En efecto, el grupo control AL en nuestro protocolo experimental, desplegó un patrón rítmico en la concentración de ghrelina total en suero (Fig. 11A). Este patrón fue cambiado completamente por el protocolo de RT en dos aspectos principales: 1) el ritmo de 24 h fue bifásico, con un pico previo a la alimentación y un segundo pico en la primera mitad de la fase de oscuridad; 2) la concentración de ghrelina fue ~70% mayor cuando se promedió en el periodo de 24 h. Estos resultados implican que la duración de la alimentación restringida afecta el papel regulador del reloj molecular de la célula oxíntica, así como el proceso de síntesis/secreción de la ghrelina total. Dado que el contenido en el estómago de ghrelina total no incrementó en el grupo RT (Fig. 14A), el aumento en la ghrelina total circulante es debido a una secreción potenciada por tanto el estómago ó una fuente alternativa. La biosíntesis de ghrelina en el revestimiento de la mucosa del estómago depende del estado nutricional (Sönmez, et al, 2007). Otro efecto sorprendente en el estado de ghrelina, fue que el incremento de la hormona circulante total, fue explicado exclusivamente por un incremento de la ghrelina no acilada (Fig. 12B). En consecuencia, la

proporción UAG/AG fue mucho mayor en el grupo RT (Fig. 12C). Importantemente, se ha demostrado que la UAG puede ejercer acciones fisiológicas a través de receptores alternativos a la ghrelina acilada pero que aún se desconocen (Delhanty, et al., 2009). Se ha reportado que la acilación de ghrelina y su secreción pueden ser reguladas por separado y la UAG parece ser secretada en una forma altamente regulada en respuesta a privación calórica que podría ser relacionada al metabolismo de glucosa (Kirchner, et al., 2009). Por lo tanto, basados en reportes de las consecuencias fisiológicas de una infusión continua de UAG, se ha sugerido que la alta concentración de UAG (la cual se ha asociado a la RT) podría mejorar el metabolismo de glucosa e inhibir la lipólisis, desplegando así efectos hipoglucemiantes (Benso, et al, 2012). De hecho, nuestro grupo de trabajo ha observado un estado hipoglucémico en ratas bajo la RT (Pérez-Mendoza et al., 2014).

La secreción de GH es pulsátil, y en ratas, con un ritmo ultradiano de ~3.3 h que depende de la ingesta de alimento (Tannenbaum et al., 1976; Bruno, et al., 1990). No detectamos ritmicidad en el patrón circulante de GH en las ratas AL (Fig. 11B), debido al parecer a la gran variabilidad individual, la secreción de GH pulsátil (Tannenbaum et al., 1976), pero explicado principalmente por el teorema de Nyquist-Shannon, el cual establece que para detectar un ritmo ultradiano de ~3 h, la frecuencia de muestreo tiene que ser de aproximadamente 1.5 h (Wescott, 2010). Ciertamente, nuestro muestreo no cubrió esa frecuencia, así que no fue posible detectar la naturaleza ultradiana de la secreción de GH en la rata macho.

Sin embargo, el protocolo de RT promovió dos cambios significativos: 1) una reducción en la concentración promedio de GH sérica sobre el muestreo de 24 h, y 2) el establecimiento de un patrón oscilatorio con un pico de GH después de la alimentación (ZT 6 h), efecto que no

fue debido a sólo un ciclo de ayuno-realimentación, sino por la sincronización, después de 21 ciclos, al periodo de disponibilidad de alimento (Fig. 11B).

La secreción de GH *in vivo* o *in vitro* es dependiente de factores metabólicos y humorales, y es regulada de una manera compleja (Giustina y Veldhuis, 1998). Se conoce que los ácidos grasos libres (AGL) circulantes inhiben la secreción GH, y durante la AAA (al ZT 3 h) se observó un pico de AGL en el grupo RT (Escobar, et al., 1998; Rivera-Zavala, et al., 2011). Los bajos valores en sangre de GH, podrían ser explicados por una exposición de 3 semanas a glucocorticoides altos, dado su efecto negativo en la secreción de GH, de forma crónica (Giustina y Veldhuis, 1998), una condición reportada en la RT (Luna-Moreno, et al., 2009). Otros factores con influencia en la secreción de GH en nuestro protocolo experimental, son la proporción de GHRH y somatostatina, las cuales ejercen efectos positivos y negativos, respectivamente. Se reportó que después de 3 días de privación de alimento en ratas, hay una reducción masiva del mRNA de GHRH en el hipotálamo, sin efecto en la expresión del mRNA de somatostatina y es revertido por la realimentación (Bruno, et al., 1990).

El incremento de la secreción GH visto después de la alimentación (al ZT 6 h) en el grupo RT no es fácil de explicar, dada la acción inhibitoria de la insulina en la secreción de GH (Ji, et al., 1999). Particularmente, el paradigma de RT, promueve un aumento de insulina posterior al alimento al ZT 6 h (Pérez-Mendoza, et al., 2014). Una explicación tentativa es que la regulación reostática asociada a la RT, podría estar alterando la señalización por JAK2 y STAT5B, proteínas que median la inhibición por insulina en la secreción de GH (Ji, et al., 1999). Sin embargo, el fallo aparente de la insulina de disminuir la GH en suero, no es suficiente para explicar el incremento de esta, y la posibilidad de una acción coordinada de un incremento directo en la secreción/síntesis de GH pudiera ser considerado. La glucosa en

contraparte, en ratas a diferencia de la regulación de la secreción de GH e seres humanos, tanto las condiciones de hiperglucemia e hipoglicemia suprimen la secreción de GH (Tannenbum, et al., 1976; Murao, et al., 1994), nuevamente la tendencia a la hipoglicemia en las ratas bajo RT podría ser otro factor que impacta en la supresión de los niveles de GH circulante.

Caracterización de la concentración en suero de las isoformas de ghrelina y estudio de la expresión de su receptor en hipófisis

El ayuno por 21 h incrementa la ghrelina total circulante así como las concentraciones de AG y UAG, las cuales regresan a valores basales después de 2 h de realimentación (Fig. 12A y B). Sin embargo, la proporción de UAG/AG en el ayuno simple y condiciones de realimentación permanecieron sin cambios, en contraste a los hallazgos en las ratas RT, en las cuales esta proporción incrementó 2 veces sobre el periodo de 24. En modelos con alimentación inversa (en toda la fase luz), la concentración en plasma de ghrelina total disminuyó durante la fase de luz (Glad et al., 2011) e incrementó al final de la fase de oscuridad (Bodosi, et al., 2004). Interesantemente, la UAG, la isoforma de ghrelina que fue potenciada en el protocolo de RT, podría modular también el eje GH-IGF-1.

En ratones transgénicos con aumento en la expresión de la UAG, esto provoca una reducción del TAB epididimal y en la velocidad de vaciamiento gástrico (Asakawa, et al., 2005). Estas últimas condiciones, fueron observadas en nuestro modelo con RT (Fig. 10A y D, y Fig. 12C). Hallazgos usando otro modelo de ratones transgénicos con sobreexpresión de UAG, también se parecen a lo que encontramos en el presente estudio a cerca de la los

niveles circulantes de GH e IGF-1 durante la RT, i.e., la UAG impacta en el eje GH-IGF-1 disminuyendo la concentración circulante de ambas hormonas y el peso corporal de las ratas (Zhang, et al., 2008).

En ratas bajo un esquema de alimentación normal, el estómago contiene una mezcla de AG y UAG, principalmente la segunda. De hecho, de hecho encontramos una pequeña disminución de la ghrelina total almacenada durante la RT, sugiriendo que la RT promueve principalmente la secreción de ghrelina total sin un rápido incremento en su biosíntesis. Sin embargo la expresión genética de GOAT y su actividad, deben ser consideradas como un componente y mediador de los efectos observados y del sistema ghrelina y su impacto sobre la proporción UAG/AG debería de ser tomado en cuenta en las condiciones de RT. La inhibición de la actividad de GOAT, por un péptido sintético haciendo menor la proporción AG/UAG (Barnett, et al., 2010), teniendo efecto metabólicos benéficos en ratones. Aunado a GOAT las enzimas que desacilan ghrelina como la paraoxonasa y la lisofosfolipasa I (Veldhuis y Bowers, 2010) son otra pregunta abierta para su estudio.

Relativo a la interrelación entre la secreción de GH y su regulación por las isoformas de ghrelina, la AG potencia la liberación de GH así como el consumo de alimento, sin embargo, no encontramos cambios en la AG en sangre en el grupo RT en el presente estudio, en tanto, cuando evaluamos la expresión proteica de su receptor el GHSR en la hipófisis, esta incrementó durante la RT (Fig. 13), sugiriendo que la señalización por AG podría estar afectada por la restricción de alimento. Importantemente, el GHSR ha sido considerado como un regulador positivo de la expresión de neuronas GHRHérgicas, siendo otro mecanismo de la potenciación de la secreción de GH por AG en el núcleo arcuato (Mano-Otagiri, et al., 2006), aspecto que permanece por ser explorado en nuestro modelo.

En contraste, se ha sugerido que la UAG podría perjudicar la secreción de GH (Glad, et al., 2011), en acuerdo con nuestros resultados y con las mayores concentraciones de UAG durante la RT (Fig. 12B). Modelos en roedores mutantes o modelos KO de ghrelina y el GHSR, constituyen un valioso modelo para disectar los efectos metabólicos y endocrinos de las isoformas de ghrelina en la emergencia del OSA.

Estudio del contenido de ghrelina total, GH e IGF-1 en sus principales sitios de síntesis

La GH almacenada en la hipófisis se midió para buscar cambios en la biosíntesis de GH durante la emergencia del OSA. El promedio de las 24 h en el contenido hipofisiario de GH fue menor, especialmente al final de la fase de oscuridad en el grupo RT (Fig. 14B). A pesar de que el ayuno y la alimentación hipocalórica en modelos murinos lleva a una reducción en el almacenamiento de GH, durante la emergencia del OSA, las adaptaciones metabólicas son diferentes de aquellas observadas en un ayuno simple de 24 h (Rivera-Zavala, et al., 2011). Por lo tanto, la RT en la fase de luz regula a la baja la síntesis y secreción de GH, y sensibiliza el sistema para responder con un incremento posprandial a un nivel de secreción. Actualmente estamos realizando estudios con un acercamiento molecular para analizar la expresión del mRNA de GH, encontramos que hay un pico del mRNA de GH en el ZT 3h en el grupo RT, que precede al incremento de GH circulante.

Nuestros resultados muestran que las concentraciones circulantes de tanto GH como IGF-1 disminuyeron (Fig. 11B y C), pero no observamos una disminución paralela en el contenido hepático de IGF-1 (Fig. 14C). Por lo cual, en tanto que la RT promovió una reducción en la síntesis y secreción de GH, solo el proceso de secreción fue modificado para IGF-1. Una reducción del IGF-1 circulante fue reportada en condiciones ayuno (Katz, et al., 2002). En

contraste a la secreción de IGF-1, el contenido de la proteína almacenada en el hígado fue la misma para los grupos AL y RT, lo cual podría ser explicado en parte por el lento recambio del mRNA hepático para IGF-1 (Scott, et al., 1985). Un punto por ser explorado es si el protocolo de RT altera las proteínas de unión a IGF-1 (IGFBPs). Datos no publicados de resultados de un estudio de microarreglos de DNA por nuestro grupo de trabajo, indican una disminución significativa IGFBP5 en el grupo RT, antes del acceso alimento.

El oscilador sincronizado por alimento y las adaptaciones reostáticas del sistema ghrelina-GH-IGF-1

La duración de la alimentación restringida es el zeitgeber dominante para relojes periféricos y puede desacoplarlos del NSQ; el OSA, el cual es semi-independiente del oscilador sincronizado por luz, es realineado y forma la base adaptaciones conductuales (AAA) y fisiológicas en la ritmicidad circadiana (Stephan, 2002).

Los mecanismos específicos que subyacen a la modulación, sincronización y funcionamiento del OSA no se han elucidado por completo. Más que ser un sustrato anatómico único, el OSA implica una red de estructuras del sistema nervioso y señales endocrinas que regulan el balance de energía y la conducta de alimentación, incluyendo componentes hipotalámicos y otras áreas del SNC, y órganos periféricos (Blum et al., 2012). El OSA podría ser un sistema emergente adaptativo, en el cual los mecanismos reostáticos/alostáticos están integrados en una red interconectada de estructuras cerebrales y órganos periféricos oscilando con asas de retroalimentación en respuesta a la disponibilidad de alimento limitado temporalmente (Aguilar-Roblero y Díaz-Muñoz, 2010; Blum et al., 2012).

Al respecto del papel *in vivo*, de la hipófisis y de la GH en el OSA, ratas hipofisectomizadas desplegaron la AAA (Davidson y Stephan, 1999), aunque cabe resaltar que son necesarios estudios bioquímicos para evaluar el estado metabólico de estas ratas y nuestro estudio apuntala cambios diarios del eje GH-IGF-1 durante la sincronización por alimento. Por el otro lado, se propone que las células gástricas oxínticas podrían estar actuando como parte del mecanismo del oscilador sincronizado por alimento, ya que mostraron cambios dependientes del periodo de alimentación en los componentes del reloj molecular (Blum et al., 2009; LeSauter et al., 2009), adicionalmente en nuestro estudio encontramos de forma novedosa que es la isoforma de ghrelina la UAG la que predomina de forma circulante y deja la posibilidad de explorar sus posibles funciones en la sincronización por alimento.

La posible aplicación de la hora de alimentación como una táctica experimental para reorganizar osciladores periféricos para ameliorar ciertas patologías está en crecimiento, debido a que la pérdida de organización temporal está asociada con el establecimiento de algunas enfermedades metabólicas (Salgado-Delgado et al., 2010). Recientemente, se ha mostrado que en ratones sometidos a dietas altas en grasas, la alimentación temporal restringida por 8 h durante la fase de oscuridad podría ser una intervención no farmacológica para prevenir desórdenes metabólicos y obesidad como resultado de la reprogramación y optimización de los mecanismos moleculares del metabolismo de energía y la regulación del peso corporal (Hatori et al., 2012).

Usando el paradigma de RT, nuestro estudio revela cambios de fase y reajustes metabólicos en las concentraciones circulantes de las hormonas sensoras de nutrientes UAG, GH e IGF-1 bajo la emergencia del OSA. Por otro lado, no encontramos asociación entre la concentración en suero de AG y GH, aunque sí una reducción en el funcionamiento de parte

del eje somatotrópico GH-IGF-1. También hubieron cambios en la biosíntesis de ghrelina total y GH almacenadas en el estómago y glándula pituitaria, respectivamente. Concluimos que las modificaciones del sistema ghrelina, GH, e IGF-1 son un componente de la respuesta adaptativa endocrina y metabólica que es suscitada durante la restricción temporal en la fase de luz y la actividad aumentada del OSA.

“Overemphasis on the competitive system and premature specialization on the ground of immediate usefulness kill the spirit on which all cultural life depends, specialized knowledge included. It is also vital to a valuable education that independent critical thinking be developed in the young human being, a development that is greatly jeopardized by overburdening him with too much and with too varied subjects (point system). Overburdening necessarily leads to superficiality. Teaching should be such that what is offered is perceived as a valuable gift and not as a hard duty”. Albert Einstein.

11. Conclusiones

- La alimentación restringida en la fase de luz en ratas por tres semanas, es una maniobra experimental que desacopla el oscilador sincronizado por luz y emerge el oscilador sincronizado por alimento, cómo ha sido reportado por nuestro grupo de trabajo y otros.

- Nuestro estudio reveló modificaciones en la conducta de alimentación, hiperfagia y lento vaciamiento gástrico; ganancia de peso corporal, cambios de fase en hígado e hipófisis de la proteína reloj BMAL1, resultó en una inversión de fase del ritmo diario del peso del hígado y una reducción del peso del pTAB y cambios en los patrones diarios de las concentraciones circulantes de las hormonas sensoras de nutrientes UAG, GH e IGF-1 en la emergencia del OSA. Este ajuste reostático también incluyó cambios en el contenido proteico de ghrelina total y GH.

- No encontramos relación entre la concentración en suero de AG y GH, aunque sí cambios en el contenido proteico de del receptor GHSR hipofisiario, sin embargo encontramos una reducción en el funcionamiento del eje GH-IGF-1.

- Concluimos de forma general y sugerimos que las modificaciones del sistema ghrelina, GH e IGF-1 son un componente de la respuesta adaptativa endocrina y metabólica que es provocada durante la restricción temporal de alimento en la fase de luz y actividad aumentada del OSA y que forman parte del modelo distribuido que lo conforma y la regulación endocrina dentro del OSA.

“In the long history of humankind (and animal kind, too) those who learned to collaborate and improvise most effectively have prevailed” Charles Darwin.

12. Perspectivas

- Estudiar el eje somatotrópico a nivel hipotalámico por PCR cuantitativo, para detectar en hipotálamo el mRNA de la hormona liberadora de la hormona de crecimiento, somatostatina y el GHSR y de GH en hipófisis para evaluar los cambios en este eje durante la restricción temporal de alimento en la fase de luz en ratas.
- Analizar las adaptaciones metabólicas de los lípidos, en particular de triacilglicéridos en hígado y tejido adiposo blanco perigonadal asociados a blancos regulados por GH (enzimas) y la participación del GHR.
- Diseñar experimentos para dilucidar la señalización de las hormonas en sus órganos blancos y la regulación del metabolismo de carbohidratos y lípidos *in vivo* ó *in vitro*.

“If you wish success in life, make perseverance your bosom friend, experience your wise counselor, caution your elder brother and hope your guardian genius”. Joseph Addison.

13. Referencias

- Aceves C, Escobar C, Rojas-Huidobro R, Vázquez-Martínez O, Martínez-Merlos T, Aguilar-Roblero R, Díaz-Muñoz M. Liver 5'-deiodinase activity is modified in rats under restricted feeding schedules: evidence for post-translational regulation. *J Endocrinol* 2003; 179: 91-96.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402: 656-660, 1999.
- Acosta-Galvan G, Yi CX, van der Vliet J, Jhamandas JH, Panula P, Angeles-Castellanos M, Basualdo MC, Escobar C, Buijs RM. Interaction between hypothalamic dorsomedial nucleus and the suprachiasmatic nucleus determines intensity of food anticipatory behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 5813-5818.
- Aguilar-Roblero R, Díaz-Muñoz M. Chronostatic adaptations in the liver to restricted feeding: the FEO as an emergent oscillator. *Sleep Biol Rhythms* 2010; 8: 9-17.
- Aguilar-Roblero R, Granados-Fuentes D, Caldelas I, Salazar-Juárez A, Escobar C: Bases neurales de la cronobiología humana: el sistema circadiano distribuido. En Golombek D, comp. Cronobiología Humana; ritmos y relojes biológicos en la salud y en la enfermedad. Buenos Aires, Argentina; Universidad Nacional de Quilmes Ediciones, 2002: 67-83.
- Aguilar-Roblero R. Cronostasia: más allá del modelo de los dos procesos en la regulación del sueño. *Av Med Sueño en Lat* 2007; 3: 5–10.
- Alba-Betancourt C, Arámburo C, Ávila-Mendoza J, Ahumada-Solórzano SM, Carranza M, Rodríguez-Méndez AJ, Harvey S, Luna M. Expression, cellular distribution, and heterogeneity of growth hormone in the chicken cerebellum during development. *Gen Comp Endocrinol* 2011; 170: 528-540.

Arellanes-Licea E, Caldelas I, De Ita-Pérez D, Díaz-Muñoz M. The circadian timing system: a recent addition in the physiological mechanisms underlying pathological and aging processes. *Aging and Disease* 2014; 5: 1-13.

Arellanes-Licea E, Díaz-Muñoz M. Ritmicidad biológica de la secreción de ghrelina, GH e IGF-1, y su regulación por la alimentación. *Rev Endocrinol Nutrición* 2012; 20: 74-87.

Ariyasu H, Takaya K, Iwakura H, Hosoda H, Akamizu T, Arai Y, Kangawa K, Nakao K. Transgenic mice overexpressing des-acyl ghrelin show small phenotype. *Endocrinology* 2005; 146: 355-364.

Asakawa A, Inui A, Fujimiya M, Sakamaki R, Shinfuku N, Ueta Y, Meguid MM, Kasuga M. Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. *Gut* 2005; 54: 18-24.

Aschoff J: A survey on biological rhythms. In Aschoff J, ed. *Biological rhythms. Handbook of Behavioural Neurobiology*. Vol. 4 New York; Plenum Press, 1981:3-10.

Báez-Ruiz A, Escobar E, Aguilar-Roblero R, Vázquez-Martínez O, Díaz-Muñoz M. Metabolic adaptations of liver mitochondria during restricted feeding schedules. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G1015-G1023.

Báez-Ruiz, G. A. *et al.* In *Comparative Aspects of Circadian Rhythms*. (Fanjul-Moles, M. L. & Aguilar-Roblero, R. eds. *Transworld Research Network* 2008: 159-183.

Bailey SA, Zidell RH, Perry RW. Relationships between organ weight and body/brain weight in the rat: what is the best analytical endpoint? *Toxicol Pathol* 32: 448-466, 2004.

Bellet MM, Sassone-Corsi P. Mammalian circadian clock and metabolism—the epigenetic link. *J Cell Sci* 2010; 123: 3837-3848.

Benso A, St-Pierre DH, Prodam F, Gramaglia E, Granata R, van der Lely AJ, Ghigo E, Broglio F. Metabolic effects of overnight continuous infusion of unacylated ghrelin in humans. *Eur J Endocrinol* 2012; 166: 911-916.

Berthoud HR. Mind versus metabolism in the control of food intake and energy balance. *Physiol & Behav* 2004; 81: 781-793.

Billestrup N, Swanson LW, Vale W. Growth hormone-releasing factor stimulates proliferation of somatotrophs in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986; 6854-6857.

Bloch B, Brazeau P, Ling N, Bohlen P, Esch F, Wehrenberg WB, Benoit R, Bloom F, Guillemin R. Immunohistochemical detection of growth hormone-releasing factor in brain. *Nature* 1983; 301: 607-608.

Blüher S, Kratzsch J, Kiess W. Insulin-like growth factor I, growth hormone and insulin in white adipose tissue. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005; 19: 577-587.

Blum ID, Lamont EW, Abizaid A. Competing clocks: metabolic status moderates signals from the master circadian pacemaker. *Neurosci Biobehav Rev* 2012; 36: 254-270.

Blum ID, Patterson Z, Khazall R, Lamont EW, Sleeman MW, Horvath TL, Abizaid A. Reduced anticipatory locomotor responses to scheduled meals in ghrelin receptor deficient mice. *Neuroscience* 2009; 164: 351-359.

Blum ID, Waddington Lamont E, Abizaid A. Competing clocks: Metabolic status moderates signals from the master circadian pacemaker. *Neurosci Biobehav Rev* 2011; 36: 254-270.

Bodosi B, Gardi J, Hajdu I, Szentirmai E, Obal F Jr, Krueger JM. Rhythms of ghrelin, leptin, and sleep in rats: effects of the normal diurnal cycle, restricted feeding, and sleep deprivation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287: R1071-R1079.

Broglio F, Prodam F, Riganti F, Muccioli G, Ghigo E, Arzt E, Bronstein M, Guitelman M eds. Pituitary Today: Molecular, Physiological and Clinical Aspects. *Front Horm Res.* 2006; 35: 102-114.

Bruno JF, Olchovsky D, White JD, Leidy JW, Song J, Berelowitz M. Influence of food deprivation in the rat on hypothalamic expression of growth hormone-releasing factor and somatostatin. *Endocrinology* 1990; 127: 2111-2116.

Buijs RM, Kalsbeek A. Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nature Rev Neurosci* 2001; 2: 521-526.

Camiña JP, Carreira MC, Micic D, Pombo M, Kelestimur F, Dieguez C, Casanueva FF. Regulation of ghrelin secretion and action. *Endocrine* 2003; 22: 5-12.

Carneiro BTS, Araujo JF. The food-entrainable oscillator: a network of interconnected brain structures entrained by humoral signals? *Chronobiol Int* 2009; 26: 1273-1289.

Casanueva FF, Camiña JP, Carreira MC, Pazosa Y, Vargad JL, Schally AV. Growth hormone-releasing hormone as an agonist of the ghrelin receptor GHS-R1a. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 20458-20457.

Cermakian N, Boivin DB. The regulation of central and peripheral circadian clocks in humans. *Obes Rev* 2009; 10 (Suppl. 2): 25-36.

Clarke JD, Coleman GJ. Persistent meal-associated rhythms in SCN-lesioned rats. *Physiol Behav* 1986; 36: 105-113.

Clemmons DR, Underwood LE. Nutritional regulation of IGF-1 and IGF binding proteins. *Annu Rev Nutr* 1991; 11: 393-412.

Clemmons DR. The relative roles of growth hormone and IGF-1 in controlling insulin sensitivity. *J Clin Invest* 2004; 113: 25-27.

Cummings DE, Overduin J. Gastrointestinal regulation of food intake. *J Clin Invest* 2007; 117: 13-23.

Davenport AP, Bonner TI, Foord SM, Harmar AJ, Neubig RR, Pin JP, Spedding M, Kojima M, Kangawa K. International union of pharmacology. LVI. Ghrelin receptor nomenclature, distribution, and function. *Pharm Reviews* 2005; 57: 541-546.

Davidson AJ, Stephan FK. Feeding-entrained circadian rhythms in hypophysectomized rats with suprachiasmatic nucleus lesions. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 1999; 277: R1376-R1384.

Davidson AJ. Search for the feeding-entrainable circadian oscillator: a complex proposition. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 2006; 290: R1524-R1526.

de Vos AM, Ultsch M, Kossiakoff AA. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* 1992: 306-312.

Delhanty PJ, Sun Y, Visser JA, van Kerkwijk A, Huisman M, van Ijcken WF, Swagemakers S, Smith RG, Themmen AP, van der Lely AJ. Unacylated ghrelin rapidly modulates lipogenic and insulin signaling pathway gene expression in metabolically active tissues of GHSR deleted mice. *PLoS ONE* 2010; 5(7): e11749. doi:10.1371/journal.pone.0011749.

Desbois-Mouthon, C. et al. Hepatocyte proliferation during liver regeneration is impaired in mice with liver-specific IGF-1R knockout *FASEB J FJ Express* 2006; 20: 773-775.

Díaz-Muñoz M, Vázquez-Martínez O, Aguilar-Roblero R, Escobar C. Anticipatory changes in liver metabolism and entrainment of insulin, glucagon, and corticosterone in food-restricted rats. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol* 2000; 279: R2040-R2056.

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

Dibner C, Schibler U, Albrecht U. The mammalian circadian timing system. *Annu Rev Physiol* 2010; 72: 517–49.

Ehlers CL, Reed TK, Henriksen SJ. Effects of corticotropin-releasing factor and growth hormone-releasing factor on sleep and activity in rats. *Neuroendocrinology* 1986; 42:467-474.

Escobar C, Díaz-Muñoz M, Encinas F, Aguilar-Roblero R. Persistence of metabolic rhythmicity during fasting and its entrainment by restricted feeding schedules in rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 1998; 274: R1309-R1316.

Escobar C. et al. In *Comparative Aspects of Circadian Rhythms*, Fanjul-Moles, M. L. & Aguilar-Roblero, R. eds. Transworld Research Network, 2008: 121-141.

Feng DD, Yang SK, Loudes C, Simon A, Al-Sarraf T, Culler M, Alvear-Perez R, Llorens-Cortes C, Chen C, Epelbaum J, Gardette R. Ghrelin and obestatin modulate growth hormone-releasing hormone release and synaptic inputs onto growth hormone-releasing hormone neurons. *Eur J Neurosci* 2011; 34:732-744.

Florio T, Rim C, Hershberger RE, Loda M, Stork PJ. The somatostatin receptor SSTR1 is coupled to phosphotyrosine phosphatase activity in CHO-K1 cells. *Molecular Endocrinol* 1994; 8: 1289-97.

Froesch ER, Schmid C, Schwander J, Zapf J. Actions of insulin-like growth factors. *Annual Rev Physiol* 1985; 47: 443-67.

Frohman, L. A. (1995) In *GHRH, GH and IGF-I. Basic and clinical advances.* (Blackman, M. R. et al. eds.) p. 3-10, *Springer-Verlag*.

Gaylinn BD, Harrison JK, Zysk JR, Lyons CE, Lynch KR, Thorner MO. Molecular cloning and expression of a human anterior pituitary receptor for growth hormone-releasing hormone. *Molecular endocrinology* 1993; 7: 77-84.

Girotti M, Weinberg MS, Spencer RL. Diurnal expression of functional and clock-related genes throughout the rat HPA axis: system-wide shifts in response to a restricted feeding schedule. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296: E888-E897.

Giustina A, Veldhuis JD. Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and the human. *Endocri Rev* 1998; 19: 717-797.

Glad CA, Kitchen EE, Russ GC, Harris SM, Davies JS, Gevers EF, Gabrielsson BG, Wells T. Reverse feeding suppresses the activity of the GH axis in rats and induces a preobesogenic state. *Endocrinology* 2011; 152: 869-882.

Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB, Korbonits M. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:2988-2991.

Goldenberg N, Barkan A. Factors regulating growth hormone secretion in humans. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2007; 36: 37-55.

Golombek D: Introducción: La máquina del tiempo. En Golombek D, comp. *Cronobiología Humana; ritmos y relojes biológicos en la salud y en la enfermedad*. Buenos Aires, Argentina; Universidad Nacional de Quilmes Ediciones, 2002:19-29.

Green CB, Takahashi JS, Bass J. The meter of metabolism. *Cell* 2008; 134: 728-742.

Gruart A, Delgado JM, Escobar C, Aguilar Roblero R: Los relojes que gobiernan la vida. Colecc. La ciencia para todos. Vol. 188 México, D.F.; Fondo de Cultura Económica, 2002.

Guido ME, de la Iglesia H: Bases moleculares de la cronobiología. En Golombek D, comp. *Cronobiología Humana; ritmos y relojes biológicos en la salud y en la enfermedad*. Buenos Aires, Argentina; Universidad Nacional de Quilmes Ediciones, 2002: 43-66.

Guillaumond F, Becquet D, Boyer B, Bosler O, Delaunay F, Franc JL, François-Bellan AM. DNA microarray analysis and functional profile of pituitary transcriptome under core-clock protein BMAL1 control. *Chronobiol Int* 2012; 29: 103-130.

Hansen LH, Madsen B, Teisner B, Nielsen JH, Billestrup N. Characterization of the inhibitory effect of growth hormone on primary preadipocyte differentiation. *Mol Endocrinol* 1998; 12: 1140-1149.

Harvey, S., *et al.* (1995) Growth Hormone. p. 97-162, *CRC Press*.

Hatori M, Vollmers C, Zarrinpar A, DiTacchio L, Bushong EA, Gill S, Leblanc M, Chaix A, Joens M, Fitzpatrick JA, Ellisman MH, Panda S. Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. *Cell Metab* 2012 2012; 15: 848-860.

Haus E. Chronobiology in the endocrine system. *Advance Drug Delivery Rev* 2007; 59: 985–1014.

Herzog ED. Neurons and networks in daily rhythms. *Nature Rev Neurosci* 2007; 8: 790-802.

Hoogerwerf WA, Hellmich HL, Cornélissen G, Halberg F, Shahinlan VB, Bostwick J, Savidge TC, Cassone VM. Clock gene expression in the murine gastrointestinal tract: endogenous rhythmicity and effects of a feeding regimen. *Gastroenterol* 2007; 133: 1250-1260.

Hosoda H, Kangawa K. Ghrelin measurement: present and perspectives. In: Ghigo E, Benso A, Broglio F. Boston, MA, eds. Ghrelin. Kluwer Academic Publishers, 2004: 225-236.

Inagaki, T, Lin VY, Regina Goetz R, Mohammadi M, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA. Inhibition of growth hormone signaling by the fasting-induced hormone FGF21 (2008) *Cell. Metabolism*. 8: 77-83.

Isley WL, Underwood LE, Clemmons DR. Dietary components that regulate serum somatomedin-C concentrations in humans. *J Clin Invest* 1983; 71: 175-182.

Ji S, Guan R, Frank SJ, Messina JL. Insulin inhibits growth hormone signaling via the growth hormone receptor/JAK2/STAT5B pathway. *J Biol Chem* 1999; 274: 13434-13442.

Juárez-Aguilar E, Castro-Muñozledo F, Guerra-Rodríguez NE, Reséndez-Pérez D, Martínez-Rodríguez HG, Barrera-Saldaña HA, Kuri-Harcuch W. Functional domains of human growth hormone necessary for the adipogenic activity of hGH/hPL chimeric molecules. *J Cell Science* 1999; 112: 3127-3135.

Kanamoto N, Akamizu T, Tagami T, Hataya Y, Moriyama K, Takaya K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Genomic structure and characterization of the 5'-flanking region of the human ghrelin gene. *Endocrinology* 2004; 145: 4144-4153.

Kaplan SA, Cohen P. Review: The somatomedin hypothesis 2007: 50 years later. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 4529-4535.

Katz LE, DeLeón DD, Zhao H, Jawad AF. Free and total insulin-like growth factor (IGF)-I levels decline during fasting: relationships with insulin and IGF-binding protein-1. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2978-2983.

Kirchner H, Gutierrez JA, Solenberg PJ, Pfluger PT, Czyzyk TA, Willency JA, Schürmann A, Joost HG, Jandacek RJ, Hale JE, Heiman ML, Tschöp MH. GOAT links dietary lipids with the endocrine control of energy balance. *Nat Med* 15: 741-745, 2009.

Ko CH, Takahashi JS. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet* 2006; 15: R271-R277.

Koukkari WL, Sothorn RB: General features of rhythms: terminology and characteristics In Koukkari WL, Sothorn RB, eds. *Introducing biological rhythms*. MN, USA; Springer Ed, 2006:19-65.

Krieger DT, Hauser H, Krey LC. Suprachiasmatic nuclear lesions do not abolish food-shifted circadian adrenal and temperature rhythmicity. *Science* 1977; 197: 398-399.

Lanfranco F, Motta G, Baldi M, Gasco V, Grottoli S, Benso A, Broglio F, Ghigo E, Arzt E, Bronstein M, Guitelman M eds. *Pituitary Today II: New Molecular, Physiological and Clinical Aspects*. *Front Horm Res*. 2010; 38: 206-211.

Leak RH, Moore RY. Topographic organization of suprachiasmatic nucleus projection neurons. *J Comp Neurol* 2001; 433: 312-334.

LeRoith, D, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A. The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocrine Rev*. 2001; 22: 53-74.

LeSauter J, Hoque N, Weintraub M, Pfaff DW, Silver R. Stomach ghrelin-secreting cells as food-entrainable circadian clocks. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 13582-13587.

Li J, Yi SQ, Wang HX, Yi N, Ogawa Y, Ozaki N, Itoh M. Immunolocalization of ghrelin in the stomach of Sprague-Dawley rat. *Anat Histol Embryol* 2011; 40: 95-99.

Lima FB, Hell NS, Timon-laria C, Scivoletto R, Dolnikoff MS, Pupo AA. Metabolic consequences of food restriction in rats. *Physiol Behav* 1981; 27: 115-123.

López M, Lage R, Saha AK, Pérez-Tilve D, Vázquez MJ, Varela L, Sangiao-Alvarellos S, Tovar S, Raghay K, Rodríguez-Cuenca S, Deoliveira RM, Castañeda T, Datta R, Dong JZ, Culler M, Sleeman MW, Álvarez CV, Gallego R, Lelliott CJ, Carling D, Tschöp M, Diéguez C, Vidal-Puig A. Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin. *Cell Metabolism* 2008; 7: 389–399.

Lowrey PL, Takahashi JS. Mammalian circadian biology: Elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2004; 5: 407–441.

Luna-Moreno D, Aguilar-Roblero R, Díaz-Muñoz M. Restricted feeding entrains rhythms of inflammation-related factors without promoting an acute-phase response. *Chronobiol Int* 2009; 26: 1409-1429.

Luna-Moreno D, Vázquez-Martínez O, Báez-Ruiz A, Ramírez J, Díaz-Muñoz M. Food restricted schedules promote differential lipoperoxidative activity in rat hepatic subcellular fractions. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2007; 146: 632-643.

Mano-Otagiri A, Nemoto T, Sekino A, Yamauchi N, Shuto Y, Sugihara H, Oikawa S, Shibasaki T. Growth hormone-releasing hormone (GHRH) neurons in the arcuate nucleus (Arc) of the hypothalamus are decreased in transgenic rats whose expression of ghrelin receptor is attenuated: Evidence that ghrelin receptor is involved in the up-regulation of GHRH expression in the arc. *Endocrinology* 2006; 147: 4093-4103.

Marcheva B, Ramsey KM, Buhr ED, Kobayashi Y, Su H, Ko CH, Ivanova G, Omura C, Mo S, Vitaterna MH, López JP, Philipson LH, Bradfield CA, Crosby SD, JeBailey L, Wang X, Takahashi JS, Bass J. Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature* 2010; 466: 627-631.

Martínez-Coria H, López-Rosales LJ, Carranza M, Berumen L, Luna M, Arámburo C. Differential secretion of chicken growth hormone variants after growth hormone–releasing hormone stimulation in vitro. *Endocrine* 2002, 17: 91-102.

Martínez-Merlos MT, Ángeles-Castellanos M, Díaz-Muñoz M, Aguilar-Roblero R, Mendoza J, Escobar C. Dissociation between adipose tissue signals, behavior and the food-entrained oscillator. *J Endocrinol* 2004; 181: 53-63.

Menaker M. Biological clocks. *BioScience* 1969; 19: 681–689.

Mendoza J, Challet E. Brain clocks: from the suprachiasmatic nuclei to a cerebral network. *Neuroscientist* 2009; 15:477-488.

Mendoza J, Pévet P, Felder-Schmittbuhl MP, Yannick B, Challet E. The cerebellum harbors a circadian oscillator involved in food anticipation. *J Neurosci* 2010; 30: 1894-1904.

Mendoza J. Circadian clocks: setting time by food. *J Neuroendocrinol* 2006; 19: 127-137.

Mistlberger RE. Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neurosci Behav Rev* 1994; 104: 535-545.

Mistlberger RE. Neurobiology of food anticipatory circadian rhythms. *Physiol Behav* 2011; 104: 535-545.

Mohawk JA, Green CB, Takahashi JS. Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annu Rev Neurosci* 2012; 35: 445-462.

Møller N, Jørgensen JO. Effects of growth hormone on glucose, lipid, and protein metabolism in human subjects. *Endocr Rev* 2009; 30: 152-177.

Moore RY. The organization of the human circadian timing system. *Prog Brain Res* 1992; 93: 101–117.

Morris CJ, Aeschbach D, Scheer FA. Circadian system, sleep and endocrinology. *Mol Cell Endocrinol* 2011; doi:10.1016/j.mce.2011.09.003.

Mrosovsky N: Rheostasis: the physiology of change. New York: Oxford University Press.1990.

Nørrelund H. The metabolic role of growth hormone in humans with particular reference to fasting. *Growth Horm & IGF Res* 2005; 15: 95-122.

Párrizas M, LeRoith D. Insulin-like growth factor-1 inhibition of apoptosis is associated with increased expression of the bcl-xL gene product. *Endocrinology* 1997; 138: 1355-1358.

Patel YC. Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol* 1999; 20: 157-198.

Pérez-Mendoza M, Rivera-Zavala JB, Díaz-Muñoz M. Daytime restricted feeding modifies the daily variations of liver gluconeogenesis: Adaptations in biochemical and endocrine regulators. *Chronobiol Int* 2014; In press.

Pilecka I, Whatmore A, van Huijsduijnen RH, Destenaves B, Clayton P. Growth hormone signalling: sprouting links between pathways, human genetics and therapeutic options. *Trends Endocrinol Metab* 2006; 18: 12-18.

Pittendrigh CS. Temporal organization: Reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu Rev Physiol* 1993; 55: 17-54.

Polidarová L, Sládek M, Soták M, Pácha J, Sumová A. Hepatic, duodenal, and colonic circadian clocks differ in their persistence under conditions of constant light and in their entrainment by restricted feeding. *Chronobiol Int* 2011; 28: 204-215.

Popovic V, Miljic D, Micic D, Damjanovic S, Arvat E, Ghigo E, Dieguez C, Casanueva FF. Ghrelin main action on the regulation of growth hormone release is exerted at hypothalamic level. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 8: 3450-3453.

Portaluppi F, Smolensky MH, Touitou Y. Ethics and methods for biological rhythm research on animals and human beings. *Chronobiol Int* 2010; 27: 1911-1929.

Refinetti R: Circadian Physiology. USA. CRC PressTaylor & Francis, 2006: 105-213.

Reisine T, Bell GI. Molecular biology of somatostatin receptors. *Endocrine Rev* 1995; 16: 427-442.

Rivera-Zavala JB, Báez-Ruiz A, Díaz-Muñoz M. Changes in the 24 h rhythmicity of liver PPARs and peroxisomal markers when feeding is restricted to two daytime hours. *PPAR Res* 2011; 261584 doi: 10.1155/2011/261584.

Sakata I, Park WM, Walker AK, Piper PK, Chuang JC, Osborne-Lawrence S, Zigman JM. Glucose-mediated control of ghrelin release from primary cultures of gastric mucosal cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; 302: E1300-E1310.

Salgado-Delgado R, Angeles-Castellanos M, Saderi N, Buijs RM, Escobar C. Food intake during the normal activity phase prevents obesity and circadian desynchrony in a rat model of night work. *Endocrinology* 2010; 151: 1019-1029.

Scanes GC. Growth hormone action: Endocrine Function. Growth Hormone, W.H. Harvey, Stephen; Scanes, Colin G.; Daughaday, ed. 1995; 423-428.

Schibler U, Ripperger J, Brown SA. Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *J Biol Rhythms* 2003; 18: 250-260.

Schmutz MW, Woods SC, Porte Jr D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000; 404: 661-671.

Schmutz I, Albrecht U, Ripperger JA. The role of clock genes and rhythmicity in the liver. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 349: 38-44.

Scott CD, Martin JL, Baxter RC. Rat hepatocyte insulin-like growth factor I and binding protein: effect of growth hormone *in vitro* and *in vivo*. *Endocrinology* 1985; 116: 1102-1107.

Shrestha YB, Wickwire K, Giraud SQ. Direct effects of nutrients, acetylcholine, CCK, and insulin on ghrelin release from the isolated stomachs of rats. *Peptides* 2009; 30: 1187-1191.

Sönmez MF, Ozan E. Determination of ghrelin immunoreactivity in the rat stomach after fasting and refeeding. *Acta Histochem* 2007; 109:193-199.

Stanley S, Wynne K, MCGowan B, Bloom S. Hormonal regulation of food intake. *Physiol Rev* 2005; 85: 1131-1158.

Stephan FK, Zucker I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Nat Acad Sci USA* 1972; 69: 1583-1586.

Stephan FK. Limits of entrainment to periodic feeding in rats with suprachiasmatic lesions. *J Comp Physiol* 1981; 143: 401-410.

Stephan FK. The "other" circadian system: food as a zeitgeber. *J Biol Rhythms* 2002; 17: 284-292.

Stratikopoulos E, Szabolcs M, Dragatsis I, Klinakisa A, Efstratiadis A. The hormonal action of IGF1 in postnatal mouse growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 19378-19383.

Sun Y, Ahmed S, Smith RG. Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 7973-7981.

Tannenbaum GS, Martin JB. Evidence for an endogenous ultradian rhythm governing growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 1976; 98: 562-570.

Tannenbaum GS, Painson JC, Lengyel AM, Brazeau P. Paradoxical enhancement of pituitary growth hormone (GH) responsiveness to GH-releasing factor in the face of high somatostatin tone. *Endocrinology* 1989; 1380-1388.

Toshinai K, Mondal MS, Nakazato M, Date Y, Murakami N, Kojima M, Kangawa K, Matsukura S. Upregulation of ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced

hypoglycemia, and leptin administration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 5: 1220-1225.

Uchida A, Zigman JM, Perelló M. Ghrelin and eating behavior: evidence and insights from genetically-modified mouse models. *Front Neurosci* 2013; 7: 1-10.

Upton Z, Yandell C, Degger BG, Chan SJ, Moriyama S, Francis GL, Ballard FJ. Evolution of insulin-like growth factor-I (IGF-I) action: in vitro characterization of vertebrate IGF-I proteins. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 1998; 121: 35-41.

Veldhuis JD, Bowes CY. Integrating GHS into the ghrelin system *Int J Peptides* 2010; doi: 10-115512010/879503

Wang P, Mariman E, Renes J, Keijer J. The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue. *J Cell Physiol* 2008; 216: 3-13.

Wells T. Ghrelin – defender of fat. *Prog Lipid Res* 2009; 48:257-274.

Wortley KE, Anderson KD, Garcia K, Murray JD, Malinova L, Liu R, Moncrieffe M, Thabet K, Cox HJ, Yancopoulos GD, Wiegand SJ, Sleeman MW. Genetic deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101: 8227-8232.

Wortley KE, del Rincon JP, Murray JD, Garcia K, Iida K, Thorner MO, Sleeman MW. Absence of ghrelin protects against early-onset obesity. *J Clin Invest* 2005; 115: 3573-3578.

Wronska A, Kmiec Z. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta Physiol* 2012; 205: 194-208.

Yakar S, Pennisi P, Wu Y, Zhao H, LeRoith D. Clinical relevance of systemic and local IGF-I. *Endocr Dev* 2005; 9:11-16.

Zhang W, Chai B, Li JY, Wang H, Mulholland MW. Effect of des-acyl ghrelin on adiposity and glucose metabolism. *Endocrinology* 2008; 149: 4710-4716.

Zigman JM, Nakano Y, Coppari R, Balthasar N, Marcus JN, Lee CE, Jones JE, Deysher AE, Waxman AR, White RD, Williams TD, Lachey JL, Seeley RJ, Lowell BB, Elmquist JK. Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. *J Clin Invest* 2005; 115: 3564-3572.

“Entre los individuos cómo entre las naciones, el respeto al derecho ajeno es la paz”. Benito Pablo Juárez García.

14. Publicaciones

14.1 Ritmicidad biológica de la secreción de ghrelina, GH e IGF-1, y su relación por la alimentación (2002).

14.2 The circadian timing system: a recent addition in the physiological mechanisms underlying pathological and aging processes (2014).

14.3 Daily patterns and adaptation of the ghrelin, growth hormone and insulin-like growth factor-1 system under daytime food synchronisation in rats (2014).