



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estado redox y estrés oxidante durante el ayuno

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Pedro Rojas Morales

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. José Pedraza Chaverri

Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Claudia González Espinosa

Instituto Politécnico Nacional

Dr. Abraham Landa Piedra

Facultad de Medicina

Ciudad de México. Enero, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

—Muy bien, ¿y qué es, pues, lo que tú puedes dar? ¿Qué sabes hacer?

—Sé pensar, esperar y ayunar.

—¿Eso es todo?

—Creo que eso es todo.

—¿Y para qué sirve? Por ejemplo, el ayuno ¿para qué?

—Es muy bueno, señor. Cuando una persona no tienen nada qué comer, el ayuno es la cosa más inteligente que puede hacer. Si, por ejemplo, Siddharta no hubiera aprendido a ayunar, tendría que aceptar cualquier tipo de trabajo antes de que terminara este día, ya sea que estuviera con usted o no, porque el hambre lo hubiera forzado a hacerlo. Pero ahora, Siddharta puede esperar en calma, no sabe impaciencia, no sabe de emergencias; durante un largo tiempo puede permitir que el hambre lo acose y puede reírse de ello. Esto, señor, es para lo que el ayuno es bueno.

Siddharta
Hermann Hesse

Reconocimientos

Esta tesis se realizó en el laboratorio 209, Edificio F, Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM bajo la dirección del Dr. José Pedraza Chaverri.

Se agradece la asesoría del Comité Tutor conformado por:

Dr. José Pedraza Chaverri. Facultad de Química, UNAM.

Dra. Claudia González Espinosa. CINVESTAV, IPN.

Dr. Abraham Landa Piedra. Facultad de Medicina, UNAM.

Se agradece la asesoría a los miembros del Jurado de Examen:

Presidente	Armando Roberto Tovar Palacio	Instituto Nacional de Nutrición
Vocal	Wilhelm Hansberg Torres	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Victoria Chagoya de Sánchez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Veronica Guarner Lans	Instituto Nacional de Cardiología
Secretario	Susana Castro Obregón	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Esta tesis fue apoyada por CONACYT 220046 y 252008 y por PAPIIT IN201316.

Agradecimientos

A mi familia por apoyarme en todo momento. ¡Infinitas gracias!

Al Dr. José Pedraza por abrirme las puertas de su laboratorio y por dejarme proponer y desarrollar mis ideas. ¡Aún quedan muchas cosas por hacer con mi molécula favorita el β -hidroxibutirato!

A Omar por ser paciente conmigo cuando necesité este o aquel reactivo y por regañarme casi todos los días: ¡Pedro, la bata!

A todos los niños y amiguitos del 209, los viejos y los nuevos. NOT!

A las doctoras Edilia, Gaby y Ceci por ayudarme de múltiples maneras durante mi estancia en el Instituto Nacional de Cardiología.

A todos aquellos que me dedicaron un poquito de su valioso tiempo durante el desarrollo de esta tesis y me apoyaron en los 80 mil experimentos fallidos. ¡Ay!

A mis amiguitos del bosque y a los de la UAM.

ÍNDICE

1 RESUMEN	3
2 INTRODUCCIÓN	4
2.1 Respuesta fisiológica y molecular a la privación de alimento	4
2.1.1 El ayuno como un fenómeno fisiológico	4
2.1.2 Adaptación metabólica durante el ayuno	6
2.1.3 Movilización de sustratos energéticos durante el ayuno	7
2.1.4 Coordinación del metabolismo energético durante el ayuno	9
2.1.5 Papel de la autofagia durante el ayuno	9
2.2 Ayuno, estado redox y estrés oxidante	11
2.2.1 Especies reactivas del oxígeno y estrés oxidante	11
2.2.2 El factor de transcripción Nrf2	12
2.2.3 Efecto del ayuno sobre el estado redox y el estrés oxidante	14
3 JUSTIFICACIÓN	16
4 HIPÓTESIS	16
5 OBJETIVOS	16
5.1 Objetivo general	16
5.2 Objetivos particulares	17
6 MATERIALES Y MÉTODOS	17
6.1 Reactivos	17
6.2 Animales de experimentación	17
6.3 Protocolo de restricción de alimento y obtención de muestras	18
6.4 Parámetros bioquímicos en el plasma	18
6.5 Especies reactivas del oxígeno, tioles y marcadores de estrés oxidante	18
6.6 Ensayos enzimáticos	19
6.7 Inmunodetección	21
6.8 Análisis estadístico	21
7 RESULTADOS	21

7.1 Estado metabólico de las ratas durante el ayuno	21
7.2 Especies reactivas del oxígeno y marcadores de estrés oxidante	22
7.3 Estado redox durante el ayuno	23
7.4 Enzimas antioxidantes durante el ayuno	24
8 DISCUSIÓN	27
9 CONCLUSIÓN	29
10 PERSPECTIVAS	30
11 REFERENCIAS	31

Abreviaturas

AMPK	Cinasa activada por AMP
ARE	Elemento de respuesta antioxidante
DCFH-DA	2,7-diacetato de diclorofluoresceína
DNPB	2,4-dinitrofenilhidrazina
DTNB	Ácido 5,5-ditionitrobenzoico
g	Gravedades
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación
GST	Glutación S transferasa
HO-1	Hemo oxigenasa 1
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogeno
MDA	Malondialdehido
NADPH	Dinucleotido de nicotinamida y adenina fosfato reducido
NOX	NADPH oxidasa
NOS	Sintasa del óxido nítrico
NQO1	NADPH quinona oxidoreductasa 1
NRF2	Factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2
RNS	Especies reactivas del nitrógeno
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SOD	Superóxido dismutasa
U	Unidades
URF	Unidades relativas de fluorescencia

1 RESUMEN

Los organismos han desarrollado mecanismos adaptativos que les permiten sobrevivir bajo diversas situaciones de estrés. Una forma de estrés bastante común en la vida silvestre es la escasez del alimento o la hambruna. La privación del alimento o ayuno induce cambios metabólicos en muchos tejidos que son necesarios para mantener el balance energético global y asegurar la supervivencia de los organismos hasta que las condiciones se restablezcan. Actualmente se sabe que además de inducir cambios metabólicos sistémicos el ayuno causa un desequilibrio en el ambiente redox celular en favor del estrés oxidante, particularmente en el hígado. En este sentido, sin embargo, aún se desconoce si el ayuno afecta de la misma forma a otros tejidos.

En este trabajo se estudió el efecto del ayuno sobre la homeostasis redox en distintos tejidos de la rata. Se encontró que el ayuno modifica de manera diferente el estado redox celular en los distintos tejidos: mientras que en el riñón y en corazón se inducen sistemas de defensa antioxidantes, en el hígado la defensa antioxidante se reduce. Nuestros resultados sugieren que el ayuno afecta moderadamente el estado redox celular y activa mecanismos de defensa antioxidantes tejido-específicos para contrarrestar a las especies reactivas del oxígeno.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Respuesta fisiológica y molecular a la privación de alimento

2.1.1 El ayuno como un fenómeno fisiológico

Los seres vivos están expuestos constantemente a diversas situaciones de estrés. Un fenómeno o forma de estrés que probablemente todo organismo experimenta es la escasez del alimento o la hambruna. En la vida silvestre el tiempo que pasa entre una comida y la siguiente es impredecible, pudiendo durar sólo algunas horas o prolongarse hasta por varios días o meses. El ayuno es el estado fisiológico que se presenta entre cada periodo de ingesta de alimento y generalmente dura algunas horas en condiciones de abundante comida. En este periodo los organismos usan sus recursos energéticos para realizar actividades como el ejercicio, termorregulación o actividades relacionadas con la reproducción. Sin embargo, existen varios factores que pueden afectar la duración del ayuno, por ejemplo, la época del año, el estadio de desarrollo y la etapa reproductiva, principalmente. Bajo ciertas condiciones, por ejemplo durante las grandes migraciones o para sobrevivir a condiciones ambientales desfavorables como el invierno o las sequías, ciertos organismos hibernan o entran en estadios de diapausa, con lo que dejan de consumir alimento por periodos muy variados sin que esto implique mayores complicaciones. En otros casos el ayuno puede prolongarse indefinidamente, obligando a los organismos a hacer uso de todas sus reservas energéticas, lo que eventualmente los conduce a la muerte. Es en esta etapa cuando el ayuno se convierte en el estado patológico que conocemos como inanición ([McCue, 2010](#); [Wang et al., 2006](#)).

Por otro lado, el ayuno, particularmente el ayuno prolongado (de más de 18 horas), se ha practicado por milenios en humanos y, al igual que la restricción calórica—reducción en la ingesta del alimento en un ~20-40% por varias semanas o meses—, tiene efectos positivos en la salud al desencadenar respuestas adaptativas que culminan con la optimización del metabolismo energético y la activación de mecanismos de protección celular ([Masoro, 2005](#); [Trepanowski &](#)

Bloomer, 2010; Longo & Mattson, 2014). En este sentido, la restricción calórica es la intervención más importante con la que se cuenta actualmente para promover la longevidad y retardar la aparición de los trastornos o enfermedades relacionadas con el envejecimiento (Fontana et al., 2010; Hine & Mitchell, 2012).

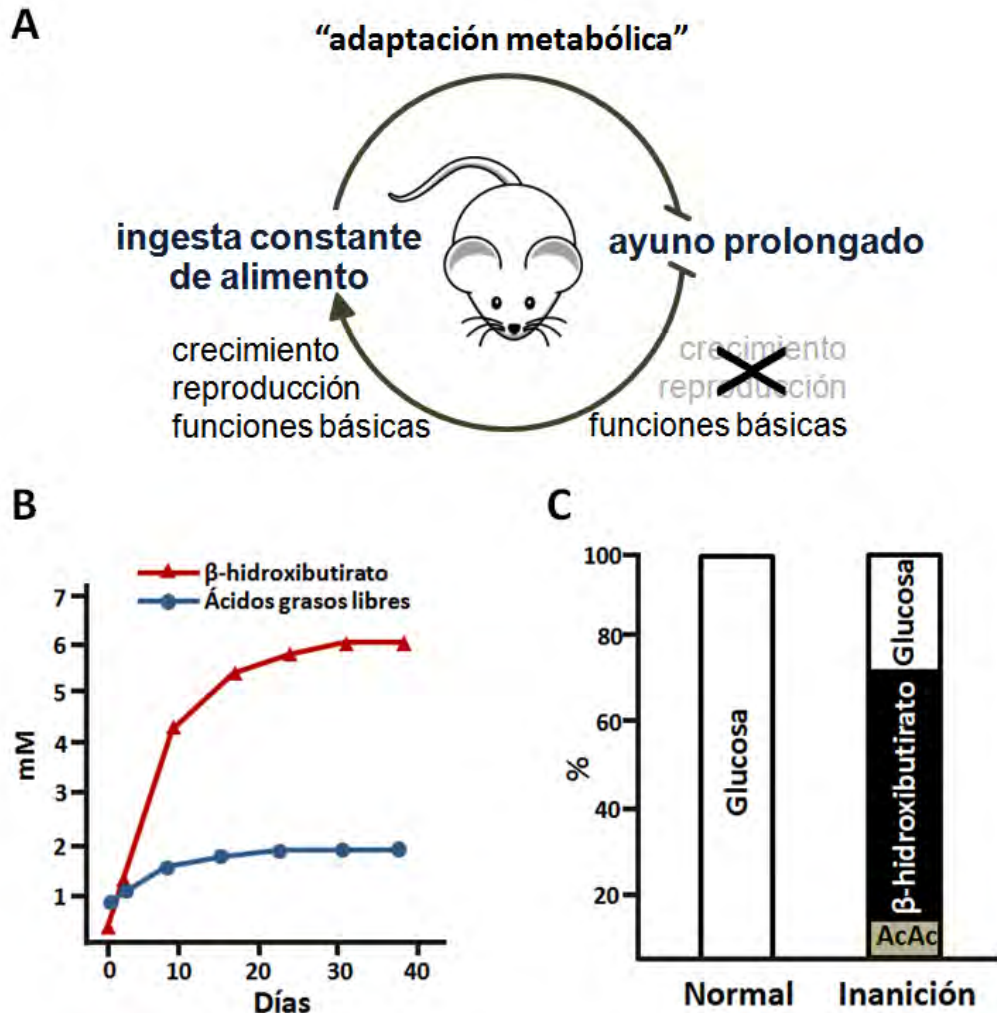


Figura 1. Cambios metabólicos durante el ayuno. (A) En el ayuno prolongado el uso de las reservas energéticas está destinado exclusivamente para el mantenimiento de las funciones básicas. (B) Concentración de β -hidroxibutirato y de ácidos grasos libres en el plasma durante el ayuno en humanos. (C) Utilización de sustratos energéticos por el cerebro durante varias semanas de ayuno (inanición) en humanos obesos. (B, C) Adaptado de Cahill, 2006. AcAc, Acetoacetato.

2.1.2 Adaptación metabólica durante el ayuno

La adaptación metabólica es la respuesta mas importante que ocurre durante el ayuno. Comprende un conjunto de cambios a nivel bioquímico, fisiológico e incluso a nivel del comportamiento que están destinados al mantenimiento de la homeostasis energética y a la preservación de las funciones metabólicas esenciales, dejando de lado procesos como el crecimiento y la reproducción, con el fin de asegurar la supervivencia hasta que las condiciones se restablezcan (Figura 1) (McCue, 2010; Wang et al., 2006).

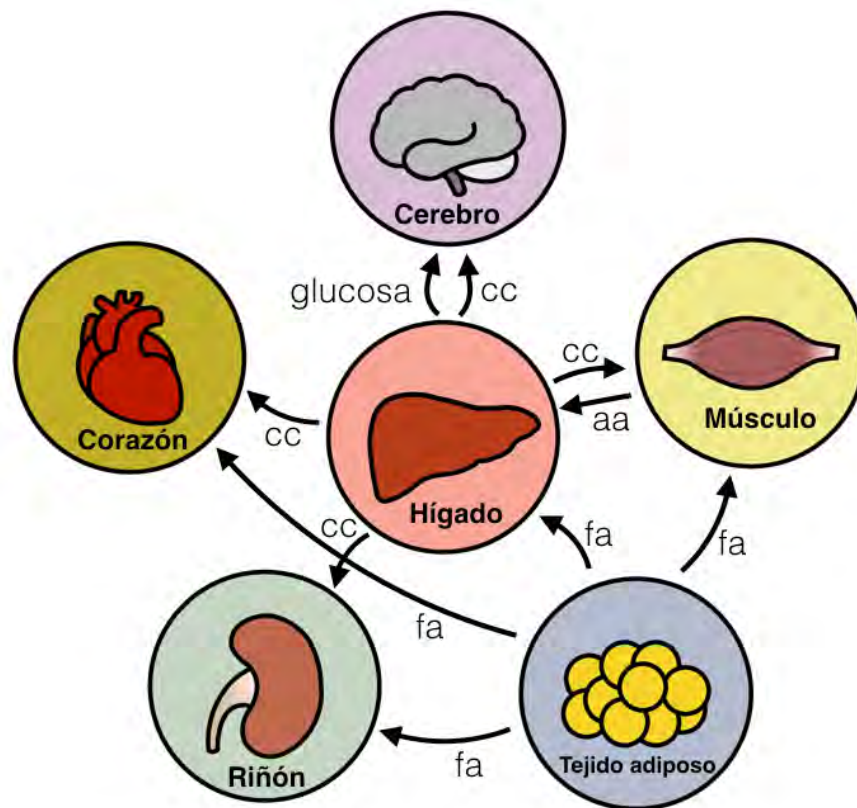


Figura 2. Movilización de sustratos energéticos durante el ayuno. Durante el ayuno las reservas energéticas en forma de ácidos grasos (fa) en el tejido adiposo son usadas para mantener la homeostasis energética en distintos órganos y preservar los niveles de glucosa en sangre para uso del cerebro, principalmente. Los cuerpos cetónicos (cc), los cuales se producen por el metabolismo de ácidos grasos y algunos aminoácidos (aa), también se usan como sustratos energéticos por los tejidos periféricos durante la privación de alimento.

Los cambios metabólicos que ocurren durante el ayuno involucran la participación de varios órganos y sistemas y la activación o supresión de múltiples vías metabólicas (Goldstein & Hager, 2015). Por ejemplo, durante el ayuno se inhibe la síntesis de macromoléculas y se activan procesos como la glucogenólisis y la gluconeogénesis con el fin de mantener los niveles de glucosa en sangre constantes (~80 mg/dL) y así asegurar el funcionamiento del cerebro, principalmente. Cuando el ayuno se prolonga los procesos de lipólisis, β -oxidación y cetogénesis se acentúan favoreciendo la movilización y utilización de los lípidos almacenados en el tejido adiposo para la síntesis de cuerpos cetónicos en el hígado (Figura 1B). En este sentido, los cuerpos cetónicos tales como el β -hidroxibutirato y acetoacetato toman un papel central en la homeostasis energética durante los periodos prolongados de ayuno al proveer más del 50% de la energía que el cerebro y otros órganos necesitan para funcionar correctamente (Figura 1C) (Owen, 2005; Cahill, 2006; Rui, 2014). Con un ayuno prolongado, cuando se alcanza el estado de inanición y la reserva energética en forma de lípidos se agota, se promueve el catabolismo elevado de proteínas, provocando caquexia, falla orgánica y, en última instancia, la muerte (McCue, 2010; Wang et al., 2006).

2.1.3 Movilización de sustratos energéticos durante el ayuno

Probablemente el hígado es uno de los órganos más afectados durante ayuno ya que coordina e integra múltiples señales metabólicas y diversos sustratos energéticos de los distintos órganos periféricos (Rui, 2014). También el tejido adiposo, el músculo esquelético, el riñón y el corazón sufren cambios drásticos para hacer frente al estrés metabólico y satisfacer la demanda energética global (Figura 2). Por ejemplo, para obtener energía en forma de ATP, en condiciones normales el corazón usa principalmente ácidos grasos, pero durante el ayuno, además de ácidos grasos, el corazón usa cuerpos cetónicos (Taegtmeyer, 1994; Cotter et al., 2013). De la misma forma, durante el ayuno en el músculo esquelético se reduce la captura de glucosa y se promueve la utilización de lípidos y cuerpos cetónicos. En las primeras horas de ayuno, el músculo libera aminoácidos a la circulación para promover la gluconeogénesis y cetogénesis en

el hígado (Felig et al., 1970). Los triglicéridos almacenados en los adipocitos contribuyen notablemente a la gluconeogénesis y, sobre todo, a la cetogénesis mediante su rompimiento y subsecuente liberación de ácidos grasos y glicerol (Figura 3). También el riñón contribuye al mantenimiento de los niveles de glucosa en condiciones normales y en periodos de estrés metabólico mediante la activación de la gluconeogénesis (Owen et al., 1969; Bennett et al., 1975). Además, en varios estudios se describe el papel del riñón en la producción de cuerpos cetónicos durante los periodos de estrés (Nakatani et al., 1996; Zhang et al., 2011; Takagi et al., 2016). En conjunto, durante el ayuno ocurre un cambio metabólico en muchos tejidos para así sobrevivir a la falta de nutrientes.

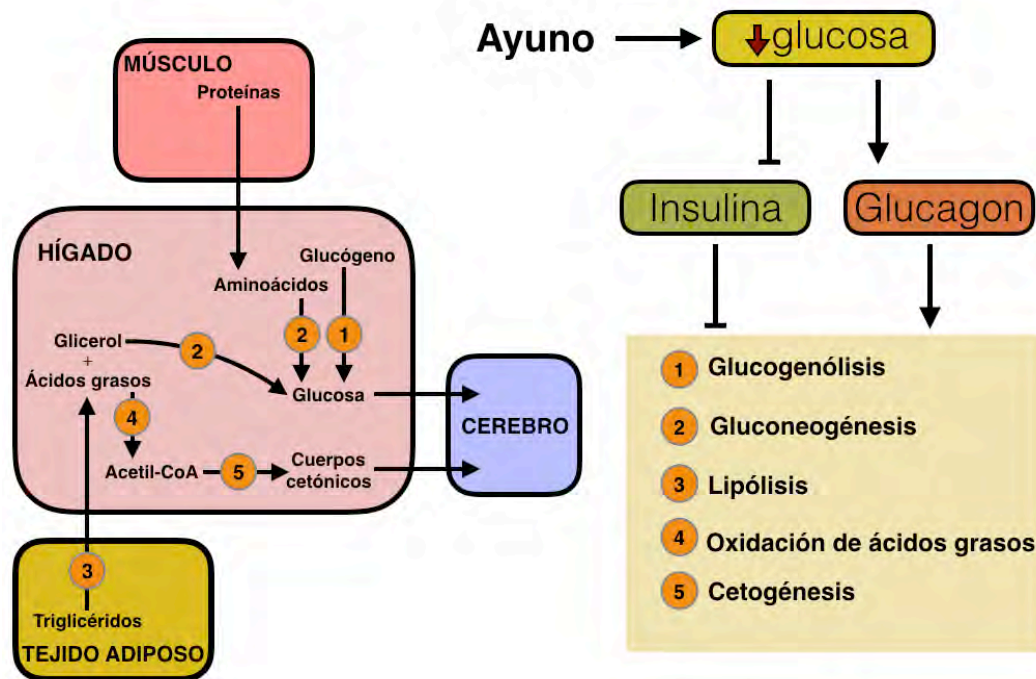


Figura 3. Regulación de las vías metabólicas por la insulina y el glucagón. Los bajos niveles de glucosa durante el ayuno promueven la liberación de glucagón que a su vez promueve la utilización del glucógeno y triglicéridos para proveer de glucosa y cuerpos cetónicos al cerebro, principalmente.

2.1.4 Coordinación del metabolismo energético durante el ayuno.

El control de la homeostasis energética durante los periodos alternos de ingesta de alimento y de ayuno es de suma importancia para los organismos, por lo que el metabolismo se regula a nivel fisiológico mediante la integración de múltiples sistemas y ejes de regulación neuroendócrina (Haller & Bines, 2013; Jensen et al., 2013; Lempradl et al., 2015). Es importante el control del balance energético global durante el ayuno a través de la inducción del glucagon y la represión de la insulina que en conjunto controlan la diferentes vías metabólicas que se activan durante el ayuno (Figura 3) (Stanley et al., 2005; Lin & Accili, 2011). Estas hormonas ejercen sus efectos a través de las cinasas como AKT, PKA, mTOR, y AMPK que activan/inhiben factores de transcripción como el receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR), los factores con dominios “Forkhead-Box” (FOXO), el factor nuclear hepático 4 alfa (HNF4 α), el receptor X ferosoide (FXR) y la proteína de unión al elemento de respuesta a AMP cíclico (CREB) (Oh et al., 2013). También a través co-activadores y co-represores tales como el co-activador 1 alfa de PPAR gamma (PGC-1 α), la proteína de unión a CREB (CBP/p300), el co-represor 1 del receptor nuclear (NCoR1) y el co-activador transcripcional 2 regulado por CREB (CRTC2), principalmente (Jiang & Zhang, 2003; Savage, 2005; Jitrapakdee, 2012; Kersten, 2014). Otros elementos que juegan un papel relevante en la regulación del metabolismo energético son las sirtuinas, las cuales se activan en respuesta al ayuno (Gillum et al., 2011; Li, 2013; Li et al., 2014).

2.1.5 Papel de la autofagia durante el ayuno

La autofagia (macroautofagia, microautofagia y la autofagia mediada por chaperonas) es un proceso catabólico conservado que consiste en la degradación de componentes celulares dentro de los lisosomas. La macroautofagia es un tipo particular de autofagia que se induce durante el ayuno en altos niveles en múltiples tejidos (Figura 4). En la macroautofagia los componentes celulares son secuestrados en estructuras de doble membrana que se conocen como autofagosomas que posteriormente se fusionan con los lisosomas para la

degradación de las macromoléculas en aminoácidos, carbohidratos y ácidos grasos (Singh & Cuervo, 2011; Rabinowitz & White, 2010). Durante el ayuno prolongado se induce la autofagia mediada por chaperonas que degrada selectivamente ciertas proteínas que no se requieren en ese momento y que tienen una secuencia de aminoácidos (KFERQ) que es reconocida por ciertas chaperonas que las conducen a los lisosomas. De esta manera tanto la macroautofagia como la autofagia mediada por chaperonas se requieren durante los periodos de estrés. Por ejemplo, durante el ayuno la autofagia contribuye notablemente a la lipólisis, la gluconeogénesis y la cetogénesis (Madrigal-Mature & Cuervo, 2016; Tasset & Cuervo, 2016).

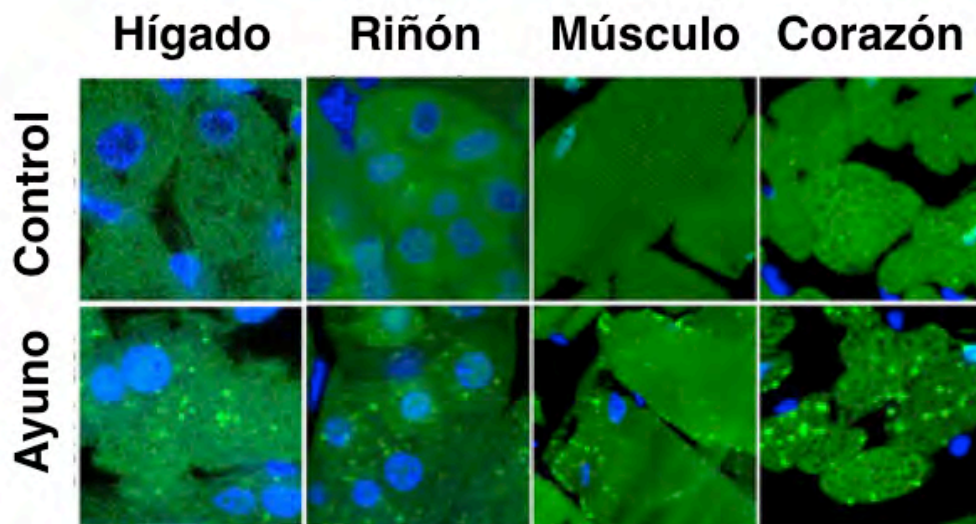


Figura 4. Inducción de la autofagia (macroautofagia) durante el ayuno. La macroautofagia se induce en respuesta al ayuno en el hígado, el riñón, el músculo esquelético y en el corazón de ratón. En verde se muestra a la proteína LC3-GFP, (un marcador de autofagia) que se agrega en focos discretos (autofagosomas) durante el ayuno. En azul se muestran los núcleos teñidos con DAPI. Tomado de Takagi et al., 2016.

2.2 Ayuno, estado redox y estrés oxidante

2.2.1 Especies reactivas del oxígeno y estrés oxidante

Durante el metabolismo se producen moléculas potencialmente tóxicas que pueden causar daño estructural y funcional a las células. Las especies reactivas del oxígeno (ROS) o del nitrógeno (RNS), tales como el anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), óxido nítrico (NO), peroxinitrito ($ONOO^-$) entre otras, radicales y no radicales, juegan un papel importante en la fisiología y patología celular.

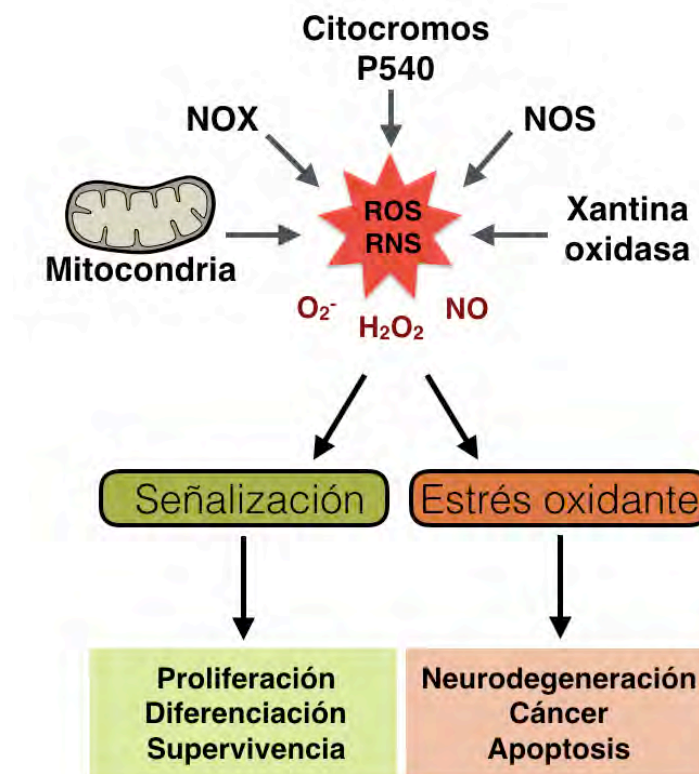


Figura 5. Función de las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno. Las especies reactivas de oxígeno y del nitrógeno, producidas por diversos sistemas enzimáticos, promueven la activación de sistemas de transducción de señales para la inducción de procesos celulares en bajas cantidades. Sin embargo, la acumulación de especies reactivas puede conducir al daño de macromoléculas causando estrés oxidante y propiciar el desarrollo de diferentes patologías.

Un nivel alto de ROS puede alterar el estado redox celular—el balance entre las especies antioxidantes y las pro-oxidantes—al reducir los sistemas antioxidantes y generar daño a moléculas como el DNA, las proteínas y los lípidos, en un proceso que conocemos como estrés oxidante y propiciar el desarrollo de desordenes tales como el cáncer, enfermedades metabólicas, neurodegenerativas y cardiovasculares (Wallace, 2005; Nunnari & Suomalainen, 2012; Szendroedi et al., 2011; Yan et al., 2013; Frezza & Gottlieb, 2009). Sin embargo, las ROS también tienen un papel fisiológico cuando sus niveles son bajos (Figura 5) (Sena & Chandel, 2012; Holmström & Finkel, 2014; Alfadda & Sallam, 2012).

Las ROS generadas por diversas fuentes tales como la mitocondria, la NADPH oxidasa (NOX), la sintasa del oxido nítrico (NOS), la xantina oxidasa, los citocromos P450 y otros sistemas, modifican covalentemente algunos residuos de aminoácidos en las proteínas que son sensibles a una modulación redox, regulando muchas veces su actividad enzimática (Finkel, 2011). Procesos como el metabolismo, la supervivencia, la proliferación y la diferenciación celular, mediante la activación/inactivación de receptores, canales iónicos, cinasas/fosfatasa y factores de transcripción, se regulan con las ROS/RNS (Schieber & Chandel, 2010; Sedeek et al., 2013; Scherz-Shouval & Elazar, 2011; Morgan & Liu, 2011; Holmström & Finkel, 2014).

2.2.2 El factor de transcripción NRF2

El control de la homeostasis redox y la prevención del estrés oxidante son de suma importancia para la célula, por tal motivo, existen sistemas antioxidantes, tanto enzimáticos como no enzimáticos, que neutralizan y eliminan los productos derivados del metabolismo de las ROS/RNS. El factor nuclear NRF2 es un factor de transcripción muy conservado (desde nemátodos hasta mamíferos) que responde a los cambios en el estado redox celular y al estrés oxidante mediante su unión al elemento de respuesta antioxidante (ARE) en el promotor de los genes de las enzimas como la hemo oxigenasa 1 (HO-1), NADPH quinona oxidoreductasa 1 (NQO1), catalasa, superóxido dismutasa (SOD) y las enzimas

que participan en el metabolismo del glutatión (GSH), como glutatión S transferasa (GST) y glutatión peroxidasa (GPx) entre otras (Figura 6). Cabe mencionar que, además de estimular la inducción de las proteínas antioxidantes y regular la degradación de las moléculas dañadas—a través del control de la expresión de genes relacionados con la autofagia y con el sistema Ubiquitina-Proteasoma (Cui et al., 2016)—, el factor NRF2 tiene un papel central en la regulación del metabolismo al inhibir la lipogénesis y favorecer la vía de las pentosas fosfato y la síntesis de purinas (Hayes & Dinkova-Kostova, 2014).

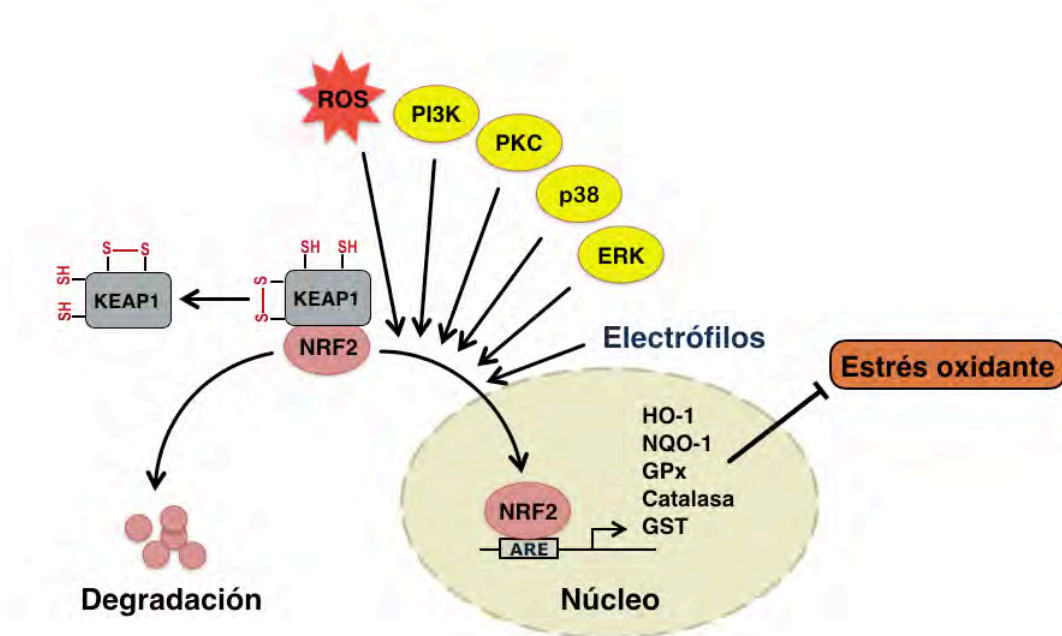


Figura 6. Regulación de la vía NRF2/ARE. El factor NRF2 responde a cambios en los niveles de ROS coordinando una respuesta antioxidante que reduce el estrés oxidante, lo que lo convierte en un regulador del ambiente redox celular. Diversas cinasas y moléculas electrofílicas promueven la activación de NRF2 al favorecer su translocación al núcleo.

El factor NRF2 se expresa constitutivamente en todas las células pero su actividad es reprimida por la proteína KEAP1. Bajo condiciones normales, NRF2 se traduce y es capturado en el citoplasma por KEAP1, formándose un complejo ternario con

los filamentos de actina y la ligasa de ubiquitinas CULLIN3, lo que favorece la ubiquitinación y subsecuente degradación de NRF2 por el proteasoma (Kaspar et al., 2009). Los agentes inductores de la vía NRF2/ARE reaccionan y modifican diversas cisteínas de KEAP1, favoreciendo la acumulación y estabilización de NRF2, su translocación al núcleo y la inducción de genes (Sykiotis & Bohmann, 2010; Keum & Choi, 2014; Sihvola & Levonen, 2016). Diversas cinasas y algunas moléculas pequeñas, entre ellas antioxidantes, modulan la actividad de esta vía (Niture et al., 2014; Hayes & Dinkova-Kostova, 2014).

2.2.3 Efecto del ayuno sobre el estado redox y el estrés oxidante

El ayuno supone un estrés metabólico que, dependiendo de la duración, puede conducir a alteraciones en la homeostasis redox. En varios estudios se ha descrito que el ayuno aumenta la generación de especies reactivas, promueve el estrés oxidante y disminuye los sistemas antioxidantes en el hígado (Domenicali et al., 2001; Marszuk-Krynicka et al., 2003; Sorensen et al., 2006; Zhang et al., 2012; Glick et al., 2012; Robinson et al., 1997; Morales et al. 2004) como resultado del metabolismo mitocondrial (Sorensen et al., 2006). Hay, sin embargo, otros trabajos que no encontraron diferencias significativas en la producción de ROS y de daño oxidante durante el ayuno (Abdelmegeed et al., 2009; Verweij et al., 2011). Otros estudios observaron que durante el ayuno disminuyen los niveles de GSH en el hígado y el pulmón, pero no en el músculo y el riñón (Jenniskens et al., 2002; Abdelmegeed et al., 2009; Zhang et al., 2012), sugiriendo una regulación diferente del estado redox en los distintos tejidos durante el ayuno.

Además de la mitocondria, el ayuno activa otros sistemas productores de ROS/RNS como los citocromos P450 en el hígado (Hong et al., 1987; Brown et al., 1995), la NOX en el corazón (Sciarretta et al., 2013) y la NOS en el cerebro (Liu & He, 2010). En otros trabajos se ha demostrado que la expresión de NRF2 (Xu et al., 2012; Zhang et al., 2012; Kulkarny et al., 2014) y de los genes regulados por NRF2 aumentan en respuesta al ayuno (Mitchell et al., 2010; Verweij et al., 2011; Jongbloed et al., 2014; Bakken et al., 1972; Rindler et al., 2013; Lammi-Keefe et

al., 1981). En este sentido, la inducción de los sistemas antioxidantes durante el ayuno también puede ser tejido-específico (Wohaieb & Godin, 1987).

Lo anterior sugiere la posibilidad de que el ayuno promueva la generación de ROS/RNS, ya sea como consecuencia del metabolismo mitocondrial o por la inducción de sistemas como la NOX, la NOS o los citocromos P450, activando los sistemas de defensa antioxidante mediados por NRF2. Debido a que existe discrepancia sobre la producción de las especies reactivas, el estrés oxidante y la activación de los sistemas antioxidantes durante la privación de alimento, es posible que el ayuno regule de manera diferente el nivel de ROS y el estado redox celular de manera tejido-específico.

Otro punto que sugiere una relación entre el ayuno y la activación de los sistemas antioxidantes es que el ayuno ejerce un efecto protector ante varias formas de estrés que implican la generación de ROS. Por ejemplo, el ayuno protege del etopósido en una dosis alta (Raffaghello et al., 2008; Tinkum et al., 2015) o de la doxorubicina (Lee et al., 2010) y también disminuye el daño renal y la mortalidad tanto en ratones jóvenes como en ratones viejos sometidos a períodos de isquemia-reperfusión (Mitchell et al., 2010; Jongbloed et al., 2014). El ayuno disminuye el daño por infarto al miocardio y la incidencia de arritmias después de la reperfusión (Snorek et al., 2012) y proporciona neuroprotección en un modelo de isquemia cerebral (Varendi et al., 2014). Además, el ayuno protege a las células sanas de una dosis alta de agentes quimioterapéuticos, pero no a las células tumorales (Raffaghello et al., 2008; Lee et al., 2010). Más aún, el ayuno no sólo no protege a las células cancerosas sino que además las vuelve más sensibles a la radio y quimioterapia en modelos murinos de glioblastoma (Safdie et al., 2012). Por otro lado, en un estudio clínico se encontró que pacientes con cáncer de mama, o de próstata, de esófago o de pulmón, a los que se les restringió el alimento por más de 48 h antes de la quimioterapia, presentaron menos efectos colaterales que los pacientes sin restricción alimentaria (Safdie et al., 2009). En este sentido, la activación de los sistemas antioxidantes con el ayuno, como resultado de un fenómeno hormético, puede explicar por qué los organismos son

más resistentes cuando son sometidos previamente a regímenes de privación del alimento (Gems & Partridge, 2008; Martín-Montalvo et al., 2011; Hine & Mitchell, 2012; Ristow & Schmeisser, 2014).

3 JUSTIFICACIÓN

Actualmente se conocen bien los mecanismos moleculares y la respuesta fisiológica global que se activan en los organismos y que hacen frente al estrés metabólico que supone la privación del alimento. Sin embargo, aunque diversos estudios muestran que el ayuno afecta el estado redox celular causando estrés oxidante, particularmente en el hígado, aún se desconoce si el ayuno afecta de la misma forma a otros tejidos.

4 HIPÓTESIS

Debido a que los tejidos exhiben respuestas bioquímicas y fisiológicas adaptativas particulares durante la falta de alimento, en órganos como el hígado, corazón y riñón el efecto del ayuno sobre el estado redox celular y el estrés oxidante es diferente.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la privación de alimento sobre el estado redox y el estrés oxidante en el hígado, corazón y riñón de la rata.

5.2 Objetivos particulares

- a) Caracterizar el estado metabólico de las ratas durante los tres primeros días de ayuno.
 - Medir los niveles de glucosa y de β -hidroxibutirato en plasma.
- b) Evaluar el estado redox y marcadores de estrés oxidante en el hígado, riñón y corazón de las ratas durante los tres primeros días de ayuno.
 - Medir los niveles de ROS, malondialdehído y de proteínas carboniladas.
 - Medir los niveles de tioles totales
- c) Evaluar la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa, NQO1, GST y GPx y la expresión de la HO-1 durante el ayuno.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Reactivos

Los siguientes reactivos se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA): 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (Tris), cloruro de sodio (NaCl), ácido diaminotetracético (EDTA), ácido etilenglicol tetracético (EGTA), fluoruro de sodio (NaF), orto vanadato de sodio (Na_3VO_4), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), desoxicolato de sodio, dodecilsulfato de sodio (SDS), nonidet p-40 (NP-40), Tritón X-100, 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), glutatión, 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), cloruro de guanidina, acida de sodio (NaN_3), mononucleotico de flavina y adenina (FAD), ácido 5,5-ditionitrobenzoico (DTNB), 1-metil-2-fenilindol (1M2F), NADPH, azul de tiazolil tetrazolio bromuro (MTT), menadiona, anti-tubulina y anti-HO1. Las membranas de floururo de polivinilideno (PVDF) se adquirieron de Millipore Corp. (Billerica, MA, EUA). La 2,7-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) y el estuche usado para la determinación de β -hidroxibutirato (No. 700190) se adquirieron de Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, EUA).

6.2 Animales de experimentación

Se usaron ratas Wistar macho de 8 semanas de edad con un peso de 240-260 g obtenidas de Envigo RMS (México), las cuales se alimentaron hasta el inicio de los

experimentos. Todos los experimentos se aprobaron por el comité de ética para el cuidado y uso de los animales de laboratorio de la Facultad de Química de la UNAM (FQ/CICUAL/094/15).

6.3 Protocolo de restricción del alimento y obtención de muestras

Al inicio de la restricción de alimento, las ratas (5-6 por grupo) se pusieron en cajas sin comida (5-6 ratas por caja) por uno, dos o tres días. Un grupo de ratas (grupo control) siempre tuvo acceso al alimento. En todo momento las ratas tuvieron libre acceso al agua. Después de someter o no a las ratas al protocolo de restricción del alimento éstas se sacrificaron entre las 8:00 y 10:00 a.m. La sangre, obtenida de la aorta abdominal con un jeringa con heparina, se centrifugó a 3500 *g* por 10 minutos a 4°C para obtener el plasma, el cual se almacenó a -80°C. Los órganos (hígado, riñón y corazón) se removieron inmediatamente, se lavaron con PBS frío, se cortaron en trozos pequeños de aproximadamente 0.5 cm³ y se almacenaron a -80°C hasta el momento de su uso.

6.4 Parámetros bioquímicos en el plasma

La concentración plasmática de glucosa se determinó por el método de la oxidación de la glucosa por la glucosa oxidasa usando el Analizador de química clínica automatizado ILab 300 Plus (Instrumentation Laboratory, Colorado Springs, CO, EUA) y la concentración de β-hidroxibutirato se midió usando el estuche de Cayman Chemical (No. 700190), el cual se basa en la oxidación de β-hidroxibutirato a acetoacetato por la enzima β-hidroxibutirato deshidrogenasa.

6.5 Especies reactivas del oxígeno, tioles y marcadores de estrés oxidante

Para medir las ROS, los tejidos se homogeneizaron en PBS y se centrifugaron a 15,000 *g* por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante (500 µg de proteínas) se incubó con la sonda DCFH-DA (que detecta H₂O₂, O₂⁻, NO, ONOO⁻ y otras especies reactivas) en oscuridad a una concentración final de 10 µM a 25°C durante 15 minutos (Buelna-Chontal et al., 2014). La señal de fluorescencia se detectó con el lector multiplaca Synergy HT de BioTek (Winooski, VA, USA) a una longitud de

onda de excitación y emisión de 495 y 529 nm, respectivamente. Los resultados se expresaron en unidades relativas de fluorescencia (URF).

Los tioles nativos totales se determinaron usando el reactivo DTNB a 412 nm (Ellman, 1959). 15 ul de sobrante se incubaron durante 10 minutos con 185 ul de la mezcla de reacción que comprende DTNB 0.81 mM y EDTA 0.81 mM en Tris 100 mM, pH 8.0. La concentración de tioles se determinó usando una curva estándar de GSH.

La concentración de malondialdehído (MDA) se determinó en el sobrenadante de tejidos homogeneizados en amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 7.4 (suplementado con el antioxidante hidroxitolueno butilado 5 mM) y centrifugados a 3,000 g por 10 minutos a 4°C. 200 ul de sobrenadante se incubaron con 650 ul de 1-metil-2-fenilindol 15.4 mM disuelto en una mezcla de acetonitrilo-metanol (3:1) y 150 ul de HCl concentrado. Inmediatamente, la mezcla se incubó a 45°C durante 40 minutos. Al finalizar la reacción, los aductos de MDA se detectaron a 586 nm. La concentración de MDA se determinó usando una curva estándar de tetrametoxipropano. Para la determinación de los carbonilos, las proteínas se incubaron con DNPH 10 mM en medio ácido por una hora. Posteriormente, las proteínas se precipitaron con ácido tricloroacético al 20% y el botón se lavó 3 veces con una mezcla de etanol-acetato de etilo (1:1). Finalmente, las proteínas se solubilizaron con cloruro de guanidina para cuantificar los grupos carbonilos a 370 nm. Se usó el coeficiente de extinción del DNPH de 22,000 M⁻¹cm⁻¹ (Levine et al., 1994).

6.6 Ensayos enzimáticos

La actividad de las enzimas antioxidantes se determinó en el sobrenadante de tejidos homogeneizados en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.4, Tritón X-100 0.05% y centrifugados a 15,000 g durante 20 minutos.

La actividad de la catalasa se evaluó mediante la desaparición del H₂O₂ (30 mM) durante 30 segundos con tres lecturas cada 15 segundos a 240 nm (Aebi, 1984). La actividad se expresó en unidades por miligramo de proteína (U/mg), en donde 1

U representa la desaparición de 1 μmol de H_2O_2 por minuto. Se usó el coeficiente de extinción molar del H_2O_2 de $40 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

La actividad de GPx se determinó usando el método descrito previamente (Orozco-Ibarra et al., 2007), el cual se basa en las reacciones de oxidación y reducción del glutatión por la GPx y la glutatión reductasa, respectivamente, que se acoplan al consumo de NADPH, el cual se midió a 340 nm. Las muestras (35 μl) se incubaron con 300 μl de la mezcla de reacción (EDTA 1 mM, NaN_3 1 mM, NADPH 0.2 mM, GSH 1 mM y glutatión reductasa U/ml) y 25 μl de H_2O_2 1.25 mM. La actividad de GPx se expresó en U/mg, en donde 1 U representa la oxidación de 1 μmol de NADPH por minuto.

La actividad de NQO1 se determinó usando el método descrito por Prochaska y Santamaria (1988), que usa la menadiona como sustrato y que se acopla a la reducción del MTT, el cual se detectó a 610 nm. Las muestras (30 μl) se incubaron con 140 μl de la mezcla de reacción (Tris 25 mM pH 8.0, Tween 20 0.01%, glucosa 6 fosfato 1 mM, glucosa 6 fosfato deshidrogenasa 0.2 U/ml, FAD 5 μM , NADP^+ 30 μM , MTT 0.3 mg/ml y menadiona 50 μM) durante 5 minutos. Para evaluar la actividad específica de NQO1 se usó el inhibidor dicumarol 45 μM . La actividad de NQO1 se expresó en nanomoles de formazán producidos por minuto por miligramo de proteína (nmol/min/mg) usando el coeficiente de extinción molar de $11,300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

La actividad de GST se evaluó mediante la formación del aducto CDNB-GSH a 340 nm durante 3 minutos. Las muestras (20 μl) se incubaron con 180 μl de la mezcla de reacción (GSH 1 mM, CDNB 1 mM y EDTA 1 mM en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 6.5). La actividad de GST se expresó en nmoles de CDNB-GSH producidos por minuto por miligramo de proteína. Se usó el coeficiente de extinción molar del aducto CDNB-GSH de $9,600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

6.7 Inmunodetección

Los tejidos se homogeneizaron en RIPA (Tris 50 mM, pH 8.0, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, EGTA 1 mM, NaF 5 mM, Na₃VO₄ 1 mM, PMSF 1 mM, desoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1%, NP-40 1%) y las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y se transfirieron a una membrana de PVDF. Las membranas se bloquearon con leche al 5% en TBST durante una hora y se incubaron con anticuerpos específicos durante toda la noche. El anticuerpo anti-HO-1 (1:1000) se adquirió de Enzo (SPA-895) y el anticuerpo anti-tubulina (1:5000) se adquirió de Sigma (T9026). Las proteínas de interés se detectaron usando el equipo de detección Odyssey Sa de LI-COR Biosciences (Lincoln, NE, EUA).

6.8 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como el promedio \pm error estándar de la media y se analizaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni, usando el paquete GraphPad PRISM versión 5.00. Las diferencias con $p \leq 0.05$ se consideraron como significativas.

7 RESULTADOS

7.1 Estado metabólico de las ratas durante el ayuno

El ayuno prolongado induce estrés metabólico en los organismos (Haller & Bines, 2013). Para caracterizar el efecto de la privación de alimento sobre la homeostasis redox, primero se estudió el estado metabólico de las ratas durante los tres primeros días de ayuno. La privación de alimento causó una disminución gradual del peso corporal de las ratas así como también disminuyó el nivel plasmático de glucosa y aumentó el nivel de β -hidroxibutirato (Figura 7). A pesar de una drástica pérdida de peso (~20%) en el tercer día, en ningún momento se observó mortalidad en los animales.

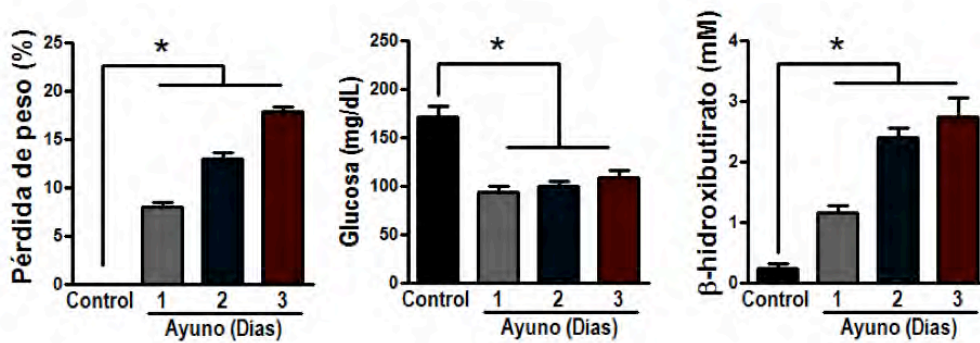


Figura 7. El ayuno causa estrés metabólico en las ratas. Se evaluó el peso corporal y el niveles plasmático de glucosa y de β -hidroxibutirato en las ratas ayunadas por 24-72 h. n=5-6; * p<0.05.

7.2 Especies reactivas de oxígeno y marcadores de estrés

El ayuno incrementa las ROS en varios tejidos (Domenicali et al., 2001; Marszuk-Krynicka et al., 2003; Sorensen et al., 2006; Zhang et al., 2012; Sciarretta et al., 2013). Para investigar si el ayuno afecta de la misma forma a tejidos diferentes, se estudió el efecto de la privación de alimento sobre los niveles de ROS en el riñón, el hígado y el corazón. En el riñón, el ayuno causó un ligero aumento en el nivel de ROS en el primer día de ayuno, para luego disminuir en el tercero. En el hígado, sin embargo, el ayuno indujo un aumento en las ROS desde el primer día de ayuno. En el corazón las ROS aumentaron hasta el segundo día, aunque en menor cantidad (Figura 8).

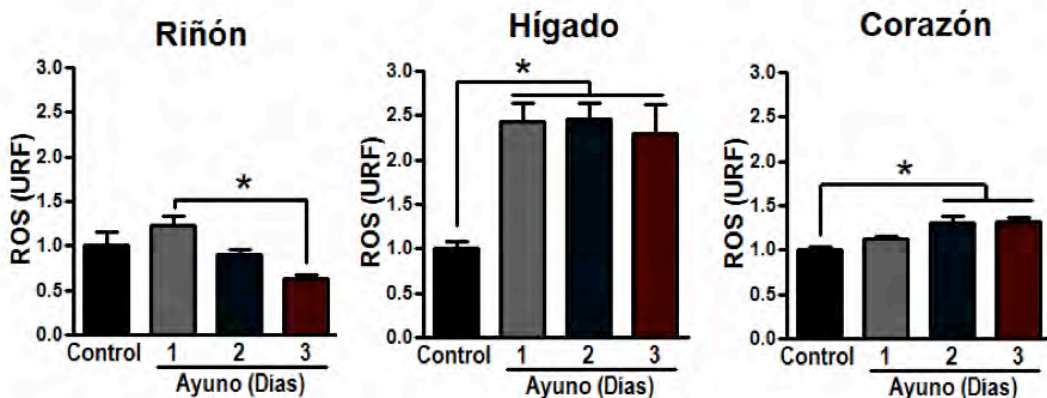


Figura 8. Las ROS se regulan de manera diferente en cada tejido durante el ayuno. Se evaluaron los niveles totales de ROS en el riñón, el hígado y el corazón de ratas ayunadas por 24-72 h. n=5-6; * p<0.05.

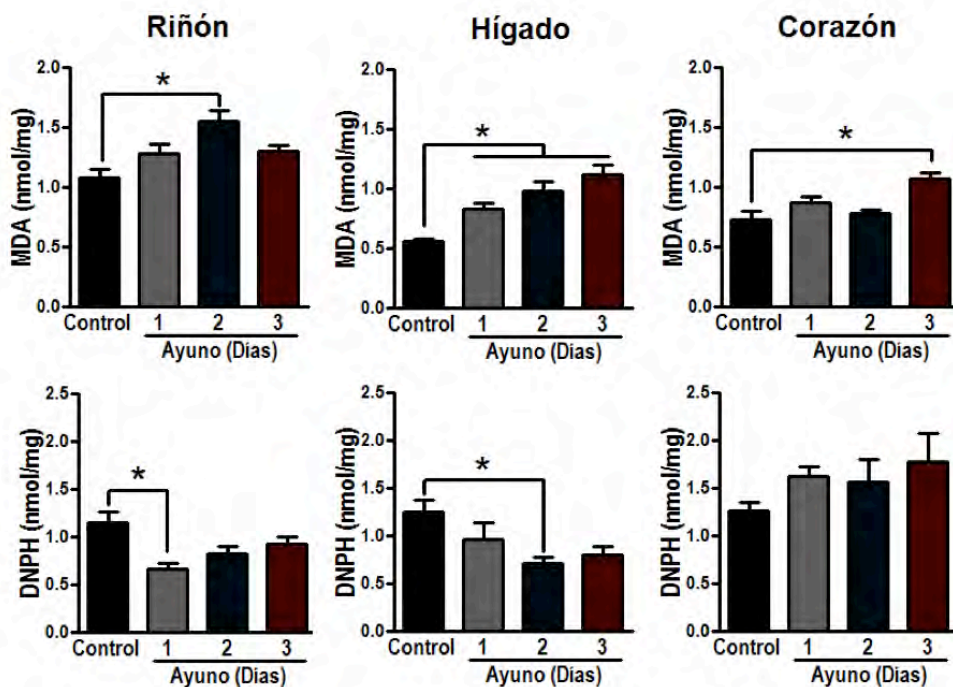


Figura 9. El ayuno promueve la oxidación de lípidos pero reduce la oxidación de proteínas. Se evaluaron los niveles de peroxidación lipídica (MDA) y la carbonilación de proteínas (DNPH) en distintos tejidos de ratas ayunadas por 24-72 h. n=5-6; *p<0.05.

Debido a que niveles elevados de ROS conducen a la oxidación de lípidos y de proteínas, se evaluó el efecto del ayuno sobre la lipoperoxidación (MDA) y la carbonilación de proteínas en los distintos tejidos. Se encontró que el ayuno promovió la oxidación de lípidos en hígado desde el primer día. Mientras que en el hígado los niveles de MDA aumentaron progresivamente desde el primer día de ayuno, en el corazón los niveles de MDA no aumentaron sino hasta el tercer día. En el riñón los niveles de MDA alcanzaron un punto máximo en el segundo día de ayuno para luego disminuir en el tercero (Figura 9). Por otro lado, y en contraposición con la oxidación lipídica, las proteínas oxidadas no aumentaron en ninguno de los tejidos evaluados, y disminuyeron en el riñón y en el hígado en el primer y segundo día, respectivamente (Figura 9).

7.3 Estado redox durante el ayuno

Los tioles proteínicos y no proteínicos (GSH, cisteína, homocisteína) juegan un papel muy importante en fisiología celular mediante la preservación de la

homeostasis redox ante factores ambientales que promueven el estrés oxidante (Dickinson & Forman, 2002). Para tener una visión global del estado redox celular durante el ayuno, se evaluaron los tioles nativos totales en los distintos tejidos de rata. Se encontró que el ayuno no modificó significativamente los tioles totales en riñón pero los redujo en el hígado. Por otro lado, los tioles aumentaron ligeramente en el corazón (Figura 10).

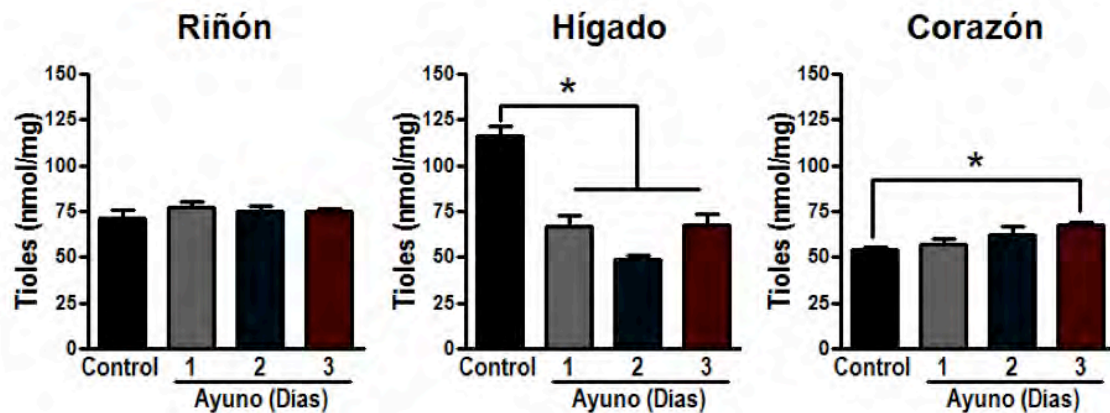


Figura 10. Los tioles se regulan de manera diferente en cada tejido durante el ayuno. Usando el reactivo de Ellman se evaluaron los tioles totales en distintos tejidos de ratas ayunadas por 24-72 h.. n=5-6; *p<0.05.

7.4 Enzimas antioxidantes durante el ayuno

El ayuno induce cambios en la expresión y/o actividad de las enzimas antioxidantes (Verweij et al., 2011; Abdelmeged et al., 2009; Marczuk-Krynicka et al., 2003), muchas de las cuales son reguladas por el factor de transcripción NRF2 (Sykiotis & Bohmann, 2010; Hayes & Dinkova-Kostova, 2014). Como una aproximación para explicar los cambios en el estado redox celular y las ROS en los distintos tejidos durante el ayuno, se evaluó la actividad/expresión de algunas enzimas antioxidantes. Se encontró que el ayuno reguló diferencialmente la expresión de HO-1 en el riñón, el hígado y el corazón: mientras que el ayuno redujo la expresión de HO-1 en el riñón, el ayuno incrementó su expresión en el corazón (Figura 11).

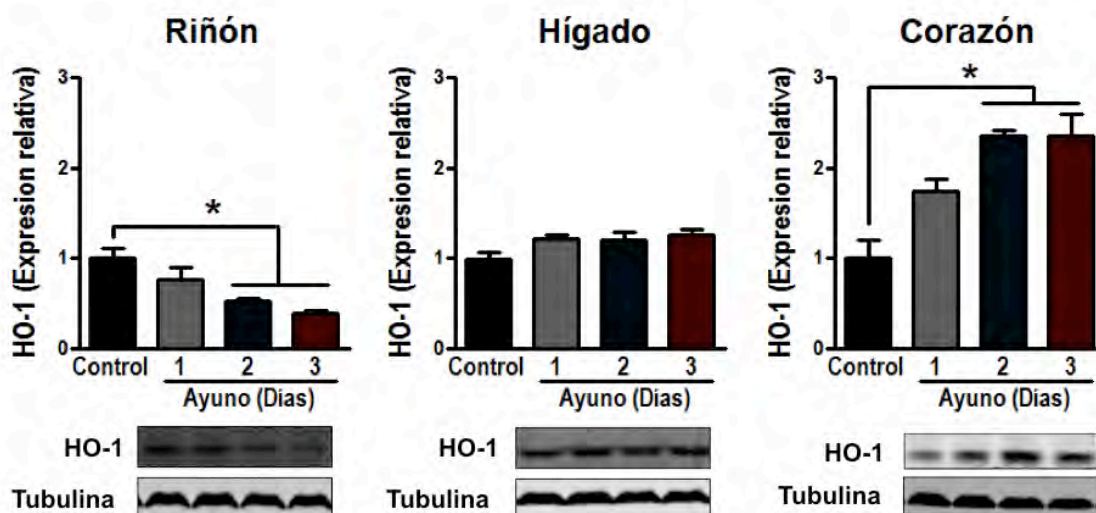


Figura 11. El ayuno reduce la expresión de hemo oxigenasa 1 en el riñón pero la incrementa en el corazón. Niveles de hemo oxigenasa 1 (HO-1) en distintos tejidos de ratas ayunadas por 24-72 h. n=3; *p<0.05.

Se evaluó la actividad de otras enzimas antioxidantes y se encontraron efectos variados del ayuno sobre la actividad de catalasa, GPx y NQO1 (Figura 12). El ayuno redujo la actividad de catalasa en el hígado pero no en el riñón. Por el contrario, el ayuno aumentó la actividad de esta enzima en el corazón. En el hígado se redujo la actividad de GPx en el segundo día de ayuno, mientras que en el riñón la actividad de esta enzima aumentó progresivamente. No se observaron cambios significativos en la actividad de GST en ninguno de los tejidos estudiados, lo que sugiere un papel mínimo de esta enzima en la defensa antioxidante durante el ayuno. Por otro lado, el ayuno incrementó la actividad de NQO1 en el primer día en el riñón mientras que en el corazón esta enzima se indujo en el segundo día. En conjunto, los datos anteriores sugieren que no todas las enzimas antioxidantes son reguladas de la misma forma durante el ayuno y que el efecto del ayuno sobre estas enzimas es tejido-específico. Consistentemente con los elevados niveles de ROS en el hígado durante el ayuno, la defensa antioxidante se reduce en este órgano. Por otro lado, durante el ayuno en el corazón se inducen la catalasa y la HO-1 que lo protegen del estrés oxidante.

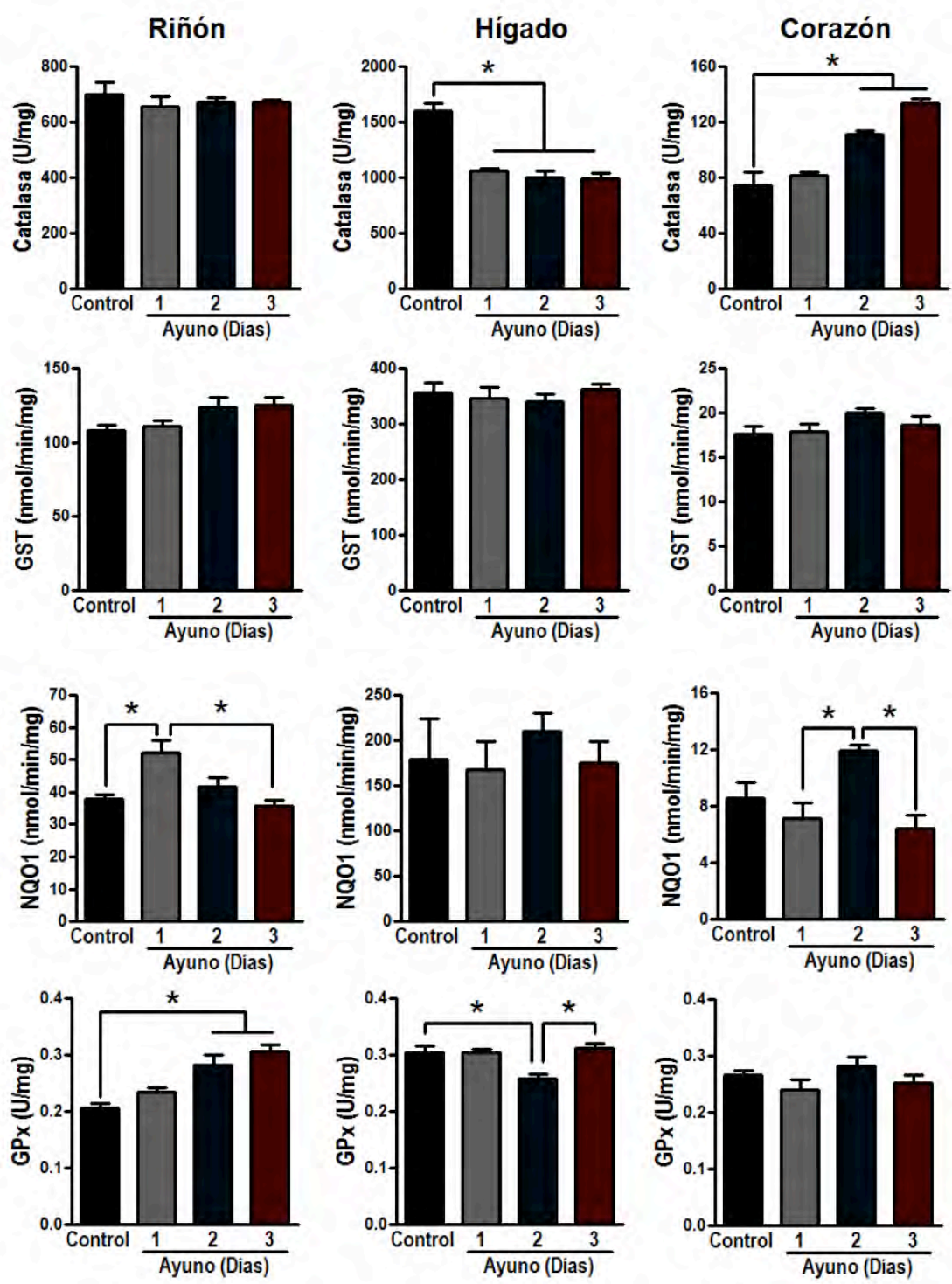


Figura 12. Actividad de enzimas antioxidantes durante el ayuno. Actividad de catalasa, NADPH quinona oxidorreductasa 1 (NQO1), glutatión S transferasa (GST) y glutatión peroxidasa (GPx) en distintos tejidos de ratas ayunadas por 24-72 h. n=5-6; *p<0.05.

8 DISCUSIÓN

La privación de alimento induce cambios en el metabolismo a múltiples niveles (Goldstein & Hagerm, 2015; McCue, 2010; Yamamoto et al., 2015). En nuestro estudio encontramos que el ayuno también tiene efectos en el estado redox celular (Menger et al., 2015; Sorensen et al., 2006; Morales et al. 2004; Zhang et al., 2012). En la rata, y en los primeros tres días, el ayuno modula la homeostasis redox de manera tejido-específico, como previamente se ha hipotetizado (Walsh et al., 2014).

Observamos que el hígado es el órgano más afectado durante el ayuno y el corazón y el riñón parecen ser más resistentes al inducirse algunas enzimas antioxidantes. Estos resultados son consistentes con los reportados anteriormente, en donde se demuestra que durante el ayuno el hígado es más susceptible al estrés oxidante (Sorensen et al., 2006; Marszuk-Krynicka et al., 2003) y que en el riñón aumenta la actividad de GPx (Wohaieb & Godin, 1987) y en el corazón la actividad de la catalasa (Lammi-Keefe et al., 1981; Crescimanno et al., 1989; Rindler et al., 2013; Wohaieb & Godin, 1987). Nuestros datos señalan que la inducción de estas enzimas ocurre durante el ayuno prolongado (de más de 24 horas), sin embargo, no se descarta la posibilidad de que estas enzimas sólo se activen transitoriamente y que disminuyan en los días próximos a la inanición (alrededor de 7 días de ayuno).

La proteína HO-1 participa en la degradación del hemo y la producción del antioxidante bilirrubina y es un gen inducido por el factor NRF2. El ayuno y algunas señales metabólicas como el glucagon y la epinefrina promueven la actividad de HO-1 en el hígado (Bakken et al., 1972), sin embargo, en nuestro estudio no se encontraron grandes cambios en los niveles de la HO-1 en este órgano. Encontramos que los niveles de esta enzima aumentan notablemente en el corazón pero se reducen en el riñón. Debido a que la inducción de la HO-1 está asociada con la protección antioxidante y la preservación de la función mitocondrial en el corazón (Choi, 2001; Bartz et al., 2015; Hull et al., 2016), la

inducción de la HO-1 durante el ayuno podría explicar la capacidad del corazón para resistir al daño oxidante.

Los tioles son moléculas que tienen un grupo sulfidrilo (SH) y son susceptibles a ser oxidados por las ROS. El GSH es el tiol no proteínico más abundante en las células y ciertas enzimas lo usan para neutralizar a las ROS o eliminar sus productos. Por ejemplo, la enzima GPx usa GSH para eliminar el H₂O₂ o lipoperóxidos mientras que la enzima GST usa GSH para eliminar aldehidos reactivos (Sheehan et al., 2001). Estudios recientes han demostrado que los tioles proteínicos funcionan como antioxidantes al neutralizar a las ROS (Go & Jones, 2013). Más aun, los residuos de cisteína en las proteínas son más abundantes (~20 veces) que el GSH y se ha sugerido que estos cumplen un papel todavía más importante que el GSH en la preservación del ambiente redox celular (Hansen et al., 2009; Requejo et al., 2010; Go & Jones, 2013). En este sentido, de acuerdo con la función de protección asociada a los tioles al amortiguar las especies reactivas (Go & Jones, 2013), en el hígado los tioles totales (tioles proteínicos y no proteínicos) se reducen durante el ayuno, mientras que estos aumentan ligeramente en el corazón. Estudios recientes han demostrado que el ayuno reduce notablemente los tioles proteínicos (Menger et al., 2015). En este trabajo proporcionamos evidencia de que, seguramente por las características metabólicas propias de cada tipo celular, el ayuno no afecta por igual a todos los tejidos (Yamamoto et al., 2015). Sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados en la regulación del estado redox y la preservación de los tioles durante el ayuno aún quedan sin resolver.

Se ha sugerido que los cambios metabólicos que ocurren durante la privación de alimento promueven la producción elevada de ROS, particularmente por la mitocondria, afectando el balance redox celular en favor del estrés oxidante (Sorensen et al., 2006). Sin embargo, algunos trabajos indican que el ayuno promueve el estrés oxidante, pero otros sostienen que el ayuno no afecta significativamente la homeostasis redox (Abdelmegeed et al., 2009; Verweij et al., 2011). Lo cierto es que el efecto del ayuno sobre el estrés oxidante es complejo y

puede estar influenciado por muchos factores, por ejemplo: la especie, la cepa, el tejido examinado, el tipo de ROS y las enzimas antioxidantes estudiadas y la duración del ayuno (Walsh et al., 2014; Wohaieb & Godin, 1987).

Las ROS pueden conducir a un daño oxidante (Alfadda & Sallam, 2012). Encontramos que con el ayuno hay un aumento ligero de la lipoperoxidación en los distintos órganos estudiados, sin embargo, los niveles de proteínas oxidadas disminuyeron, al menos en el hígado y en el riñón. Estas discrepancias pueden ser explicadas en parte por la susceptibilidad de las proteínas oxidadas a ser degradadas por el proteasoma o por la autofagia mediada por chaperonas (Pajares et al., 2015). Aunque se desconoce si durante la privación de nutrimentos se activa el proteasoma, durante el ayuno prolongado se induce la autofagia mediada por chaperonas (Kaushik & Cuervo, 2012).

En conjunto, nuestros estudios muestran los cambios redox que ocurren durante el ayuno en distintos tejidos. Si estos cambios están o no regulados por los sistemas de transducción de señales elaborados que responden al estrés nutricional, como la vía de NRF2 (Kulkarny et al., 2014; Hayes & Dinkova-Kostova, 2014), o solamente son mera consecuencia de las alteraciones que ocurren en el metabolismo energético (Sorensen et al., 2006), queda por resolver. Es posible que los cambios observados en los distintos tejidos sean necesarios para la adaptación metabólica al ayuno. Por ejemplo, en algunos modelos *in vitro*, se ha demostrado que las ROS que se producen durante la privación de nutrimentos, principalmente el anión superóxido, se requieren para la activación de la AMPK y la autofagia (Chen et al., 2009; Rodríguez-Bargas et al., 2012; Li et al., 2013).

9 CONCLUSIÓN

Durante el ayuno se activan mecanismos tejido-especificos para contrarrestar a las ROS. En el riñón, un mecanismo de defensa que se induce es la GPx, mientras que en el corazón la HO-1 y la catalasa parecen tener mayor relevancia. En el hígado, la defensa antioxidante se reduce durante el ayuno, lo que se asoció con un mayor grado de lipoperoxidación.

10 PERSPECTIVAS

- En este trabajo se demostró que el ayuno promueve la producción de ROS, sin embargo, el origen de estas moléculas permanece desconocido, por lo que sería importante estudiar si la mitocondria, la NOX, la xantina oxidasa, los citocromos P450 o la NOS contribuyen al estrés oxidante observado durante el ayuno.
- La mitocondria ocupa un papel central en el metabolismo celular en condiciones normales y durante el estrés, por lo que hay que conocer cómo el ayuno afecta la estructura y la función mitocondrial.
- Se ha demostrado que las ROS juegan un papel importante en diversos procesos celulares mediante la activación de algunos sistemas de transducción de señales. Es importante conocer si las ROS que se producen durante el ayuno tienen un efecto en las rutas metabólicas o en los procesos que se prenden o se apagan en respuesta al estrés metabólico que causa la privación de alimento. ¿Se requieren las ROS para la adaptación metabólica al ayuno? Por ejemplo, es importante estudiar si el ayuno regula la autofagia en los distintos tejidos a través de las ROS.
- Debido a que el ayuno modifica la actividad o la expresión de las enzimas antioxidantes dependiendo del tejido, es interesante estudiar los mecanismos moleculares involucrados en esta regulación.

11 REFERENCIAS

Abdelmegeed MA, Moon KH, Hardwick JP, Gonzalez FJ & Song BJ. (2009) Role of peroxisome proliferator-activated receptor- α in fasting-mediated oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 47(6):767-778.

Aebi H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105:121-126.

Alfadda AA & Sallam RM. (2012) Reactive oxygen species in health and disease. *Biomed Biotechnol.* 2012:936486.

Bakken AF, Thaler MM & Schmid R. (1972) Metabolic regulation of heme catabolism and bilirubin production. I. Hormonal control of hepatic heme oxygenase activity. *J Clin Invest.* 51(3):530-6.

Bartz RR, Suliman HB & Piantadosi CA. (2015) Redox mechanisms of cardiomyocyte mitochondrial protection. *Front Physiol.* 6:291.

Bennett FI, Alexander JE, Roobol A & Alleyne GA. (1975) Effect of starvation on renal metabolism in the rat. *Kidney Int.* 7(6):380-384.

Berg K, Ericsson M, Lindgren M & Gustafsson H. (2014) A high precision method for quantitative measurements of reactive oxygen species in frozen biopsies. *PLoS One.* 9(3):e90964.

Brown BL, Allis JW, Simmons JE & House DE. (1995) Fasting for less than 24 h induces cytochrome P450 2E1 and 2B1/2 activities in rats. *Toxicol Lett.* 81(1): 39-44.

Buelna-Chontal M, Guevara-Chávez JG, Silva-Palacios A, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J & Zazueta C. (2014) Nrf2-regulated antioxidant response is activated by protein kinase C in postconditioned rat hearts. *Free Radic Biol Med.* 74:145-156.

Cahill Jr. GF. (2006) Fuel metabolism in starvation. *Annu Rev Nutr.* 26:1-22.

Chen Y, Azad MB & Gibson SB. (2009) Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell Death Differ.* 16(7):1040-1052.

Choi AMK. (2001) Heme oxygenase-1 protects the heart. *Circ Res.* 89:105-107.

Cotter DG, Scholar RC & Crawford PA. (2013) Ketone body metabolism and cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 304(8):H1060-H1076.

Crescimanno M, Armata MG, Rausa L, Gueli MC, Nicotra C & D'Alessandro N. (1989) Cardiac peroxisomal enzymes and starvation. *Free Radic Res Commun.* 7(2):67-72.

Cui T, Lai Y, Janicki JS & Wang X. (2016) Nuclear factor erythroid-2 related factor 2 (Nrf2)-mediated protein quality control in cardiomyocytes. *Front Biosci.* 21:192-202.

Dickinson DA & Forman HJ. (2002) Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol.* 64(5-6):1019-1026.

Domenicali M, Caraceni P, Vendemiale G, Grattagliano I, Nardo B, Dall'Agata M, Santoni B, Trevisani F, Cavallari A, Altomare E & Bernardi M. (2001) Food deprivation exacerbates mitochondrial oxidative stress in rat liver exposed to ischemia-reperfusion injury. *J Nutr.* 131:105-110.

Ellman GL. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 82(1):70-77.

Felig P, Pozefsky T, Marliss E, Cahill GF Jr. (1970) Alanine: key role in gluconeogenesis. *Science.* 167(3920):1003-1004.

Finkel T. (2011) Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol.* 194(1):7-15.

Frezza C & Gottlieb E. (2009) Mitochondria in cancer: not just innocent bystanders. *Semin Cancer Biol.* 19(1):4-11.

Gems D & Partridge L. (2008) Stress-response hormesis and aging: "that which does not kill us makes us stronger". *Cell Metab.* 7(3):200-203.

Gillum MP, Erion DM & Shulman GI. (2011) Sirtuin-1 regulation of mammalian metabolism. *Trends Mol Med.* 17(1):8-13.

Glick D, Zhang W, Beaton M, Marsboom G, Gruber M, Simon MC, Hart J, Dorn GW 2nd, Brady MJ & Macleod KF. (2012) BNip3 regulates mitochondrial function and lipid metabolism in the liver. *Mol Cell Biol.* 32(13):2570-2584.

Go YM & Jones DP. (2013) Thiol/disulfide redox states in signaling and sensing. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 48:173-181.

Goldstein I & Hager GL. (2015) Transcriptional and chromatin regulation during fasting - the genomic era. *Trends Endocrinol Metab.* 26(12):699-710.

Haller W & Bines JE. (2013) Starvation and fasting. Biochemical aspects. *En Encyclopedica of human nutrition. Elsevier.* 209-218.

Hansen RE, Roth D & Winther JR. (2009) Quantifying the global cellular thiol-disulfide status. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106(2):422-427.

Hayes JD & Dinkova-Kostova AT. (2014) The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends Biochem Sci.* 39(4):199-218.

Hine CM & Mitchell JR. (2012) NRF2 and the phase II response in acute stress resistance induced by dietary restriction. *J Clin Exp Pathol.* S4:004. doi: 10.4172/2161-0681.S4-004.

- Holmström KM & Finkel T. (2014) Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15(6):411-421.
- Hong JY, Pan JM, Gonzalez FJ, Gelboin HV & Yang CS. (1987) The induction of a specific form of cytochrome P-450 (P-450j) by fasting. *Biochem Biophys Res Commun.* 142(3):1077-1083.
- Hull TD, Boddu R, Guo L, Tisher CC, Traylor AM, Patel B, Joseph R, Prabhu SD, Suliman HB, Piantadosi CA, Agarwal A & George JF. (2016) Heme oxygenase-1 regulates mitochondrial quality control in the heart. *JCI Insight.* 1(2):e85817.
- Jenniskens FA, Jopperi-Davis KS, Walters LC, Schorr EN, Rogers LK, Welty SE & Smith CV. (2002) Effects of fasting on tissue contents of coenzyme A and related intermediates in rats. *Pediatr Res.* 52(3):437-442.
- Jensen TL, Kiersgaard MK, Sørensen DB & Mikkelsen LF. (2013) Fasting of mice: a review. *Lab Anim.* 47(4):225-240.
- Jiang G & Zhang BB. (2003) Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 284(4):E671-8.
- Jitrapakdee S. (2012) Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 44(1):33-45.
- Jongbloed F, de Bruin RWF, Pennings JLA, Payán-Gómez C, van den Engel S, van Oostrom CT, de Bruin A, Hoeijmakers JHJ, van Steeg H, IJzermans JNM, Dollé MET. (2014) Preoperative fasting protects against renal ischemia-reperfusion injury in aged and overweight mice. *PLoS One.* 9(6):e100853
- Kaspar JW, Niture Sk & Jaiswal AK. (2009) Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 47(9):1304-1309.
- Kaushik S & Cuervo AM. (2012) Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol.* 22(8):407-417.
- Kersten S. (2014) Integrated physiology and systems biology of PPAR α . *Mol Metab.* 3(4):354-371.
- Keum YS & Choi BY. (2014) Molecular and chemical regulation of the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Molecules.* 19(7):10074-10089.
- Kulkarni SR, Donepudi AC, Xu J, Wei W, Cheng QC, Driscoll MV, Johnson DA, Johnson JA, Li X & Slitt AL. (2014) Fasting induces Nuclear Factor E2-Related Factor 2 and ATP-Binding Cassette transporters via protein kinase A and Sirtuin-1 in mouse and human. *Antioxid Redox Signal.* 20(1):15-30.
- Lammi-Keefe CJ, Hegarty PV & Swan PB. (1981) Effect of starvation and refeeding on catalase and superoxide dismutase activities in skeletal and cardiac muscles from 12-month-old rats. *Experientia.* 37(1):25-27.

Lee C, Safdie FM, Raffaghello L, Wei M, Madia F, Parrella E, Hwang D, Cohen P, Bianchi G & Longo VD. (2010) Reduced levels of IGF-I mediate differential protection of normal and cancer cells in response to fasting and improve chemotherapeutic index. *Cancer Res.* 70(4):1564-1572.

Lempradl A, Pospisilik JA, Penninger JM. (2015) Exploring the emerging complexity in transcriptional regulation of energy homeostasis. *Nat Rev Genet.* 16(11):665-681.

Levine RL, Williams JA, Stadtman ER & Shacter E. (1994) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 233:346-357.

Li X. (2013) SIRT1 and energy metabolism. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 45(1):51-60.

Li L, Chen Y & Gibson SB. (2013) Starvation-induced autophagy is regulated by mitochondrial reactive oxygen species leading to AMPK activation. *Cell Signal.* 25(1):50-65

Li Y, Wong K, Giles A, Jiang J, Lee JW, Adams AC, Kharitonov A, Yang Q, Gao B, Guarente L & Zang M. (2014) Hepatic SIRT1 attenuates hepatic steatosis and controls energy balance in mice by inducing fibroblast growth factor 21. *Gastroenterology.* 146(2):539-549.

Lin HV & Accili D. (2011) Hormonal regulation of hepatic glucose production in health and disease. *Cell Metab.* 14(1):9-19.

Liu Y & He R. (2010) Fasting induces a high level of 3-nitrotyrosine in the brain of rats. *Neurosci Lett.* 472(3):204-209.

Longo VD & Mattson MP. (2014) Fasting: molecular mechanisms and clinical applications. *Cell Metab.* 19(2):181-192.

Madrigal-Matute J & Cuervo AM. (2016) Regulation of Liver Metabolism by Autophagy. *Gastroenterology.* 150(2):328-339.

Marczuk-Krynicka D, Hryniewiecki T, Piatek J & Paluszak J. (2003) The effect of brief food withdrawal on the level of free radicals and other parameters of oxidative status in the live. *Med Sci Monit.* 9:131-135.

Martín-Montalvo A, Villalba JM, Navas P & de Cabo R. (2011) NRF2, cancer and calorie restriction. *Oncogene.* 30(5):505-520.

Masoro EJ. (2005) Overview of caloric restriction and ageing. *Mech Ageing Dev.* 126:913-922.

McCue MD. (2010) Starvation physiology: reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 156(1):1-18.

Menger KE, James AM, Cochemé HM, Harbour ME, Chouchani ET, Ding S, Fearnley IM, Partridge L & Murphy MP. (2015) Fasting, but not aging, dramatically alters the redox status of cysteine residues on proteins in *Drosophila melanogaster*. *Cell Rep.* 11(12):1856-1865.

Mitchell JR, Verweij MI, Brand K, van de Ven M, Goemaere N, van den Engel S, Chu T, Forrer F, Müller C, de Jong M, van IJcken W, IJzermans JNM, Hoeijmakers JHJ & de Bruin RWF. (2010) Short-term dietary restriction and fasting precondition against ischemia reperfusion injury in mice. *Ageing Cell.* 9(1):40-53.

Morales AE, Pérez-Jiménez A, Hidalgo MC, Abellán E & Cardenete G. (2004) Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 139(1-3):153-161.

Morgan MJ & Liu Z. (2011) Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res.* 21(1):103-115.

Nakatani T, Sakamoto Y, Ando H & Kobayashi K. (1996) Enhanced ketogenesis in the kidney during hepatic inflow occlusion with the administration of Ringer's acetate solution. *Surgery.* 119:684-689.

Niture SK, Khatri R & Jaiswal AK. (2014) Regulation of Nrf2- an update. *Free Radic Biol Med.* 66:36-44.

Nunnari J & Suomalainen A. (2012) Mitochondria: in sickness and in health. *Cell.* 148(6):1145-1159.

Oh KJ, Han HS, Kim MJ & Koo SH. (2013) CREB and FoxO1: two transcription factor for the regulation of hepatic gluconeogenesis. *BMB Rep.* 46(12):567-574.

Orozco-Ibarra M, Medina-Campos ON, Sánchez-González DJ, Martínez-Martínez CM, Floriano-Sánchez E, Santamaría A, Ramirez V, Bobadilla NA & Pedraza-Chaverri J. (2007) Evaluation of oxidative stress in D-serine induced nephrotoxicity. *Toxicology.* 229(1-2):123-35.

Owen OE. (2005) Ketone bodies as a fuel for the brain during starvation. *Biochem Mol Biol Edu.* 33(4):246-251.

Owen OE, Felig P, Morgan AP, Wahren J & Cahill GF Jr. (1969) Liver and kidney metabolism during prolonged starvation. *J Clin Invest.* 48(3):574-583.

Pajares M, Jiménez-Moreno N, Dias IH, Debelec B, Vucetic M, Fladmark KE, Basaga H, Ribaric S, Milisav I & Cuadrado A. (2015) Redox control of protein degradation. *Redox Biol.* 6:409-20.

Prochaska H & Santamaria AB. (1988) Direct measurement of NAD(P)H:quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: a screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. *Anal Biochem.* 169:328-336.

Rabinowitz JD & White E. (2010) Autophagy and metabolism. *Science*. 330(6009): 1344-1348.

Raffaghello L, Lee C, Safdie FM, Wei M, Madia F, Bianchi G & Longo VD. (2008) Starvation-dependent differential stress resistance protects normal but not cancer cells against high-dose chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105:8215-8220.

Requejo R, Hurd TR, Costa NJ & Murphy MP. (2010) Cysteine residues exposed on protein surfaces are the dominant intramitochondrial thiol and may protect against oxidative damage. *FEBS J*. 277(6):1465-1480.

Rindler PM, Plafker SM, Szweda LI & Kinter M. (2013) High dietary fat selectively increases catalase expression within cardiac mitochondria. *J Biol Chem*. 288(3): 1979-1990.

Ristow M & Schmeisser K. (2014) Mitohormesis: promoting health and lifespan by increased levels of reactive oxygen species (ROS). *Dose Response*. 12(2): 288-341.

Robinson MK, Rustum RR, Chambers EA, Rounds JD, Wilmore DW & Jacobs DO. (1997) Starvation enhances hepatic free radical release following endotoxemia. *J Surg Res*. 69(2):325-30.

Rodríguez-Vargas JM, Ruiz-Magaña MJ, Ruiz-Ruiz C, Majuelos-Melguizo J, Peralta-Leal A, Rodríguez MI, Muñoz-Gámez JA, de Almodóvar MR, Siles E, Rivas AL, Jäättelä M & Oliver FJ. (2012) ROS-induced DNA damage and PARP-1 are required for optimal induction of starvation-induced autophagy. *Cell Res*. 22(7): 1181-1198.

Rui L. (2014) Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol*. 4(1):177-197.

Safdie FM, Brandhorst S, Wei M, Wang W, Lee C, Hwang S, Conti PS, Chen TC & Longo VD. (2012) Fasting enhances the response of glioma to chemo- and radiotherapy. *PLoS One*. 7(9):e44603.

Safdie FM, Dorff T, Quinn D, Fontana L, Wei M, Lee C, Cohen P & Longo VD. (2009) Fasting and cancer treatment in humans: a case series report. *Ageing*. 1(12):988-1007.

Savage DB. (2005) PPAR gamma as a metabolic regulator: insights from genomics and pharmacology. *Expert Rev Mol Med*. 7(1):1-16.

Scherz-Shouval R & Elazar Z. (2011) Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends Biochem Sci*. 36(1):30-38.

Schieber M & Chandel NS. (2010) ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*. 24(10):R453-R462.

Sciarretta S, Zhai P, Shao D, Zablocki D, Nagarajan N, Terada LS, Volpe M & Sadoshima J. (2013) Activation of NADPH oxidase 4 in the endoplasmic reticulum

promotes cardiomyocyte autophagy and survival during energy stress through the protein kinase RNA-activated-like endoplasmic reticulum kinase/eukaryotic initiation factor 2 α /activating transcription factor 4 pathway. *Circ Res.* 113(11): 1253-1264.

Sedeek M, Nasrallah R, Touyz RM & Hébert RL. (2013) NADPH oxidases, reactive oxygen species, and the kidney: friend and foe. *J Am Soc Nephrol.* 24(10): 1512-1518.

Sena LA & Chandel NS. (2012) Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell.* 48(2):158-167.

Sheehan D, Meade G, Foley VM & Dowd CA. (2001) Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J.* 360(Pt 1): 1-16.

Sihvola V & Levonen AL. (2016) Keap1 as the redox sensor of the antioxidant response. *Arch Biochem Biophys.* S0003-9861(16)30421-0.

Singh R & Cuervo AM. (2011) Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell Metab.* 13(5):495-504

Snorek M, Hodyc D, Sedivý V, Durišová J, Skoumalová A, Wilhelm J, Neckář J, Kolář F & Herget J. (2012) Short-term fasting reduces the extent of myocardial infarction and incidence of reperfusion arrhythmias in rats. *Physiol Res.* 61(6): 567-574.

Sorensen M, Sanz A, Gómez J, Pamplona R, Portero-Otín M, Gredilla R & Barja G. (2006) Effects of fasting on oxidative stress in rat liver mitochondria. *Free Radic Res.* 40(4):339-347.

Stanley S, Wynne K, McGowan B & Bloom S. (2005) Hormonal regulation of food intake. *Physiol Rev.* 85(4): 1131-1158.

Sykiotis GP & Bohmann D. (2010) Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease. *Sci Signal.* 3(112):re3 doi:10.1126/scisignal.3112re3.

Szendroedi J, Phielix E & Roden M. (2011) The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 8(2):92-103.

Taegtmeyer H. (1994) Energy metabolism of the heart: from basic concepts to clinical applications. *Curr Probl Cardiol.* 19(2):59-113.

Takagi A, Kume S, Kondo M, Nakazawa J, Chin-Kanasaki M, Araki H, Araki S, Koya D, Haneda M, Chano T, Matsusaka T, Nagao K, Adachi Y, Chan L, Maegawa H & Uzu T. (2016) Mammalian autophagy is essential for hepatic and renal ketogenesis during starvation. *Sci Rep.* 6:18944.

Tasset I & Cuervo AM. (2016) Role of chaperone-mediated autophagy in metabolism. *FEBS J.* 283(13):2403-2413.

Tinkum KL, Stemler KM, White LS, Loza AJ, Jeter-Jones S, Michalski BM, Kuzmicki C, Pless R, Stappenbeck TS, Piwnica-Worms D & Piwnica-Worms H. (2015) Fasting protects mice from lethal DNA damage by promoting small intestinal epithelial stem cell survival. *Proc Natl Acad Sci USA.* 112(51):E7148-154.

Trepanowski JF & Bloomer RJ. (2010) The impact of religious fasting on human health. *Nutr J.* 9:57. doi: 10.1186/1475-2891-9-57.

Uy B, McGlashan SR & Shaikh SB. (2011) Measurement of reactive oxygen species in the culture media using Acridan Lumigen PS-3 assay. *J Biomol Tech.* 22(3):95-107.

Varendi K, Airavaara M, Anttila J, Vose S, Planken A, Saarma M, Mitchell JR, & Andressoo JO. (2014) Short-term preoperative dietary restriction is neuroprotective in a rat focal stroke model. *PLoS One.* 9(4):e93911.

Verweij M, van Ginhoven TM, Mitchell JR, Sluiter W, van den Engel S, Roest HP, Torabi E, IJzermans JNM, Hoeijmakers JHJ & de Bruin RWF. (2011) Preoperative fasting protects mice against hepatic ischemia/reperfusion injury: mechanisms and effects on liver regeneration. *Liver Transpl.* 17(6):695-704.

Wallace DC. (2005) A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative disease, aging and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet.* 39:359-407.

Walsh ME, Shi Y & Van Remmen H. (2014) The effects of dietary restriction on oxidative stress in rodents. *Free Radic Biol Med.* 66:88-99.

Wang T, Hung CC & Randall DJ. (2006) The comparative physiology of food deprivation: from feast to famine. *Annu Rev Physiol.* 68:223-251.

Wang H & Joseph JA. (1999) Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med.* 355:156-161.

Wohaieb SA & Godin DV. (1987) Starvation-related alterations in free radical tissue defense mechanisms in rats. *Diabetes.* 36(2):169-173.

Xu J, Kulkarni SR, Li L & Slitt AL. (2012) UDP-glucuronosyltransferase expression in mouse liver is increased in obesity- and fasting-induced steatosis. *Drug Metab Dispos.* 40(2):259-266.

Yamamoto J, Kamata S, Miura A, Nagata T, Kainuma R & Ishii I. (2015) Differential adaptive responses to 1- or 2-day fasting in various mouse tissues revealed by quantitative PCR analysis. *FEBS Open Bio.* 5:357-368.

Yan MH, Wang X & Zhu X. (2013) Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radic Biol Med.* 62:90-101.

Zhang YKJ, Wu KC & Klaassen CD. (2013) Genetic activation of Nrf2 protects against fasting-induced oxidative stress in livers of mice. *PloS One.* 8(3):e59122.

Zhang D, Yang H, Kong X, Wang K, Mao X, Yan X, Wang Y, Liu S, Zhang X, Li J, Chen L, Wu J, Wei M, Yang J & Guan Y. (2011) Proteomics analysis reveals diabetic kidney as a ketogenic organ in type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 300(2):E287-E295.