



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

EFFECTO DE LA SINCRONIZACIÓN CIRCADIANA ASOCIADA A LA  
RESTRICCIÓN DE ALIMENTO SOBRE 3 VARIANTES DE LA PROTEÍNA  
 $\beta$ -CATENINA EN EL HÍGADO DE RATA

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:  
DALIA LUZ DE ITA PÉREZ

DIRECTOR DE TESIS  
DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

COMITÉ TUTOR  
DRA. CARMEN ACEVES VELASCO  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA  
DR. MANUEL MIRANDA ANAYA  
FACULTAD DE CIENCIAS

QUERÉTARO, QRO. JUNIO DE 2018.



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.

## **JURADO**

Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Neurobiología

**Firma**

Presidente.

Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez

---

Secretario (tutor).

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

---

Vocal.

Dr. Antonio Velázquez Arellano

---

Vocal

Dra. Ivette Caldelas Sánchez

---

Vocal

Dr. Rafael Villalobos Molina

---

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM y al Doctorado en Ciencias Biomédicas. Número de cuenta: 509003209

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Número de beca: 339099

Al personal de la Biblioteca del campus UNAM Juriquilla, encabezado por su coordinador el Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela.

A las unidades de Videoconferencia del Instituto de Neurobiología y del Instituto de Fisiología Celular, dirigidas por la Psic. María de Lourdes Lara Ayala y por la C. Ana María Escalante Gonzalbo, respectivamente.

Al personal de la Unidad de Enseñanza, a cargo de la M.C. Leonor Casanova Rico.

Al personal de la Unidad de Microscopía del INB, especialmente a la Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos y Lourdes Palma Tirado.

Al Biol. Fernando López Barrera por su asistencia técnica.

Al Dr. Mauricio Díaz Muñoz, a la Dra. Olivia Vásquez Martínez, a la Dra. Isabel Méndez, al Dr. Francisco Vázquez y a todos mis compañeros del laboratorio B-11 con los que he coincidido a lo largo del Posgrado.



## ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS	16
ÍNDICE DE TABLAS	16
ABSTRACT	17
1. INTRODUCCIÓN	18
<b>1.1 División anatómica del hígado</b>	18
<b>1.2 Sistema vascular hepático</b>	18
1.2.1 La arteria hepática	19
1.2.2 La vena porta	19
1.2.3 La vena hepática	20
1.2.4 Sistema biliar	20
1.2.5 Vasos linfáticos	20
2. TIPOS CELULARES DEL HÍGADO	20
<b>2.1 Hepatocitos</b>	21
3. FUNCIONES DEL HÍGADO	22
4. EL ACINO O LOBULILLO HEPÁTICO	22
5. ZONACIÓN METABÓLICA O HETEROGENEIDAD FUNCIONAL	23
<b>5.1 Zonación metabólica dinámica</b>	24
<b>5.2 Zonación metabólica estática</b>	26
6. LAS VÍAS WNT	28
7. LA PROTEÍNA $\beta$ -CATENINA	30
7.1 La estructura de la $\beta$ -catenina	30
7.2 El complejo de destrucción de la $\beta$ -catenina	32
7.3 Transducción de señales de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina	33
7.4 Genes blanco de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina	35
8. RITMOS BIOLÓGICOS	37
<b>8.1 Propiedades de los ritmos biológicos circadianos</b>	41
<b>8.2 El núcleo supraquiasmático (NSQ)</b>	42
<b>8.3 Mecanismo molecular de los relojes biológicos</b>	43
<b>8.4 Oscilador Sincronizado por el Alimento (OSA)</b>	45
<b>8.5 Actividad Anticipatoria al Alimento (AAA)</b>	46

<b>8.6 Significado adaptativo de los ritmos biológicos</b> .....	50
9. ANTECEDENTES .....	51
<b>9.1 La vía Wnt/<math>\beta</math>-catenina en el hígado</b> .....	51
<b>9.2 La <math>\beta</math>-catenina en la remoción del amonio hepático y en la zonación metabólica</b> .....	52
<b>9.3 La <math>\beta</math>-catenina y la gluconeogénesis hepática</b> .....	53
<b>9.4 Relación de la <math>\beta</math>-catenina y las proteínas reloj</b> .....	55
10. JUSTIFICACIÓN .....	57
11. HIPÓTESIS .....	58
12. OBJETIVO GENERAL .....	58
<b>12.1 Objetivos específicos</b> .....	58
13. MATERIALES Y MÉTODOS .....	59
<b>13.2 Grupos experimentales</b> .....	59
<b>13.3 Fraccionamiento subcelular</b> .....	60
<b>13.4 Western Blot</b> .....	61
<b>13.5 Inmunofluorescencia</b> .....	62
<b>13.6 Análisis de datos</b> .....	63
14. RESULTADOS .....	64
<b>14.1 El horario diario de restricción de alimento (HRA) disminuyó el nivel medio de expresión de la pSer 33 <math>\beta</math>-catenina</b> .....	64
<b>14.2 El horario diario de restricción de alimento (HRA) incrementó la presencia nuclear de la pSer675 <math>\beta</math>-catenina</b> .....	66
<b>14.3 El horario diario de restricción de alimento (HRA) aumentó la presencia de la <math>\beta</math>-catenina total</b> .....	70
<b>14.4 El horario diario de restricción de alimento (HRA) incrementó la localización de la <math>\beta</math>-catenina total en la membrana plasmática del hepatocito</b> .....	73
<b>14.5 La transición luz-oscuridad enriqueció la presencia de la pSer33 <math>\beta</math>-catenina en la membrana plasmática del hepatocito.</b> .....	76
<b>14.5.1 El ciclo de ayuno agudo (Fa)-realimentación (Rf) propició la localización de la pSer33 <math>\beta</math>-catenina en la membrana plasmática del hepatocito</b> .....	77
<b>14.6 El horario diario de restricción de alimento (HRA) disminuyó la localización de la pSer675 <math>\beta</math>-catenina en la membrana plasmática del hepatocito.</b> .....	78
<b>14.7 Zonación metabólica de las variantes de la <math>\beta</math>-catenina</b> .....	82
15. DISCUSIÓN .....	88
<b>15.1 Biología celular y señalización de la <math>\beta</math>-catenina</b> .....	88
<b>15.2 La proteína <math>\beta</math>-catenina y la expresión del OSA</b> .....	94

15.3 Implicaciones de la $\beta$ -catenina en las patologías hepáticas	97
16. CONCLUSIONES	98
17. PERSPECTIVAS	98
18. REFERENCIAS	99
19. ANEXOS	117
ANEXO A. CÉLULAS HEPÁTICAS NO PARENQUIMALES	117
1. Sinusoides	117
1.1 Células endoteliales de los sinusoides hepáticos o células endoteliales sinusoidales (SEC)	117
2. Células de Kupffer	118
3. Células estelares hepáticas (HS)	118
4. Linfocitos granulares o células de pit	119
5. Células biliares o colangiocitos	120
6. Células progenitoras hepáticas o células ovales	120
ANEXO B. COMPONENTES DE LA VÍA WNT/ $\beta$ -CATENINA	122
1. Los ligandos Wnt	122
2. Los receptores Frizzled (Fz)	122
3. Los correceptores de proteínas parecidas al receptor de las lipoproteínas de baja densidad 5 y 6 (LRP5/6)	125
4. Componentes del complejo de destrucción de la $\beta$ -catenina	127
4.1 Adenomatous Polyposis Coli (APC)	127
4.2 Axina	127
4.3 Caseína cinasa (CK)	128
4.4 Glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3)	128
5. Proteínas fosfatasas 1 (PP1) y 2A (PP2A)	129
6. Dishevelled (DVL)	130
7. Familia de proteínas Groucho (Gro)	131
8. Familia factor de células T (TCF) y factor potenciador linfoide (LEF)	133
ANEXO C. GENES BLANCO DE LA VÍA WNT/ $\beta$ -CATENINA	135
ANEXO D. RITMOS BIOLÓGICOS	142
1. Localización y estructura del núcleo supraquiasmático (NSQ)	142
2. Diferencias entre el NSQ y los osciladores periféricos	143
3. Mutaciones en los genes reloj de mamíferos	144
20. PUBLICACIONES	146

## ABREVIATURAS

pSer33 $\beta$ -catenina	$\beta$ -catenina fosforilada en el residuo de serina 33
pSer675 $\beta$ -catenina	$\beta$ -catenina fosforilada en el residuo de serina 675
DRF	Daytime Restricted Feeding
FEO	Food Entrained Oscillator
SEC	células endoteliales de los sinusoides hepáticos
HS	células estelares hepáticas
NK	células asesinas naturales
IL-2	interleucina 2
HSC	células madre hepáticas
HPC	células progenitoras hepáticas
CK 19	citoqueratina 19
AFP	$\alpha$ -fetoproteína
ZPP	zona periportal hepática
HPP	hepatocitos periportales
ZI	zona intermedia hepática
ZPC	zona pericentral hepática
HPC	hepatocitos pericentrales
GS	glutamina sintetasa
Gpr49	receptor 49 acoplado a proteínas G
Cyp 1A	citocromo P450 1A
PV	vena portal

HA	arteria hepática
BD	conducto biliar
CPS1	carbamoil fosfato sintetasa 1
CV	vena central hepática
ATP	trifosfato de adenosina
CCl <sub>4</sub>	tetracloruro de carbono
HCC	hepatocarcinoma
Int-1	Integración-1
MMVT1	virus del tumor mamario de ratón
Fz	Frizzled
PCP	polaridad celular planar
kDa	kilodaltones
PLP C	fosfolipasa C
PDE	fosfodiesterasa
PKC	proteína cinasa C
JNK	cinasa N-terminal c-Jun
GPCR	receptores acoplados a proteínas G
CRD	dominio rico en cisteína
K <sub>d</sub>	constante de disociación
WIF	factor inhibidor de Wnt
sFRPs	proteínas parecidas a Frizzled

LRP 5/6	correceptores de proteínas parecidas a las lipoproteínas de baja densidad 5 y 6
Ror	receptor huérfano similar al receptor tirosina quinasa
LDLR	familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad
EGF	factor de crecimiento epidermal
CK1	caseína cinasa 1
GSK3 $\beta$	glucógeno sintasa cinasa 3 $\beta$
Dvl	Dishevelled
TCF	factor de células T
LEF	factor potenciador linfoide
APC	Adenomatous poliposis coli
PP2A	proteína fosfatasa 2A
SAMP	secuencia serina-alanina-metionina-prolina
SCF	Skp1/cullin/F-box
CK2	caseína cinasa 2
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
AMPc	monofosfato de adenosina cíclico
PP1	proteína fosfatasa 1
DIX	Dishevelled y Axina
PDZ	densidad 95 postsináptica, disco largo y zona occludens-1
DEP	Dishevelled, Eg 1-10, pleckstrina
DSV	dominio Dishevelled

SH3	homología src3
Gro	Groucho
ADN	ácido desoxirribonucleico
TLE	potenciador de separación parecido a transducina
NTTA	activadores transcripcionales N-terminal
CTTA	activadores transcripcionales C-terminal
WRE	elemento de respuesta a Wnt
LZL	motivos parecidos a cremalleras de leucina
GP	glicina y prolina
HDACs	histonas deacetilasas
HMGB1	proteína 1 del grupo de alta movilidad de la cromatina
cdc2	homólogo 2 de la proteína de control de la división celular
SP	serina y prolina
HIPK2	homeodominio de interacción cinasa 2
MAPK	proteína cinasa activada por mitógeno
HMG	cajas de grupos de alta movilidad
CBP	proteína de unión a CREB
Bclp	linfoma 9 de células B
PPAR	receptor de proliferación activado por peroxisomas
FRA-1	antígeno 1 relacionado con Fos
uPAR	receptor de uroquinasa

MMP	metaloproteasas de matriz
Nr-CAM	moléculas de adhesión celular neuronal
ITF-2	factor de transcripción de inmunoglobulina 2
EphB/efrina B	receptor de efrina B
BMP4	proteína morfogénica de hueso 4
VEGF	factor de crecimiento endotelial vascular
FGF	factor de crecimiento de fibroblastos
Id2	inhibidor de la proteína de unión al ADN 2
Msl1	homólogo fetal específico de machos 1
Tiam	proteína de invasión metástasis de linfomas de células T
LHB	proteína de desarrollo de extremidades y de corazón
LGR5/GPR49	receptor acoplado a proteínas G con repeticiones ricas en leucina
Runx2	factor de transcripción parecido a enano
SALL4	proteína parecida a Spalt4
RANK	ligando del receptor activado del factor nuclear $\kappa\beta$
CCN1/Cyr61	miembro 1 de la familia del inductor angiogénico rico en cisteína
FoxN1	proteína N1 con caja punta de flecha
oct4	factor de transcripción de unión a octámeros 4
Xnr3	proteína de <i>Xenopus</i> parecida a nodal 3
MITF/nacre	factor de transcripción asociado a microftalmia



Stra6	proteína estimulada por el gen de ácido retinoico 6
Wrch-1	homólogo de Cdc 42 responsivo a Wnt
WISP	proteína secretada inducida por Wnt1
Ddx	factor de transcripción caudal 1 tipo caja homo
Pitx2	factor de transcripción 2 parecido a homeodominio
Eda	ectodisplasina
Irx3	proteína con el homeodominio clase Iraqués
Neuro D1	proteína de diferenciación neurogénica 1
Gbx2	proteína homeobox 2 específica de gastrulación y cerebro
Ccna 1g	ciclina A1
IGF	factor de crecimiento insulínico
Emp	proteína eritroblástica de macrófagos
MDR1	proteína de resistencia a multidroga 1
IL-6	interleucina 6
HSP6	proteoglicanos de heparan sulfato
$\beta$ -TrCP	proteínas con repetición $\beta$ -transducina
ms	milisegundos
EEG	electroencefalograma
NADH	dinucleótido nicotinamida y adenina
MOR	movimientos oculares rápidos
s	segundos

h	horas
NSQ	núcleo supraquiasmático
VIP	polipéptido intestinal vasoactivo
NT	neurotensina
GRP	péptido liberador de gastrina
AVP	arginina vasopresina
GABA	ácido gamma aminobutírico
TRH	tracto retino hipotalámico
PACAP	polipéptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria
IGL	hojuela intergeniculada lateral
TGH	tracto geniculohipotalámico
oc	quiasma óptico
3v	tercer ventrículo
CLOCK	Circadian Locomotor Output Cycles Kaput
BMAL1	Brain-muscle ARNT-like protein 1
PER	Período
CRY	Criptocromo
gcr	genes controlados por el reloj
REV-ERB $\alpha/\beta$	virus de eritroblastos reverso $\alpha/\beta$
ROR $\alpha/\beta$	receptor huérfano de ácido retinoico
RORE	elemento de respuesta del receptor huérfano parecido a ácido retinoico

AMPK	proteína cinasa activada por AMP
NPAS2	proteína neuronal 2 con dominio PAS
SCN	sistema nervioso central
DMH	núcleo dorsomedial hipotalámico
HRA	horario diario de restricción de alimento
OSA	Oscilador Sincronizado por el Alimento
AAA	actividad anticipatoria al alimento
LL	luz-luz
LD	luz-oscuridad
FD	privación de alimento
GNG	gluconeogénesis
PEPCK	fosfoenolpiruvatocarboxicinasas
G6Pasa	glucosa-6-fosfatasa
FOXO	forkhead
SIRT1	sirtuina 1
PGC-1 $\alpha$	coactivador de PPAR gamma de tipo 1 $\alpha$
ARNm	ARN mensajero
ChIP	inmunoprecipitación de la cromatina
siRNA	ARN pequeño de interferencia
Fa	ayuno agudo de 22 h
Rf	realimentación aguda de 2 h posterior a un ayuno simple
AL	Ad Libitum

PST	proteína soluble total
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
TBST	buffer salino de Tris y Tween 20
SEM	error estándar de la media
AJ	uniones adherentes
DAPI	4',6 diamino-2-fenilindol
T	triada portal
C	localización citosólica
M	localización membranal
PP1	proteína fosfatasa 1
PKA	proteína cinasa A
GLP-1	péptido 1 parecido a glucagon
HCC	hepatocarcinoma
DEN	dimetilnitrosamina
EOD	Every-other-day schedule
T3	triyodotironina
BIO	6-bromoindirrubina-3'oxima

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes vistas anatómicas del hígado. _____	19
Figura 2. Diagrama de la unidad microanatómica del hígado, el acino o lobulillo hepático. _____	25
Figura 3. Estructura cristalina de la proteína $\beta$ -catenina. _____	31
Figura 4. El complejo de destrucción de la $\beta$ -catenina. _____	33
Figura 5. La vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina. _____	34
Figura 6. Características que definen a un ritmo. _____	38
Figura 7. Mecanismo molecular de los relojes circadianos en los mamíferos. _____	44
Figura 8. Ritmo de la Actividad Anticipatoria al Alimento (locomotora) en rata, bajo condiciones Ad Libitum y en horario de restricción de alimento. _____	49
Figura 9. La vía gluconeogénica simplificada. _____	54
Figura 10. Perfil diario de expresión de la proteína pSer33 $\beta$ -catenina en el hígado de rata, en un protocolo de restricción diaria de alimento (HRA). _____	66
Figura 11. Perfil diario de expresión de la proteína pSer675 $\beta$ -catenina en el hígado de rata, en un protocolo de restricción diaria de alimento (HRA). _____	69
Figura 12. Perfil diario de expresión de la proteína $\beta$ -catenina total en el hígado de rata, en un protocolo de restricción diaria de alimento (HRA). _____	72
Figura 13. Localización de la proteína $\beta$ -catenina total en la membrana plasmática del hepatocito de rata, en un protocolo de restricción diaria de alimento (HRA). _____	75
Figura 14. Localización celular de la pSer33 $\beta$ -catenina en el hígado de rata en condiciones AL y su colocalización con la $\beta$ -catenina total. _____	76
Figura 15. Localización celular de la pSer33 $\beta$ -catenina en el hígado de rata bajo las condiciones HRA y Fa-Rf, así como su colocalización con la $\beta$ -catenina total. _____	78
Figura 16. Localización celular de la pSer675 $\beta$ -catenina en el hígado de rata en condiciones AL y su colocalización con la $\beta$ -catenina total. _____	79
Figura 17. Localización celular de la pSer675 $\beta$ -catenina en el hígado de rata bajo las condiciones HRA y Fa-Rf, así como su colocalización con la $\beta$ -catenina total. _____	81
Figura 18. Distribución zonal de la $\beta$ -catenina total en el acino hepático de rata. _____	83
Figura 19. Distribución zonal de la pSer33 $\beta$ -catenina en el acino hepático de rata. _____	84
Figura 20. Distribución zonal de la pSer675 $\beta$ -catenina en el acino hepático de rata. _____	85
Figura 21. Modelo de los cambios principales de 3 formas distintas de la $\beta$ -catenina en el hígado de rata, bajo diferentes protocolos de alimentación. _____	87

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Heterogeneidad subcelular del hepatocito y distribución diferencial de los diversos tipos celulares presentes en el acino hepático. ....	27
Tabla 2. Genes blanco autorregulados por la vía Wnt/ $\beta$ -catenina. ....	36
Tabla 3. Ejemplos de ritmos biológicos en diversos dominios de tiempo.....	41
Tabla 4. Analisis cronobiológico de la expresión de la pSer675 $\beta$ -catenina en el homogenado hepático total del grupo AL. ....	67

## ABSTRACT

The  $\beta$ -catenin protein is the main effector of the Wnt signaling pathway, which is well-known by their functions in cell proliferation and development. However, recently this pathway has been involved in a metabolic context, because the  $\beta$ -catenin regulates the hepatic glucose metabolism, the hepatic gluconeogenic response and histological changes in response to obesity-promoting diets.

The functional output and the cellular location of  $\beta$ -catenin is finely modulated by coordinated sequences of phosphorylation-dephosphorylation events. In this sense, we work with 3 different  $\beta$ -catenin variants: a  $\beta$ -catenin phosphorylated in serine residue 33 (pSer33  $\beta$ -catenin), whose fate is degradation by proteasome; a  $\beta$ -catenin phosphorylated in serine residue 675 (pSer675  $\beta$ -catenin), which presents an enhanced transcriptional activity and a total  $\beta$ -catenin that comprises both  $\beta$ -catenin unphosphorylated and phosphorylated states, which are related with the cell adhesion. The  $\beta$ -catenin phosphorylated variants and the total  $\beta$ -catenin were characterized in their expression levels, their location along the hepatic acinus and their subcellular presence in hepatocytes. In addition, we used a daytime restricted feeding (DRF) protocol to show that the above effects are sensitive to food access-dependent circadian synchronization. We found using Western blot and immunohistochemical analyses that DRF protocol promoted 1) higher total  $\beta$ -catenin levels mainly associated with the plasma membrane, 2) a reduced presence of cytoplasmic pSer33  $\beta$ -catenin, 3) an increase in the nuclear pSer675  $\beta$ -catenin, 4) a differential co-localization of total  $\beta$ -catenin/pSer33  $\beta$ -catenin and total  $\beta$ -catenin/pSer675  $\beta$ -catenin at different temporal points along day and in fasting and refeeding conditions, and finally 5) a differential liver zonation of the 3 liver  $\beta$ -catenin variants studied along the hepatic acinus.

In conclusion, the present data comprehensively characterizes the effect food synchronization has on the presence, subcellular distribution, and liver zonation of 2  $\beta$ -catenin phosphorylated variants and the total  $\beta$ -catenin. Research results are relevant to understand the set of metabolic and structural liver adaptations that are associated with the expression of the food entrained oscillator (FEO).

## **1. INTRODUCCIÓN**

El hígado es el segundo órgano (después de la piel) más grande del cuerpo, así como la glándula más voluminosa del mismo. Anatómicamente está situado bajo el diafragma, en el cuadrante superior derecho del abdomen y protegido por las costillas. El hígado se encuentra altamente vascularizado por lo que presenta una superficie brillante de color rojo oscuro (Kuntz & Kuntz, 2008). Su peso oscila entre 1.5-2 kg en el humano adulto, lo cual corresponde al 2-3% del peso corporal, aproximadamente. Sin embargo, presenta una ligera variación de peso entre géneros. El hígado es friable y está cubierto por la cápsula de Glisson, la cual se compone de fibras de colágeno, algunos fibroblastos y miofibroblastos, así como pequeños vasos sanguíneos y linfáticos (Bash, 1999).

### **1.1 División anatómica del hígado**

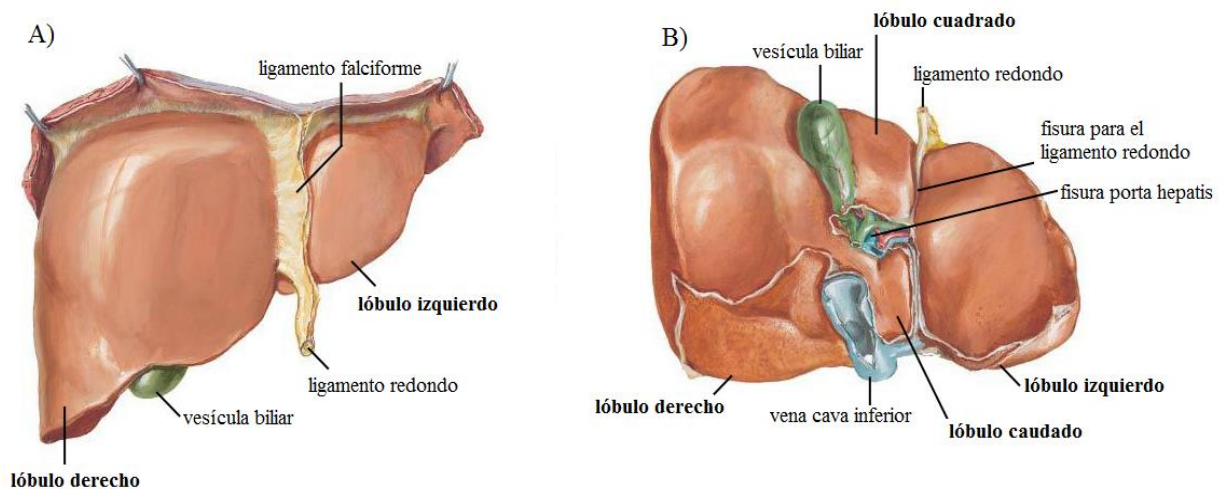
Embrionariamente, el hígado proviene del endodermo y en los humanos se compone por 4 lóbulos: el derecho, el izquierdo, el cuadrado y el caudal. Los lóbulos derecho e izquierdo, los cuales están separados por el ligamento falciforme, integran el 75% de la masa de este órgano y son fácilmente apreciados en una vista anterior del hígado (Figura 1A). Sin embargo, el lóbulo derecho es el de mayor tamaño, aproximadamente 6 veces más grande que el lóbulo izquierdo. En el caso de los lóbulos cuadrado y caudado, este último también denominado lóbulo de Spiegel, su apreciación anatómica se realiza desde una posición posterior e inferior del hígado (Figura 1B).

### **1.2 Sistema vascular hepático**

El hígado es un órgano altamente vascularizado, el cual recibe aproximadamente el 25% del gasto cardíaco. Su suministro de sangre es dual, ya que recibe sangre a través de la arteria hepática (entre 25%-30% del suministro total de sangre) y de la vena portal (70%-75% del suministro total de sangre). La sangre arterial y portal se mezclan dentro de los sinusoides hepáticos antes de que se drenen a la circulación sistémica.

### 1.2.1 La arteria hepática

La arteria hepática común es una rama del tronco celiaco que se extiende dentro de la arteria hepática propia. Esta última se divide en rama derecha (de la cual emerge la arteria cística) e izquierda (de la que ocasionalmente emerge la arteria hepática media). Ambas ramas, corren junto a las venas portales, propiciando la anastomosis entre las ramas de la arteria hepática y la vena porta. La función de la arteria hepática es suplir al hígado con sangre oxigenada, lo cual se lleva a cabo a través de las arterias interlobulares que se ramifican en las arteriolas interlobulares, cuya presión es de 30-40 mm Hg.



**Figura 1. Diferentes vistas anatómicas del hígado.**

A) Vista anterior, en la cual se aprecia fácilmente a los lóbulos hepáticos derecho e izquierdo, separados por el ligamento falciforme. B) Vista posterior e inferior del hígado, donde se aprecia el lóbulo caudado o de Spiegel y el lóbulo cuadrado. Tomado y modificado de (Netter, 2014).

### 1.2.2 La vena porta

La vena porta lleva al hígado una gran cantidad de sangre rica en nutrientes, los cuales provienen del intestino. No obstante, ésta sangre se encuentra desoxigenada. La vena porta se forma por la coalescencia de la vena mesentérica superior y la vena esplénica. Corre a lo largo del ligamento duodenal y absorbe sangre venosa de la vena coronaria ventricular. La sangre portal pasa a través de la población de hepatocitos periportales, para entrar al sinusoides por las válvulas venosas. El flujo de sangre venosa en el hígado es suplido en un 70-75% por la vena porta y en un 20-25% por la vena hepática (Kuntz & Kuntz, 2008).



### **1.2.3 La vena hepática**

La vena hepática emerge de la vena hepática central, en el centro del acino hepático y drena en la vena cava inferior en la superficie posterior del hígado, de esta manera abandona el hígado hacia la circulación sistémica.

### **1.2.4 Sistema biliar**

El sistema biliar intrahepático se integra por múltiples ductos que son responsables de la formación y el transporte de bilis del hígado hacia el duodeno. El canalículo biliar es un capilar con un diámetro entre 0.5-1.0  $\mu\text{m}$ , localizado en el espacio intercelular y rodeado por hepatocitos adyacentes. No tiene paredes propias, por lo que está rodeado de una zona especial de membrana celular llamada ectoplasma pericanalicular y su superficie se cubre por microvellosidades. Los canalículos presentan proteínas transportadores y enzimas para controlar la secreción biliar (Kuntz & Kuntz, 2008). Los canalículos biliares continúan su extensión en el canal de Hering, el cual es el punto limitante entre los canalículos y el inicio de los ductos biliares terminales o colangiocitos.

### **1.2.5 Vasos linfáticos**

Los capilares linfáticos, toman linfa del espacio de Disse. Estos, corren paralelos a las venas hepáticas y tienen válvulas que permiten el flujo de linfa en una sola dirección. Están presentes en todos los campos portales. Se encuentran exclusivamente en el tejido conectivo perivascular y en la cápsula del hígado.

## **2. TIPOS CELULARES DEL HÍGADO**

El hígado está formado en su mayoría por células parenquimales, representadas por los hepatocitos, y por una minoría de células no parenquimales, entre las que se encuentran las células sinusoidales, las células estelares, las células de Kupffer, los linfocitos intrahepáticos y los colangiocitos.

Los hepatocitos conforman alrededor del 80% del volumen total del hígado y la mayoría de funciones hepáticas se atribuyen a su actividad. En tanto que las células no parenquimales

conforman el 40% del total de las células del hígado, aunque solo contribuyen con un 6.5% del volumen hepático.

Las funciones, así como las interacciones de las células no parenquimales con los hepatocitos constituyen un factor de gran importancia que regula diversos aspectos de la fisiología y la patología hepática.

Una descripción detallada de las células hepáticas no parenquimales se encuentra en el anexo A.

## **2.1 Hepatocitos**

Los hepatocitos son células epiteliales polarizadas con forma poliédrica de entre 10-30  $\mu\text{m}$  de largo. Su membrana celular se divide en los siguientes 3 compartimentos, de acuerdo a sus características morfológicas y funcionales (Kuntz & Kuntz, 2008):

1) Superficie sinusoidal o basolateral, la cual es invaginada y abarca el 70% de la superficie total del hepatocito y cerca de un 37% de su membrana externa. Debido a que la membrana sinusoidal se encuentra cubierta por microvellosidades, su función principal es tanto absorbiva como secretora, lo cual permite el intercambio de sustancias entre la sangre y los hepatocitos a través del espacio de Disse.

2) Superficie canalicular o apical, la cual ocupa el 15% de la membrana externa del hepatocito y es considerada el polo secretor (biliar) de dicha célula. La membrana canicular, está aislada del espacio de Disse por uniones estrechas (tight junctions).

3) Fisura intercelular lisa, la cual está conectada al espacio de Disse, pero está delimitada del canalículo biliar a través de uniones estrechas, lo que permite el paso de agua y cationes. El área adyacente de los hepatocitos vecinos está unida por uniones adherentes, las cuales incluyen a las uniones intermedias (zonula adherens) y a los desmosomas (mácula adherens). Además, para facilitar el intercambio intercelular, los hepatocitos vecinos se comunican a través de uniones comunicantes (gap junctions).

El período de vida media de un hepatocito en el hígado humano adulto y sano es de aproximadamente 150-200 días, mientras que en el hígado de rata es de 191-453 (Kuntz & Kuntz, 2008). Sin embargo, aunque en el hígado adulto el índice mitótico es muy bajo (1

mitosis/1000 células o 2 mitosis/10000 células), cerca del 25% de los hepatocitos son binucleados y el 15% de ellos, son tetraploides (4X).

### **3. FUNCIONES DEL HÍGADO**

La localización anatómica del hígado en el organismo le confiere un rol importante en el manejo de nutrientes. Además, su comunicación directa con el tracto gastrointestinal a través de la vena porta y las múltiples funciones metabólicas que lleva a cabo promueven que se le considere como el centro metabólico de cuerpo.

El hígado puede actuar tanto como un órgano sensor, así como un órgano efector, el cual mantiene un aporte constante de energía al organismo. Entre sus variadas funciones se encuentran: la regulación ácido-base, el metabolismo de alcohol, el metabolismo de proteínas y aminoácidos, el metabolismo de ácidos biliares, el metabolismo de bilirrubina, la biotransformación y detoxificación de xenobióticos, el metabolismo de carbohidratos, el metabolismo de hormonas, el metabolismo de lipoproteínas y lípidos, el metabolismo de porfirinas, el manejo de elementos traza y el metabolismo de vitaminas (Bash, 1999; Kuntz & Kuntz, 2008).

### **4. EL ACINO O LOBULILLO HEPÁTICO**

La unidad funcional del parénquima hepático es un área de entre 15-25 hepatocitos denominada acino o lobulillo hepático, cuya estructura está basada en el aporte sanguíneo y por lo tanto, se considera como una unidad microcirculatoria.

A nivel celular, el acino hepático es heterogéneo tanto en estructura como en función, por lo cual se ha dividido para su estudio en las 3 zonas siguientes:

1) Zona periportal o zona 1 (ZPP), la cual está constituida por el conjunto de hepatocitos que circundan a la triada portal, esta última estructura se conforma por la arteria hepática (HA), la vena portal (PV) y el conducto biliar (BD). La ZPP tiene la ubicación más externa en el acino hepático. Además, posee la mayor concentración de oxígeno y nutrientes, los cuales son suplidos por la arteria hepática y la vena porta, respectivamente.

Los hepatocitos localizados en esta zona son denominados hepatocitos periportales (HPP), los cuales tienen un metabolismo principalmente aerobio, debido a que su microambiente tiene un alto contenido de oxígeno arterial. La proteína marcadora de la ZPP es la E-cadherina (Braeuning et al., 2006).

2) Zona intermedia o zona 2 (ZI), como su nombre lo indica, corresponde a la población de hepatocitos que se encuentran ubicados entre la ZPP y la zona más interna del acino hepático, llamada zona pericentral. Por lo tanto, esta zona es considerada como una región de transición entre 2 fenotipos de hepatocitos bien definidos, así como una zona de convergencia de nutrientes y vías metabólicas. Lo anterior limita la identificación de esta zona a través de una proteína marcadora específica.

3) Zona pericentral, zona perivenosa o zona 3 (ZPC), anatómicamente esta zona es la más interna del lobulillo hepático y está integrada por una población pequeña de hepatocitos que circundan a la vena central hepática. Los hepatocitos localizados en esta zona son llamados hepatocitos perivenosos o hepatocitos pericentrales (HPC). Los HPC tienen un metabolismo principalmente anaerobio, debido a que su microambiente es bajo en oxígeno. La disminución en la concentración de oxígeno y nutrientes es propiciada por la dirección del flujo de la arteria hepática y la vena portal, las cuales corren de la ZPP del acino hepático hacia la ZPC creando un gradiente de los elementos anteriores (Figura 2).

Las proteínas marcadoras de la ZPC son la enzima glutamina sintetasa (GS), el receptor 49 acoplado a proteínas G (Gpr49) y el citocromo P450 1A (Cyp 1A) (Braeuning et al., 2006). Sin embargo, la GS es el marcador más utilizado debido a su participación tan esencial en el manejo del amonio hepático.

## **5. ZONACIÓN METABÓLICA O HETEROGENEIDAD FUNCIONAL**

Histológicamente el hígado es un órgano homogéneo. No obstante, a nivel bioquímico y morfométrico presenta heterogeneidad, tales diferencias bioquímicas son conocidas con el nombre de zonación metabólica o heterogeneidad funcional.

El concepto de zonación metabólica fue vislumbrado por Jungermann & Katz (1977) y hasta la fecha sigue siendo fundamental para establecer que muchos procesos metabólicos en el hígado están organizados en forma de gradiente.

La zonación metabólica es el resultado de las diferencias zonales como los gradientes en la tensión de oxígeno, hormonas, sustratos, niveles de mediadores, inervación nerviosa e interacciones de las células hepáticas con la matriz extracelular (Jungermann & Keitzmann, 1996) presentes en el acino hepático y que guardan una estrecha relación con la distribución del flujo sanguíneo. Por ejemplo, dentro del acino hepático la tensión de oxígeno en la ZPP es aproximadamente de 65 mm Hg, mientras que en la ZPC es de 35 mm Hg. Es decir, los HPP están expuestos al doble de la concentración de oxígeno, respecto a los HPC. Además, la inervación nerviosa entra al hígado por los plexos de fibras simpáticas y parasimpáticas alrededor de la arteria hepática y la vena portal. Adicionalmente, la composición de la matriz extracelular en la ZPP está integrada de fibras de colágeno IV, V y de la proteína laminina, mientras que en la ZPC, predominan las fibras de colágena I, III, VI y la proteína fibronectina (Jungermann & Keitzmann, 1996).

Los factores anteriores fomentan una activación diferencial del genoma del hepatocito, lo que promueve que entre los hepatocitos de las 3 diferentes zonas del acino hepático existan diferencias funcionales.

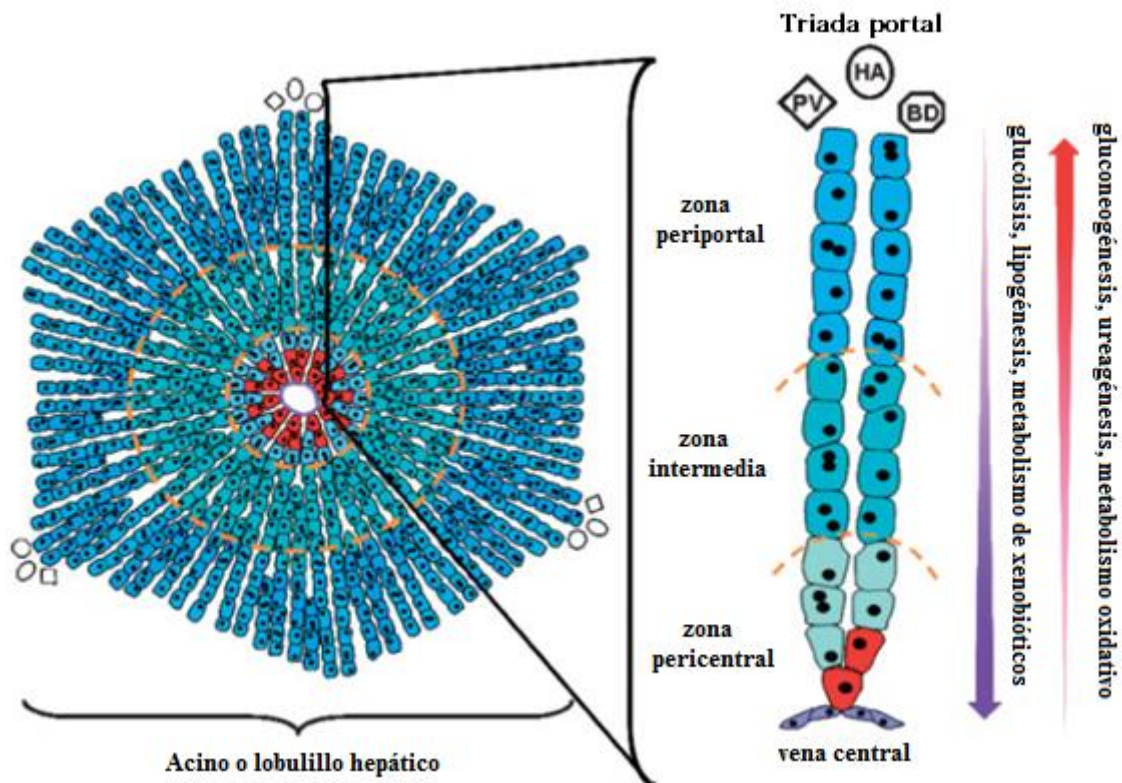
Debido a que ciertas vías metabólicas se modifican por la inversión del flujo de nutrientes y de oxígeno, la zonación metabólica se divide en zonación dinámica y zonación estática.

### **5.1 Zonación metabólica dinámica**

Como se mencionó previamente, una de las hipótesis propuestas para explicar el fenómeno de la zonación metabólica es el gradiente de metabolitos, hormonas y tensión de oxígeno que se forma a lo largo del acino hepático (Figura 2). La formación de tales gradientes es de suma importancia, ya que se ha observado que al invertir el flujo sanguíneo, los gradientes de oxígeno y de nutrientes también son revertidos, así como la actividad enzimática de las vías glucolítica y gluconeogénica (Kinugasa & Thurman, 1986). Por lo tanto, la regulación del metabolismo de carbohidratos depende de los factores anteriores y de cómo estos se encuentren en el microambiente del hepatocito.

Al tipo de zonación metabólica anterior, se le ha llamado “zonación dinámica” (Katz, 1992), ya que se adapta a los cambios metabólicos que sufre el hígado en distintas situaciones como el desarrollo perinatal, el género y las condiciones de ayuno y realimentación (Katz, 1992). Por lo tanto, la zonación metabólica es un fenómeno que incrementa la eficiencia de los

procesos metabólicos, ya que disminuye el gasto energético al separar parcialmente en diferentes poblaciones de hepatocitos los procesos metabólicos antagónicos como la gluconeogénesis y la glicólisis. Además, en una misma célula, la zonación propicia una catálisis simultánea de vías metabólicas conectadas, como es el caso de la glicólisis y la lipogénesis en los hepatocitos.



**Figura 2. Diagrama de la unidad microanatómica del hígado, el acino o lobulillo hepático.**

Usualmente, el acino hepático se representa en forma hexagonal. Al centro del hexágono se localiza la vena central, a partir de la cual los cordones de hepatocitos tienen un acomodo radial que llega hasta la zona periportal. El acino hepático se divide en 3 zonas diferentes: Una zona periportal, en la cual los hepatocitos se localizan en los alrededores de la triada portal, la cual se integra por la vena portal (PV), la arteria hepática (HA) y el conducto biliar (BD); una zona intermedia y una zona pericentral, la cual se integra por el conjunto de hepatocitos que circundan a la vena central. Los microambientes en cada zona determinan la preponderancia de una u otra vía metabólica a lo largo del acino (flechas azul y roja en la parte derecha de la figura). Los hepatocitos de la zona pericentral expresan como marcador a la enzima glutamina sintetasa (GS), representada en color rojo. Por su

parte, los hepatocitos de las 2 poblaciones restantes expresan como marcador a la enzima carbamoil fosfato sintetasa 1 (CPS1), en color azul. Tomado y modificado de (Burke & Tosh, 2006).

Igualmente, la zonación metabólica evita que todas las enzimas del metabolismo hepático tengan que ser expresadas en cada uno de los hepatocitos. Por lo anterior, la heterogeneidad funcional del hígado puede verse como uno de los principios regulatorios en el control metabólico (Katz, 1992) para la preservación de la homeostasis hepática, el cual trabaja en coordinación con otros niveles de regulación.

Los ejemplos clásicos de vías metabólicas que se encuentran zonadas en el acino hepático son: la gluconeogénesis, la biosíntesis de colesterol y la síntesis de urea en la ZPP y la glucólisis, la biosíntesis de ácidos biliares, la lipogénesis y el metabolismo de xenobióticos para la ZPC (Figura 2).

Si bien la zonación metabólica da pie a una especialización funcional de los hepatocitos, a nivel subcelular también favorece diferencias entre estos, así como en la localización en el acino hepático de las células hepáticas no parenquimales, como se aprecia en la Tabla 1.

## **5.2 Zonación metabólica estática**

El manejo de amonio es llevado a cabo en el acino hepático a través de 2 procesos metabólicos diferentes: el ciclo de la urea y por la enzima glutamina sintetasa (GS).

El ciclo de la urea es considerado un sistema de remoción amoniacal de gran capacidad pero baja afinidad (Haussinger, 1990). La ureagénesis se compone por 5 enzimas, de las cuales la carbamoilfosfato sintetasa 1 (CPS1), es la enzima limitante y se localiza primordialmente en la ZPP del acino, estando completamente ausente en la ZPC del mismo. Por el contrario, la enzima GS es una enzima principalmente citosólica (Deuel, Louie, & Lerner, 1978), la cual cataliza la formación de glutamina a partir de glutamato y amonio en una reacción dependiente de ATP (Deuel et al., 1978). La glutamina, es un aminoácido que permite manejar los niveles de amonio sin que estos resulten tóxicos para el sistema. Por lo tanto, la detoxificación de amonio a través de la GS se considera como un sistema carroñero de baja capacidad, pero muy alta afinidad (Haussinger, 1990). Si el amonio escapa de su procesamiento en la ZPP, entonces es degradado por completo a glutamina en la ZPC a través de la GS.

En el hígado adulto tanto humano como murino, la distribución de la GS en el acino hepático se encuentra exclusivamente en la ZPC, en las primeras 3 hileras de hepatocitos que circundan la vena central (CV) (Gebhardt et al., 2007). Por esta razón, es considerada la enzima marcadora de la ZPC del acino hepático (Braeuning et al., 2006) y una enzima importante en el metabolismo del nitrógeno.

*In vivo*, la GS no modifica su expresión al invertir el flujo sanguíneo o la tensión de oxígeno y en condiciones *in vitro*, la modificación en la concentración de sustratos, hormonas y matriz extracelular tampoco altera su expresión.

	Zona pericentral (ZPC)	Zona periportal (ZPP)
hepatocitos	más grandes	más pequeños
mitocondria	más pequeñas	más grandes
retículo endoplásmico liso	↑	↓
membrana del aparato de Golgi	↓	↑
glucógeno en el aparato de Golgi	↓	↑
lisosomas	↑	↓
células fenestradas	↓	↑
células de Kupffer	↓	↑
células de Ito	↓	↑
células PIT	↓	↑

**Tabla 1. Heterogeneidad subcelular del hepatocito y distribución diferencial de los diversos tipos celulares presentes en el acino hepático.** De acuerdo a su localización en el acino hepático, el hepatocito también presenta heterogeneidad a nivel subcelular, la cual se refleja en su tamaño y en la cantidad de organelos que contiene (flecha hacia arriba = mayor cantidad, flecha hacia abajo = menor cantidad). Asimismo, los diferentes tipos celulares del hígado tienen una preferencia en su localización a lo largo del acino hepático. Tomado y modificado de (Kuntz & Kuntz, 2008).



Debido a lo anterior, la GS es una enzima muy estable y su regulación está dada únicamente a nivel transcripcional (Gebhardt et al., 2007). La expresión de la GS en el acino hepático se denomina “zonación estática” y sólo algunos estímulos metabólicos como el ayuno prolongado (Gebhardt et al., 2007), la restricción proteínica (Louie, Deuel, & Morris, 1978) o calórica (Spindler, 2001) pueden modificar su expresión de 3 hileras de hepatocitos alrededor de la vena central a sólo una hilera. Sin embargo, estímulos más agresivos como el tratamiento con tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) (Schöls, Mecke, & Gebhardt, 1990), la cirrosis hepática, el hepatocarcinoma (HCC) (Matsuno & Goto, 1992), el tratamiento con bromobenzidina o paracetamol (Gebhardt, Gaunitz, and Mecke, 1994) y la hepatectomía parcial (Chung, 1964) destruyen selectivamente a los HPC aboliendo la expresión de la GS, sin que haya un efecto compensatorio en la expresión de ésta en las ZI o ZPP del acino hepático. La ausencia de estos mecanismos compensatorios puede propiciar cambios en el metabolismo del nitrógeno, los cuales resultan en hiperamonemia.

Se ha propuesto que la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, también conocida como vía Wnt canónica es un regulador de la zonación metabólica. Ya que, cuando esta vía de señalización es bloqueada por el uso de un antagonista (Dickkopf-1), hay una disminución en la expresión génica de los HPC, pero un incremento en las proteínas marcadoras de los HPP (Benhamouche et al., 2006). Lo cual sugiere que en el acino hepático, la activación de la proteína  $\beta$ -catenina (el efector más importante de la vía Wnt canónica) propicia que los hepatocitos presenten un fenotipo pericentral, mientras que la inhibición de dicha vía promueve que los hepatocitos adquieran un fenotipo periportal.

## 6. LAS VÍAS WNT

A inicios de los años 80, fue descrito el primer gen de la familia Wnt (Wnt-1). El nombre Wnt proviene de la fusión de algunas letras (en negritas) de los genes *wingless* e *Int-1* (Integration-1), los cuales son genes ortólogos (Rijsewijk et al., 1987). El primero, es un gen presente en la mosca de la fruta, cuya ausencia propicia un fenotipo “sin alas”, en tanto que

el segundo es un gen murino cuya activación por el virus del tumor mamario de ratón (MMVT1) produce tumorigénesis (Nusse & Varmus, 1982).

En los mamíferos, la familia de proteínas Wnt se integra por 19 miembros (Wnt1-Wnt16), de acuerdo a la similitud de su secuencia (Coudreuse & Korswagen, 2007), los cuales están agrupados en 12 subfamilias. Mientras que las proteínas Wnt son los ligandos de las vías Wnt, las proteínas Frizzled (Fz) son los receptores de la misma, encontrándose 10 miembros de estos receptores (Fz1-Fz10) en mamíferos (revisado en the Wnt Gene Homepage [<http://www.stanford.edu/%7Ernusse/wntwindow.html>]).

La señalización intracelular de los ligandos Wnt se lleva a cabo a través de 3 vías de transducción diferentes: una vía canónica y 2 vías no canónicas.

En la vía canónica, la proteína efectora más importante es la  $\beta$ -catenina y por lo tanto es llamada también vía Wnt/ $\beta$ -catenina. Esta vía de señalización se encuentra conservada a lo largo de la evolución, ya que algunos de sus elementos más importantes están presentes desde las esponjas hasta los vertebrados (Valenta, Hausmann, & Basler, 2012), incluyendo a los humanos. Su importancia radica en la formación del eje corporal desde inicios de la evolución animal.

Las vías no canónicas se agrupan en la vía Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  y en la vía polaridad celular planar o PCP. Éstas se caracterizan porque la señalización intracelular que es independiente de  $\beta$ -catenina. En la vía Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ , se activan proteínas G, la fosfolipasa C (PLP C) y la fosfodiesterasa (PDE), lo que incrementa los niveles de calcio intracelulares que activan a enzimas como la cinasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina II (Kühl, 2002) y a la proteína cinasa C (PKC).

En el caso de la vía Wnt/PCP, la activación del receptor propicia la activación de las GTPasas pequeñas como RhoA y la cinasa Rho, o de Rac y la cinasa N-terminal c-Jun (JNK), lo cual tiene efectos sobre la dinámica del citoesqueleto (Kühl, 2002).

Puesto que la vía Wnt/ $\beta$ -catenina es la vía de señalización que se ha relacionado con el fenómeno de la zonación metabólica hepática, en la siguiente sección nos enfocaremos en su efector principal, la proteína  $\beta$ -catenina. Así como en la regulación de esta al interior celular, a través de un complejo multiproteico (el complejo de destrucción de  $\beta$ -catenina), el cual marca a la proteína para su degradación proteosomal. Sin embargo, una reseña de todos los demás componentes de la vía Wnt canónica puede consultarse en el Anexo B.

## 7. LA PROTEÍNA $\beta$ -CATENINA

La  $\beta$ -catenina fue descubierta a finales de los 80s por 2 grupos de investigación diferentes. Lo anterior fue debido a que la  $\beta$ -catenina en las células presenta simultáneamente una función estructural y transcripcional.

En 1989, el grupo de Rolf Kemler, aisló un complejo de proteínas asociado a la E-cadherina (ovomorulina) en diferentes líneas celulares de ratón (NIH3T3), humano (HeLa) y codorniz (QT6) (Ozawa, Baribault, & Kemler, 1989). Este complejo de proteínas tenía pesos moleculares de 80, 88 y 102 kDa, por lo que fueron llamadas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -catenina, respectivamente. El nombre catenina se obtuvo del latín *catena*, cadena. Ya que dicho nombre reflejaba la función de las proteínas cateninas como intermediarias en la unión de la E-cadherina con el citoesqueleto de actina (Ozawa et al., 1989).

Por otro lado, el papel señalizador de la  $\beta$ -catenina fue vislumbrado a través de su gen ortólogo *armadillo*, el cual fue descubierto en el embrión de *Drosophila melanogaster* (Wieschaus, Nüsslein-Volhard, & Jürgens, 1984). En estos experimentos se observó que los embriones mutantes para *armadillo*, presentaban alteraciones en los segmentos de la cutícula, las cuales no se presentaban en el embrión silvestre (Wieschaus et al., 1984). Posteriormente, se determinó que la función del gen *armadillo* es regulada por la vía de señalización wingless en *Drosophila* (Riggleman, Schedl, & Wieschaus, 1990) o Wnt/ $\beta$ -catenina en los mamíferos. En los mamíferos, la  $\beta$ -catenina actúa como coactivador transcripcional en la señalización por Wnt. Aunado a esto, tiene un papel fundamental en la función y organización estructural de las cadherinas, ya que une a la E-cadherina con los filamentos de actina para formar las uniones adherentes entre células (AJ) (Jamora & Fuchs, 2002) y regular tanto la motilidad y la morfología celular.

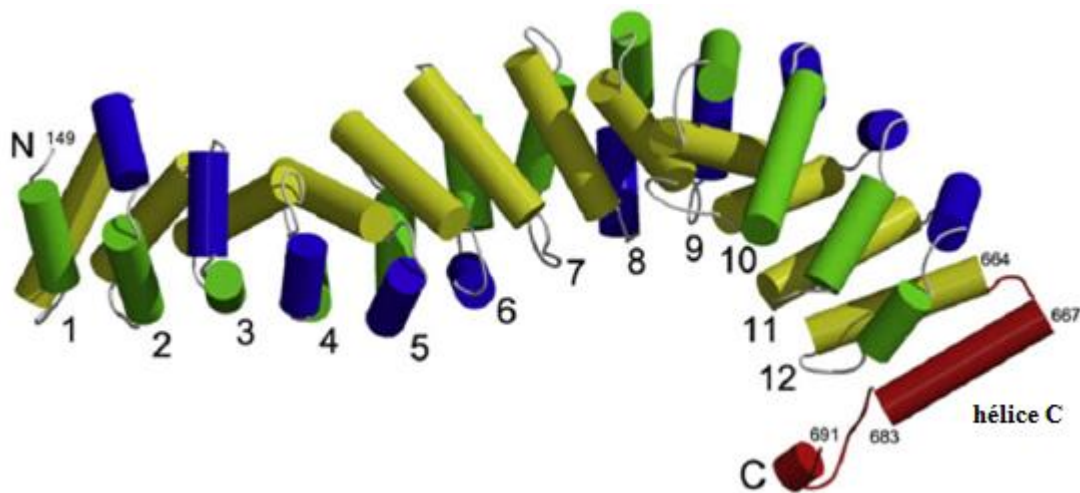
### 7.1 La estructura de la $\beta$ -catenina

La  $\beta$ -catenina es miembro de la superfamilia de proteínas Armadillo, las cuales se caracterizan por su unión a las proteínas cadherinas (Huber & Weis, 2001). La estructura de la  $\beta$ -catenina humana presenta 781 residuos de aminoácidos y tiene un peso de 92 kDa. La parte central de dicha estructura posee una región rígida denominada Armadillo, la cual se conforma por 12 repeticiones de aminoácidos (R1-R12) que van de los residuos 138 al 664

(Figura 3), y que están flanqueadas por los extremos flexibles N-terminal y C-terminal, respectivamente.

Las repeticiones Armadillo integran una super hélice con un zurco cargado positivamente. Adyacente a la última repetición Armadillo se localiza otra hélice denominada la hélice C, la cual es de suma importancia para la señalización de  $\beta$ -catenina y el rol de unión célula-célula (Xing et al., 2008) (Figura 3). La función esencial de las repeticiones Armadillo es servir como plataforma de unión para otras proteínas como Adenomatous Polyposis Coli (APC) y E-cadherina (Huber & Weis, 2001) a lo largo de los diferentes compartimentos celulares. Debido a lo anterior, la  $\beta$ -catenina es considerada como una proteína de andamiaje.

Asimismo, las repeticiones armadillo 1 (R1) y 11 (R11) han sido identificadas como regiones importantes para la transactivación de los genes blanco de Wnt (Städli, Hoffmans, & Basler, 2006), ya que R1 interactúa con los coactivadores transcripcionales BCL9 y Pygopus (Kramps et al., 2002), mientras que R11 interactúa con los coactivadores transcripcionales parafibromina, Brg1, CBP/p300 y MED12 (Städli et al., 2006), y los inhibidores transcripcionales ICAT y Chibby (Takemaru et al., 2003).



**Figura 3. Estructura cristalina de la proteína  $\beta$ -catenina.**

La proteína  $\beta$ -catenina se conforma por 12 repeticiones Armadillo (números del 1-12), flanqueadas por los extremos N-terminal (N) y C-terminal (C), respectivamente. Cada repetición Armadillo (exceptuando la séptima), se integra a su vez por 3 hélices representadas por cilindros de colores: hélice 1 (cilindros azules), hélice 2 (cilindros verdes) y hélice 3 (cilindros amarillos). Junto a la última repetición Armadillo y muy cercana al extremo C-terminal, se encuentra la hélice C, la cual tiene un papel fundamental en las funciones de la  $\beta$ -catenina. Tomado y modificado de (Xing et al., 2008).

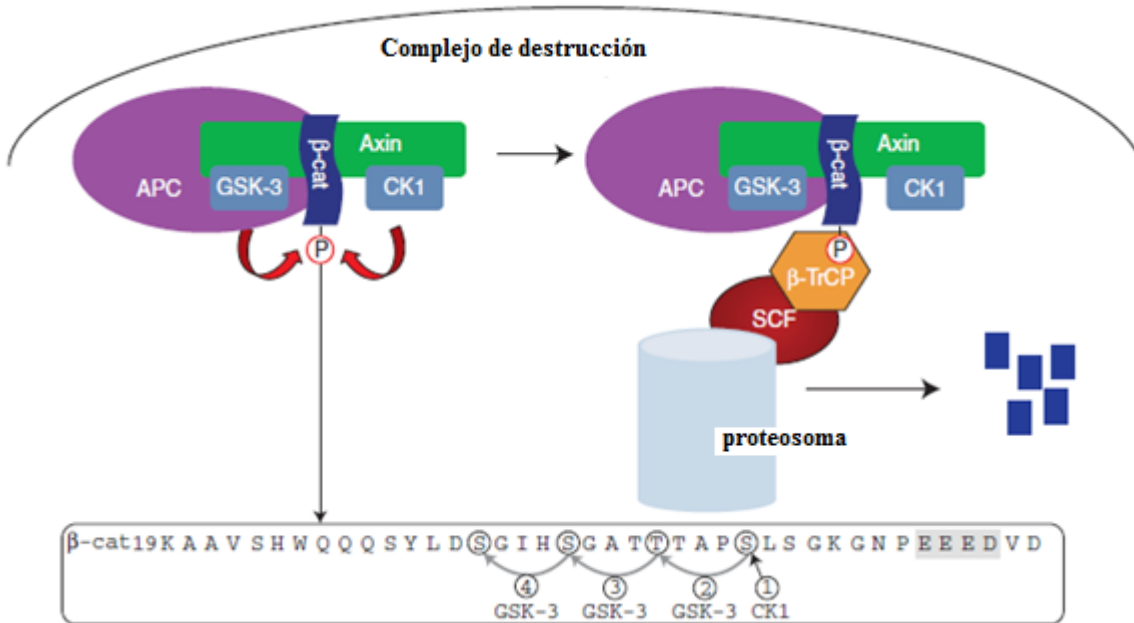
## 7.2 El complejo de destrucción de la $\beta$ -catenina

Las células sintetizan y degradan  $\beta$ -catenina constantemente, a menos que el ligando Wnt esté presente y active a la vía Wnt/  $\beta$ -catenina.

La presencia constitutiva de  $\beta$ -catenina es regulada a nivel citosólico por un complejo multiprotéico conocido como “el complejo de destrucción” de  $\beta$ -catenina. Los integrantes de este complejo son las proteínas supresoras de tumores: adenomatous polyposis coli (APC) y axina, las serina/treonina cinasas caseína cinasa 1 (CK1) y glucógeno sintasa cinasa 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), la proteína fosfatasa 2A (PP2A) y el complejo ubiquitina ligasa  $\beta$ -TrCP.

En ausencia del ligando Wnt, las cinasas CK1 y GSK3 $\beta$  fosforilan secuencialmente los residuos de serina 33, 37 y 45, así como el residuo de treonina 41 en el extremo N-terminal de la  $\beta$ -catenina (Stamos & Weis, 2013) (Figura 4). Tales fosforilaciones propician que la  $\beta$ -catenina sea reconocida por el complejo  $\beta$ -TrCP, el cual transfiere múltiples ubiquitinas a la  $\beta$ -catenina en los residuos de lisina 19 y 49. El sitio de unión de  $\beta$ -TrCP a la  $\beta$ -catenina es una secuencia peptídica corta en las serinas 33 y 37. Una vez que la  $\beta$ -catenina interactúa con el complejo  $\beta$ -TrCP, es poliubiquitinada y degradada proteolíticamente por el proteosoma (Aberle et al., 1997). La fosforilación en los residuos de serina 33 y 37 por la GSK3 $\beta$  en la estructura de la  $\beta$ -catenina, es la función mejor caracterizada para estudiar el complejo de destrucción de esta proteína.

La información sobre las proteínas de andamiaje (Axina y APC), las proteínas cinasas (CK1 y GSK3 $\beta$ ) y las fosfatasas (PP2A) involucradas en el complejo de destrucción puede ser consultada en el Anexo B.

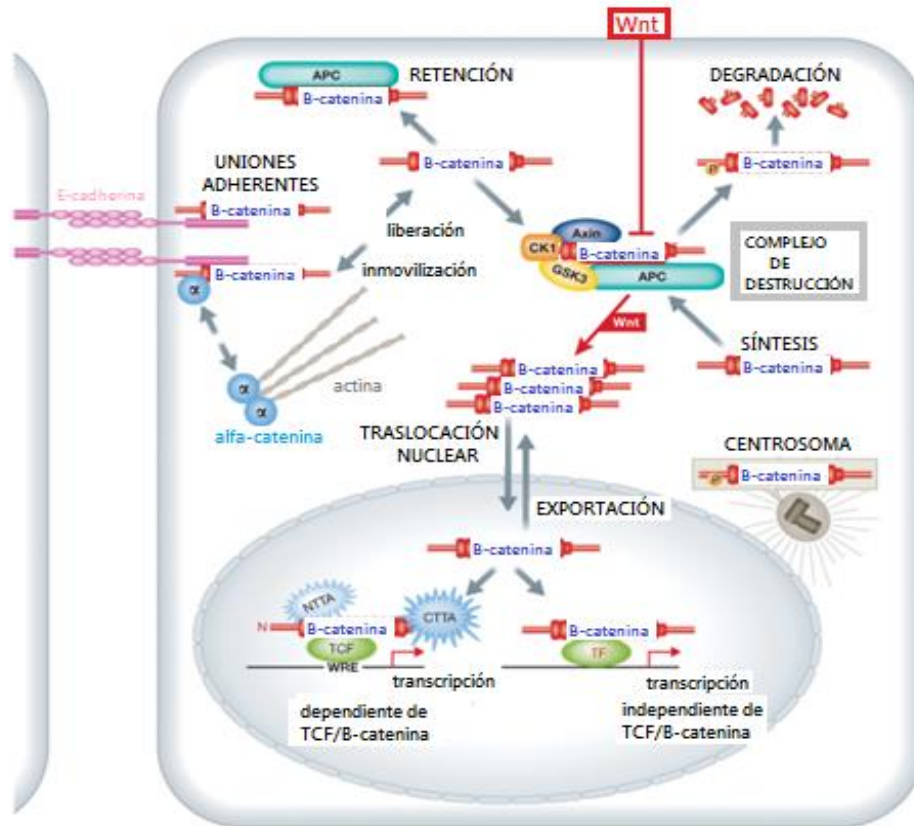


**Figura 4. El complejo de destrucción de la  $\beta$ -catenina.**

Entre los componentes del complejo de destrucción de la  $\beta$ -catenina se encuentran las proteínas adenomatous poliposis coli (APC), axina, y las cinasas caseína cinasa 1 (CK1) y glucógeno sintasa cinasa 3 $\beta$  (GSK3  $\beta$ ). CK1 y GSK3 $\beta$  fosforilan secuencialmente a la  $\beta$ -catenina en diferentes residuos de serina y treonina, en el extremo N-terminal de la proteína (recuadro). La fosforilación de la  $\beta$ -catenina propicia que el complejo ubiquitina ligasa Skp1/cullin/F-box (SCF) la marque para su degradación por el proteosoma. P=fosforilación. Tomado y modificado de (Stamos & Weis, 2013).

### 7.3 Transducción de señales de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina

La vía Wnt/ $\beta$ -catenina se centra en la regulación de los niveles citosólicos de la  $\beta$ -catenina (síntesis de novo y/o disociación del complejo  $\beta$ -catenina/E-cadherina de la membrana celular), a través del llamado complejo de destrucción. Sin embargo, cuando los ligandos Wnt se unen a sus receptores Fz y al correceptor LRP5/6, la proteína Dishevelled (Dvl) recluta a la proteína andamio Axina, impidiendo la formación del complejo de destrucción. Por lo tanto, la  $\beta$ -catenina se acumula en el citosol y posteriormente trasloca al núcleo celular, donde forma un complejo con el factor de células T (TCF) y el factor potenciador linfóide (LEF) para promover la transcripción de sus genes blanco. La activación transcripcional por  $\beta$ -catenina se considera el paso final de la señalización por Wnt (Figura 5).



**Figura 5. La vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina.**

Cuando la  $\beta$ -catenina es sintetizada de novo en la célula, es reclutada en las uniones adherentes de la membrana celular por la proteína E-cadherina. Esto le permite a la E-cadherina una modulación indirecta del citoesqueleto de actina, a través de su interacción con la  $\beta$ -catenina. La liberación de la  $\beta$ -catenina de las uniones adherentes provoca su incremento en el citoplasma celular, el cual es rápidamente sentido y regulado por el complejo de destrucción. Una fracción de la  $\beta$ -catenina se mantiene en el citoplasma al unirse a APC. Sin embargo, cuando algún ligando Wnt inicia la cascada de señalización, se impide la formación del complejo de destrucción y los niveles citoplasmáticos de la  $\beta$ -catenina se incrementan. Dicho incremento, promueve que la  $\beta$ -catenina trasloque al núcleo celular donde se asocia a la familia de coactivadores transcripcionales TCF/LEF, propiciando la transcripción de los genes blanco de Wnt. Otros factores diferentes a TCF/LEF también sirven como una plataforma de unión al ADN para la  $\beta$ -catenina. La presencia nuclear de  $\beta$ -catenina es modulada a través de su importación y/o exportación de este organelo. Además de sus funciones anteriores, la  $\beta$ -catenina tiene un rol importante en la función del centrosoma. NTTA=activadores transcripcionales N-terminal, CTTA=activadores transcripcionales C-terminal, WRE=elemento de respuesta a Wnt, TF=factores de transcripción, CK1=caseína cinasa 1, GSK3=glucógeno sintasa cinasa 3. Tomado y modificado de (Valenta et al., 2012).

#### 7.4 Genes blanco de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina

En vertebrados (humano, ratón, rata, rana y pez cebra) como en invertebrados (mosca de la fruta), se conocen aproximadamente 100 genes blanco de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, entre los que se encuentran:

- Factores de transcripción (c-jun, Fra-1, Hath 1, sox 9, sox 17, sox 2, runx 2, SALL4, FoxN1, nanog, Oct4, snail, islet 1, proteína miogénica bHLH, engrailed 1, engrailed 2, MITF/nacre, Twist, brachyury, Cdx1, Cdx4, Irx 3, Six 3, neurogenina 1, SP 5, Neuro D1, Nkx2.2, Gbx2, Pitx2, movo 1, mBTEB2, Ubx, shavenbaby),
- reguladores transcripcionales (Id2, Msl1, LBH, siamosis, dharmabozozok),
- reguladores del ciclo celular (c-myc, n-myc, ciclina D, proteína de unión a c-myc, Ccna1) y reguladores apoptóticos (survivina),
- factores de crecimiento (BMP4, VEGF, FGFG 4, FGFG 9, FGFG 18, FGF 20, IGF-1, IGF-2, Dpp) y endotelinas (endotelina 1),
- proteínas presentes en la matriz extracelular y metaloproteasas de matriz (MMP7, MMP26, CCN1, fibronectina, estromelina, versican),
- receptores nucleares (RAR  $\gamma$ , PPAR  $\delta$ ) y precursores metabólicos (proglucagon),
- proteínas que integran la membrana celular y/o receptores membranales (uPAR, Nr-CAM, CD44, EphB/efrina-B, Met, adhesión neural L1, LGR5/GPR49, Stra 6, MDR1, receptor de EGF, ectodisplasina, CTLA-4, ret, Tnfrsf 19),
- proteínas estructurales y/o de unión (claudina 1, conexina 30, conexina 43, queratina),
- ligandos (Jagged1, ligando 41BB de la familia TNF, ligando RANK, proteína transmembranal delta 1),
- enzimas (óxido nítrico sintasa 2, telomerasa, Wrch-1, ciclooxigenasa 2, Cdc 25),
- genes de respuesta temprana (WISP, stripe),
- hormonas (osteocalcina) y
- citocinas (IL-6, IL-8), entre otros.

Cabe mencionar que estos genes son considerados directos, cuando presentan sitios de unión a los TCF e indirectos en el caso opuesto.

La lista completa de los genes blanco de la vía Wnt canónica se presenta en el Anexo C.



Aunado a lo anterior, la vía Wnt/ $\beta$ -catenina promueve la expresión de varios de sus componentes, lo cual indica la retroalimentación génica de la vía como una forma de autoregulación (Tabla 2).

<b>Gen blanco</b>	<b>Efecto de la señalización Wnt en la expresión del gen blanco</b>	<b>Efecto de los cambios en la expresión del gen blanco sobre la vía Wnt canónica</b>	<b>Interacciones del gen blanco con:</b>
Fz	baja	inactiva	Wnt
Fz7	alta	-----	Wnt
dFz2	baja	inactiva	Wnt
dFz3	alta	activa	Wnt
Arrow/LRP	baja	inactiva	Wnt
Dickkopf	alta	inactiva	Wnt
Dally (HSPG)	baja	-----	Wnt
Wingful/notum	alta	inactiva	Wnt
naked	alta	inactiva	Dsh
nemo	alta	inactiva	TCF
Axina2	alta	inactiva	$\beta$ -catenina
$\beta$ -TRCP	alta	inactiva	$\beta$ -catenina
TCF1 (dn)	alta	inactiva	TCF
LEF1	baja	activa	$\beta$ -catenina

**Tabla 2. Genes blanco autorregulados por la vía Wnt/ $\beta$ -catenina.** Los genes mostrados son componentes activos de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, lo cual indica su retroalimentación como una forma de regulación. Fz=Frizzled, LRP=proteínas parecidas a las lipoproteínas de baja densidad, HSPG=proteoglicanos de heparan sulfato,  $\beta$ -TRCP= proteínas con repetición de  $\beta$ -transducina, TCF=

factor de células T, LEF= factor potenciador linfoide. Tomado y modificado de “the Wnt homepage (<http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>)”.

Ya que la vía Wnt/ $\beta$ -catenina presenta una gran cantidad de genes blanco, se reconoce su importancia en el proceso de desarrollo y en la diferenciación/renovación tisular de algunos tejidos de organismos mamíferos adultos, como el intestino (van Es et al., 2005), los folículos capilares (Alonso & Fuchs, 2003), la piel (Alonso & Fuchs, 2003), el sistema hematopoyético (Reya et al., 2003), el hueso (Yu et al., 2005) y el hígado (Behari 2010). Aunado a lo anterior, la vía Wnt canónica presenta funciones importantes en el metabolismo hepático (Behari, 2010), como se menciona en la sección de antecedentes. Por lo que, esta vía de señalización se considera como esencial a lo largo de la vida.

Dado que, tanto la proliferación celular como el metabolismo hepático presentan ritmicidad circadiana, lo cual se aprecia a través del ciclo celular o el perfil diario en la presencia de diversas enzimas y metabolitos, nuestro interés se centró en estudiar a la proteína  $\beta$ -catenina desde un punto de vista rítmico. Es así que, los conceptos relacionados a los ritmos biológicos se presentan en la siguiente sección.

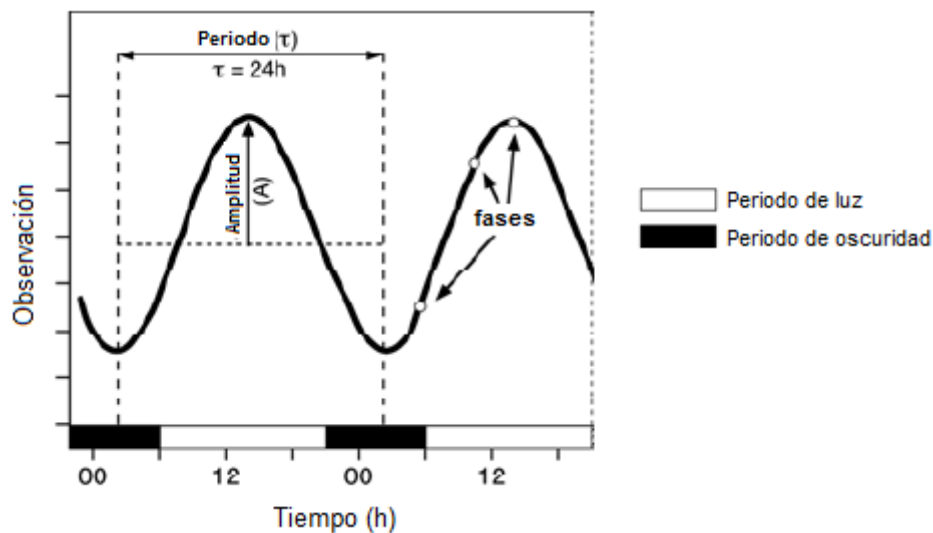
## **8. RITMOS BIOLÓGICOS**

Un ritmo se define como el cambio de una variable que se repite en el tiempo, con un patrón y un período similar. Si dicha variable es biológica y endógena (no sólo una respuesta al ambiente), la oscilación puede denominarse como un ritmo biológico.

Generalmente, los ritmos son descritos a través de 3 de sus características, la amplitud (A), el período ( $\tau$ ) y la(s) fase(s) (Figura 6). El período, representa el tiempo requerido para completar un ciclo. En este sentido, si se quiere saber el número de ciclos en cierta unidad de tiempo, se habla de la frecuencia (f), la cual es el recíproco del período. La fase se refiere a un punto o estado instantáneo o repetible del ciclo. Generalmente, el punto de mayor expresión de la variable biológica se denomina pico y el punto de menor expresión de dicha variable se denomina el valle. Si la variable rítmica ha sido ajustada a una curva sinusoidal, el término acrofase y batifase hacen referencia al pico y al valle, respectivamente. Por último,

la amplitud se refiere a la magnitud de la variable rítmica desde su línea base (su media o su promedio), hasta el pico o valle de expresión de dicha variable (Figura 6).

Usualmente, la clasificación de un ritmo biológico se da en base a su período. Si el ritmo tiene un período  $<20$  h, se le denomina ritmo “ultradiano”. A los ritmos con períodos cercanos a las 24 h (aproximadamente el movimiento de rotación de la Tierra) se les nombra como ritmos “circadianos”, nombre que viene del latín *circa* (cercano) y *diem* (día) y que significa “cercano al día”. En este dominio se encuentran la mayoría de los ritmos biológicos que se han estudiado en los mamíferos, incluyendo al humano. Por lo que, en ocasiones se llega a usar como sinónimos ritmos biológicos y ritmos circadianos.



**Figura 6. Características que definen a un ritmo.**

El período ( $\tau$ ), la amplitud ( $A$ ) y la(s) fase(s) son las características primordiales que describen a un ritmo. En la imagen, el período del ritmo corresponde a 24 h, en donde 12 h corresponden a la fase de luz (barra blanca) y 12 h a la fase de oscuridad (barra negra). Basado en (Valdés- Ramírez, 2009).

Por último, a los ritmos con períodos  $>28$  h se les conoce como ritmos “infradianos”. En conjunto, estos 3 dominios principales de los ritmos biológicos abarcan toda una gama de tiempo que va de los milisegundos (ms) hasta años. Por lo que, toda una variedad de funciones ocurre de manera simultánea en el mismo organelo, célula u organismo.

No obstante, existen otros dominios de tiempo en los que se puede categorizar a los ritmos biológicos. Entre estos, tenemos a los ritmos circaseptianos ( $7\pm 3$  días), a los circatrigintanos ( $30\pm 5$  días), a los ritmos circanuales ( $1$  año  $\pm 2$  meses), circatidales (24.8 h), circalunares

(29.53 días) y semitidales (12.4 h). Algunos ejemplos de ritmos biológicos en sus diversos dominios de tiempo se muestran en la Tabla 3.

En los organismos, las estructuras generadoras de un ritmo determinado (cualquier parámetro fisiológico), son llamadas osciladores. Si el oscilador es capaz de generar por sí mismo un ritmo y además, tener control sobre otros ritmos u osciladores, entonces es llamado oscilador primario o marcapasos, como es el caso del núcleo supraquiasmático (ver más adelante). Por el contrario, si el oscilador depende de otra estructura o está bajo el control de un oscilador primario, se le conocerá como oscilador secundario.

Para que una estructura anatómica sea considerada como un reloj biológico, debe constar de 3 elementos: una vía de entrada, un oscilador, el cual será el elemento central del reloj, y una vía de salida.

tiempo	período	variable	organismo
	<1s	actividad del EEG (frecuencia delta)	humano ( <i>Homo sapiens</i> )
segundos	<1s	electrocardiograma (depolarización de los ventrículos del corazón)	humano ( <i>Homo sapiens</i> )
	30-45 s	niveles de NADH	levaduras ( <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> )
	1 min	canto de cortejo (machos)	mosca de la fruta ( <i>Drosophila melanogaster</i> )
	2-4 min	movimiento de hojas	planta telégrafo ( <i>Desmodium gyrans</i> )
	4-15 min	tiempo de reacción	humano ( <i>Homo sapiens</i> )
	15 min	secreción de cortisol	hipocampo ( <i>Equus caballus</i> )
	30 min	transpiración	avena ( <i>Avena sativa</i> )
minutos	45-62 min	movimiento de hojas	soya ( <i>Glycine max</i> )
	76 min	contenido de proteína celular	<i>Acanthamoeba castellanii</i>
	75-100 min	movilidad pupilar	humano ( <i>Homo sapiens</i> )

	85-90 min	secreción de cortisol	mono rhesus ( <i>Macaca mulata</i> )
	90 min	temperatura de la ubre	vaca Holstein ( <i>Bos taurus</i> )
	90-100 min	sueño MOR y no MOR	humano ( <i>Homo sapiens</i> )
	100 min	nutación	Judía trepadora ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )
horas	4h	actividad enzimática	euglena ( <i>Euglena gracilis</i> )
	12 h	actividad de amilasa	alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> )
	24 h	temperatura corporal	humano ( <i>Homo sapiens</i> )
día	24 h	sueño-vigilia	humano ( <i>Homo sapiens</i> )
	24 h	movimiento de hojas	albizia ( <i>Albizia julibrissin</i> )
	24 h	actividad	ardilla voladora ( <i>Galucmys volans</i> )
	7 días	oviposición	colembola ( <i>Folsomia candida</i> )
semana	7 días	rechazo al transplante de órganos	humano ( <i>Homo sapiens</i> )
	7 días	inhibición de semillas	frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )
mes	27-34 días	ciclo menstrual	mujer ( <i>Homo sapiens</i> )
	6 meses	perforación por úlcera	humano ( <i>Homo sapiens</i> )
	1 año	germinación de semillas	papa silvestre ( <i>Solanum acaule</i> )
	1 año	reemplazo de astas	ciervo sica ( <i>Cervus nippon</i> )
	1 año	migración	mosquitero musical ( <i>Phylloscopus trochilus</i> )
	1 año	hibernación	ardilla de manto dorado ( <i>Citellus lateralis</i> )
	1 año	peso del ovario	pez gato ( <i>Heteropneustes fossilis</i> )

años	1-7 años	peso gonadal	erizo púrpura de mar ( <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> )
	8 años	actividad de la alfa-amilasa	trigo ( <i>Triticum spp</i> )
	8-10 años	población	grévol engolado ( <i>Bonasa umbellus</i> )
	13 o 17 años	surgimiento	magicicada ( <i>Magicicada spp</i> )
	100-120 años	floración	Bambú chino ( <i>Phyllostachys bamusoides</i> )

**Tabla 3. Ejemplos de ritmos biológicos en diversos dominios de tiempo.**

EEG=electroencefalograma, NADH=dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido, MOR=movimientos oculares rápidos, s=segundos, h=horas. Tomado y modificado de (Koukkari & Sothorn, 2006).

### 8.1 Propiedades de los ritmos biológicos circadianos

Los ritmos circadianos presentan 5 propiedades fundamentales, las cuales están conservadas a través de las especies. Estas propiedades son:

- a) Un período cercano a 24 h, aún cuando la longitud del período entre especies diferentes sea variable.
- b) Pueden ser sincronizados, lo cual se refiere a que las señales ambientales (la luz, la comida o la interacción social, entre otras) pueden modificar la fase o el período del ritmo biológico. A estas señales externas se les denomina sincronizadores.
- c) Son endógenos, lo que significa que aún en ausencia de señales ambientales externas, el ritmo biológico persiste. A esta condición de persistencia, se le llama *freerunning* o *libre corrimiento*, el cual se observa al colocar al organismo de estudio en condiciones constantes de oscuridad y apreciar que el ritmo biológico de interés continúa. Un ejemplo de esto, son los movimientos de las hojas de la *Mimosa púdica* con una periodicidad de 24 h, en oscuridad continua, fenómeno observado por el astrónomo francés De Mairan en 1729.

- d) Compensan la temperatura, ya que los ritmos biológicos mantienen su período constante a través de un rango amplio de temperatura, sin verse afectados por el coeficiente de temperatura  $Q_{10}$ , como sucede en otros fenómenos.
- e) Son genéticos, ya que el reloj circadiano tiene características hereditarias y está programado a nivel del genoma.

## **8.2 El núcleo supraquiasmático (NSQ)**

Los ritmos biológicos están sustentados por un mecanismo molecular que recae en un reloj central, localizado en el hipotálamo, el cual se conoce como el núcleo supraquiasmático (NSQ). El NSQ fue identificado por Curt Richter, quien a través de lesiones hipotalámicas identificó un área que al ser destruida resultaba en la pérdida de los ritmos circadianos de actividad y de ingesta de agua y comida (Richter, 1960). Ulteriormente, los grupos de trabajo de Robert Moore e Irving Zucker, confirmaron al NSQ como el reloj maestro de los mamíferos, a través de la lesión de este en roedores. En 1972, se demostró que la lesión del NSQ abole la actividad circadiana locomotriz y de ingesta de agua (Stephan & Zucker, 1972), así como algunas variables endócrinas, como la secreción de corticosterona (Moore & Eichler, 1972a). Años después, se observó que el trasplante del NSQ fetal (Aguilar-Roblero et al., 1987) a organismos arrítmicos restaura su ritmicidad circadiana con un ritmo determinado por el genotipo del NSQ transplantado (Sujino et al., 2003). Actualmente, estudios *in vitro* han mostrado que las oscilaciones del NSQ son robustas y se mantienen por varias semanas (Reppert & Weaver, 2002), mientras que los explantes de órganos periféricos como el hígado, presentan oscilaciones que decaen rápidamente hasta que un nuevo estímulo sincronizador como la adición de suero bovino fetal al medio de cultivo las restaura (Reppert & Weaver, 2002). Lo anterior, denota el orden jerárquico y la importancia del NSQ en los organismos.

La información referente a la localización y estructura del NSQ puede ser revisada en el Anexo D.

### 8.3 Mecanismo molecular de los relojes biológicos

El mecanismo molecular básico de los relojes biológicos comprende asas de retroalimentación positivas y negativas o transcripción-traducción, que propician la oscilación de proteínas que regulan su propia expresión. Estas proteínas y los genes que las originan se designan como *genes* y *proteínas reloj*, respectivamente. Este mecanismo molecular está presente en el reloj central (NSQ), como en los osciladores periféricos, lo que genera oscilaciones celulares autónomas y robustas.

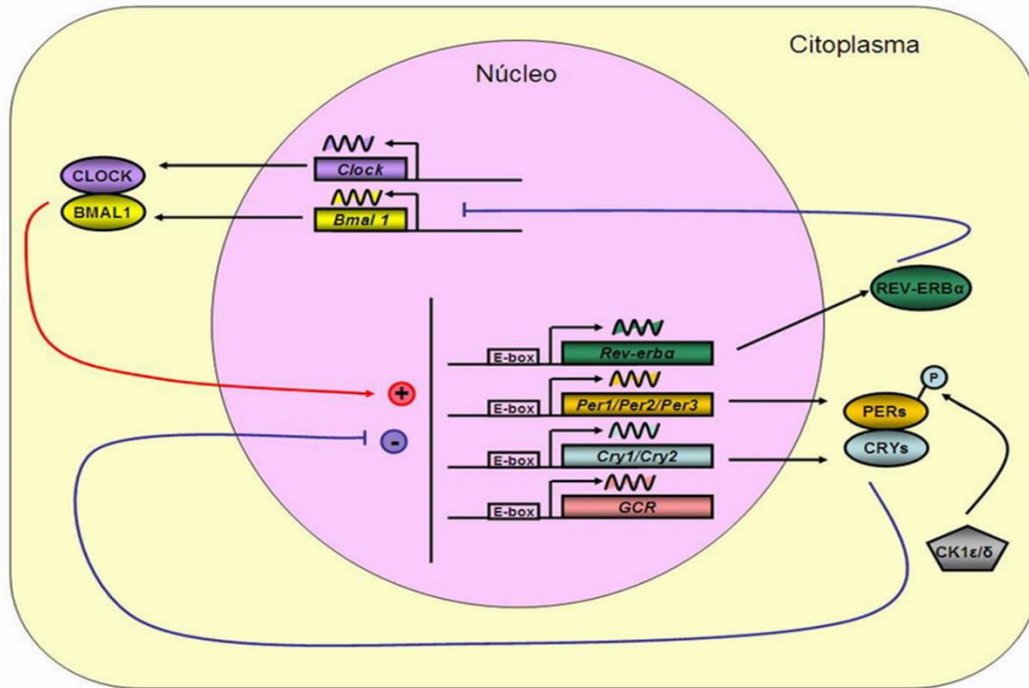
Las proteínas reloj que integran el asa de retroalimentación positiva son CLOCK (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput) y BMAL1 (Brain-muscle ARNT-like protein 1), mientras que las proteínas que conforman el asa negativa son PER (Período) y CRY (Criptocromo) (Figura 7). El incremento en los niveles de transcripción de *per* y *cry* promueve el aumento en los niveles de sus proteínas, las cuales heterodimerizan en el citoplasma celular. Posteriormente, el heterodímero PERs/CRYs trasloca al núcleo celular, donde inhiben su propia transcripción, así como la de otros genes controlados por el reloj (*gcr*) (Reppert & Weaver, 2001). En ausencia de PER y CRY, las proteínas CLOCK y BMAL1 actúan como reguladores positivos de la expresión génica circadiana. Ya que, activan la expresión de los genes *per* y *cry*, que regulan negativamente el mecanismo del reloj molecular al unirse a elementos específicos del ADN, llamados cajas E (CACGTG) (Gekakis et al., 1998).

Por otro lado, existen 2 asas de retroalimentación accesorias, donde los receptores nucleares virus de eritroblastosis reversa  $\alpha/\beta$  (REV-ERB $\alpha/\beta$ ) (Guillaumond, Dardente, Giguère, & Cermakian, 2005; Preitner et al., 2002) y el receptor huérfano de ácido retinoico  $\alpha/\beta$  (ROR $\alpha/\beta$ ) (Guillaumond et al., 2005) regulan la expresión de *Bmal1*, al inhibir o promover la expresión de este, respectivamente (Figura 7). Tanto los REV-ERBs como los RORs, compiten entre ellos por el elemento de respuesta del receptor huérfano parecido a ácido retinoico (RORE) en el promotor de *Bmal1*, para llevar a cabo sus efectos. La ventaja de estas asas alternas es que confieren una mayor robustez a las oscilaciones circadianas.

El inicio de un nuevo ciclo del reloj molecular se da cuando el complejo CLOCK/BMAL1 escapa de su represión, gracias a que la fosforilación por la caseína cinasa  $1\epsilon/\delta$  (CK1 $\epsilon/\delta$ ) (Figura 7), la glucógeno sintasa cinasa  $3\beta$  (GSK3 $\beta$ ) y la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) sobre PER y CRY, hace que éstos sean marcados para su degradación por el proteosoma. Dicha degradación, puede ser vista como una regulación temporal de las



proteínas reloj, que posibilita un reinicio continuo del mecanismo molecular del reloj. Adicionalmente, se presenta una regulación espacial dinámica de las proteínas reloj, cuando éstas se encuentran en tránsito entre el núcleo y citoplasma celular. Ambos tipos de regulación permiten la generación de patrones rítmicos de expresión génica y de presencia de las proteínas reloj, los cuales son autosostenidos y que tienen un período cercano a 24 h.



**Figura 7. Mecanismo molecular de los relojes circadianos en los mamíferos.**

Las proteínas reloj PERs y CRYs, integran el asa de retroalimentación negativa (línea azul) del mecanismo del reloj molecular, al heterodimerizar en el citoplasma celular y posteriormente traslocar al núcleo para inhibir su propia expresión génica, así como la expresión de los genes *Rev-erba* y los genes controlados por el reloj (*gcr*). Por el contrario, una vez que las proteínas CLOCK y BMAL1 heterodimerizan, traslocan al núcleo para actuar como reguladores positivos de la expresión génica de los genes ya mencionados. Por lo tanto, integran el asa de retroalimentación positiva (flecha roja) del mecanismo del reloj molecular. Cuando la caseína quinasa  $\epsilon/\delta$  (CK1 $\epsilon/\delta$ ) fosforila al heterodímero PERs/CRYs, este es fosforilado (P) y marcado para su degradación por el proteosoma, por lo que un nuevo ciclo del reloj vuelve a iniciar. Basado en (Kohsaka & Bass, 2007).

Los osciladores biológicos diferentes al NSQ localizados tanto en el sistema nervioso central (SNC) (diferentes núcleos hipotalámicos y otras áreas cerebrales), como en la periferia del organismo (todos los órganos viscerales) se denominan “osciladores periféricos”.

Al igual que el NSQ, los osciladores periféricos cuentan con un mecanismo molecular que está conservado en todas las células del organismo. Sin embargo, su expresión génica es tejido-específica, lo que optimiza la función de éstos en un sistema circadiano global.

#### **8.4 Oscilador Sincronizado por el Alimento (OSA)**

Si bien, los osciladores periféricos del organismo están coordinados por el NSQ (Schibler & Sassone-Corsi, 2002), experimentos en roedores han mostrado que el acceso al alimento en la fase de reposo del animal (para los murinos, la fase diurna) desacopla gradualmente a los osciladores periféricos del NSQ (Damiola et al., 2000). Esto significa que una señal no fótica como el cambio forzado en la hora de alimentación, sincroniza a los osciladores periféricos de manera independiente al NSQ. En consecuencia, la expresión de los genes reloj (*per1*, *per2*, *dbp*) en tejidos periféricos como el hígado (Hara et al., 2001), puede ser sincronizada por la periodicidad del alimento, lo cual no sucede para el NSQ.

La sincronización por el alimento se produce al dar al animal una sola comida al día en un intervalo de entre 2-4 h, por días consecutivos. Esto implica imponer un horario diario de restricción de alimento (HRA), el cual representa la única oportunidad del animal para alimentarse durante ese día.

En un ciclo luz-oscuridad 12:12 h, el HRA se establece en la fase diurna. Ya que, aunque los roedores pueden anticipar la llegada del alimento a cualquier hora del día, la actividad anticipatoria al alimento (AAA) (ver siguiente sección), es más clara cuando la comida se da en la fase de reposo del animal (fase de luz). Dicha maniobra experimental, evita el enmascaramiento entre la actividad propia del animal y la AAA que se tendría, si el alimento se diera en la fase de oscuridad.

El HRA tiene efectos notables tanto en el comportamiento (AAA) como en la fisiología del animal. Debido a que, en condiciones naturales la búsqueda de alimento se realiza a una determinada hora del día, pues la disponibilidad de las presas (como insectos y roedores) fluctúa en el día y a lo largo de las estaciones del año. Por lo tanto, los depredadores tienen que anticipar la presencia de alimento (presa) para tener una mejor oportunidad de

alimentación. Entre los animales que anticipan sus horarios de alimentación están las abejas, los peces, los marsupiales, los pájaros, los ratones, los hámsteres, las ratas, los conejos, las comadreja, los monos araña (Mistlberger, 1994) y los humanos.

El resultado del HRA es el desacoplamiento entre los órganos periféricos y el NSQ, para formar una red intercomunicada de estructuras cerebrales y periféricas. Dicha red actúa como un reloj circadiano diferente al NSQ, que se conoce como Oscilador Sincronizado por el Alimento (OSA). Contrario a lo que se pudiera pensar, el sustrato anatómico del OSA no ha sido vislumbrado. Sin embargo, la importancia del OSA radica en la adaptación del organismo a comer de manera diferente. Lo cual se logra al recibir e integrar información que genera un nuevo mensaje temporal que coordina a los osciladores periféricos.

Una explicación de por qué la disponibilidad de alimento tiene relevancia como un sincronizador, viene de las células reloj más primitivas, las cianobacterias (Johnson & Golden, 1999). Para estos procariontes fotosintéticos, la luz es al mismo tiempo un sincronizador y una fuente de energía, la cual provee alimento. Lo anterior, pudo promover que el ritmo de acceso al alimento actuara como un sincronizador primario, como en el caso de otros procariontes (enterobacterias) y algunas células eucariontes como los hepatocitos.

Debido a que el mecanismo molecular del NSQ y de los osciladores periféricos recae en asas de retroalimentación transcripción-traducción de los genes reloj (Figura 7), las mutaciones de estos, han sido extensivamente estudiadas en el ratón.

Una recopilación de dichas mutaciones y el fenotipo observado en la actividad locomotriz de los roedores en condiciones constantes (libre corrimiento o free running) se presenta en el anexo D.

### **8.5 Actividad Anticipatoria al Alimento (AAA)**

Una de las manifestaciones más evidentes del OSA es la aparición de una intensa actividad locomotora entre 2-3 h previas a la presentación del alimento, la cual alcanza su pico de expresión en el horario donde los animales comen. A esta conducta se le ha denominado Actividad Anticipatoria al Alimento (AAA). La AAA fue evidenciada en 1922 por Curt

Richter, quien observó que la actividad locomotora de ratas en la rueda de corrida se incrementaba antes del horario en que los animales comían (Carneiro & Araujo, 2012).

La AAA se define como la actividad previa que presentan los animales experimentales a un HRA y la cual se caracteriza por presentar niveles incrementados de algún parámetro fisiológico (actividad locomotriz, incremento de la temperatura corporal, pico de expresión de ciertas hormonas y/o enzimas) en comparación a los animales alimentados *Ad Libitum*, a esa hora del día.

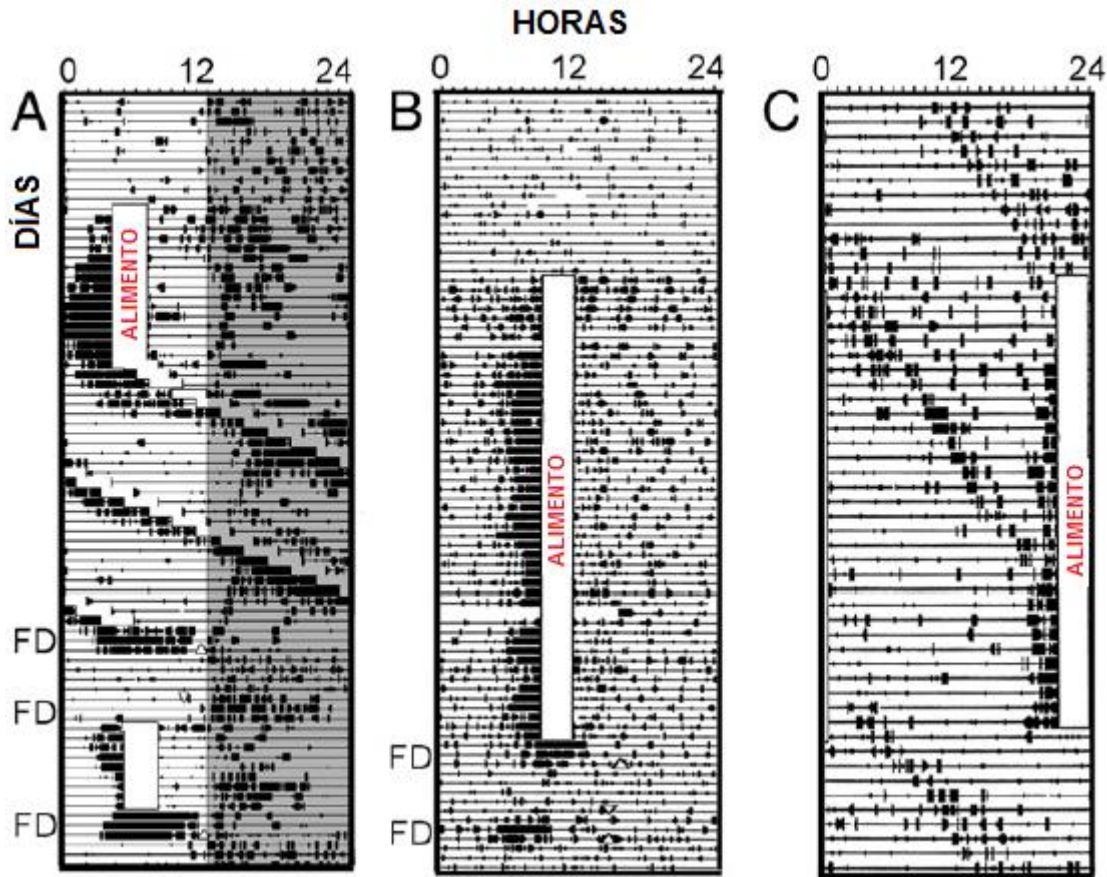
Entre los ejemplos de anticipación al alimento en los roedores se encuentran el tiempo que pasa el animal frente al comedero o el reforzamiento en el palanqueo de su dispensador, el incremento de la temperatura corporal o el pico de corticosterona horas previas a la presentación del alimento (Mistlberger, 1994). En la rata, los ritmos de anticipación al alimento han sido bien caracterizados, ya que esta especie puede tolerar varios días de privación de alimento, mientras que otros roedores como el ratón y el hámster son más vulnerables a este protocolo.

Dentro de las adaptaciones fisiológicas reportadas en la anticipación al alimento está el incremento en las disacaridasas intestinales (Saito, Kato, and Sueda, 1980), en la motilidad duodenal (Comperatore & Stephan, 1987), en el glucagon (Díaz-Muñoz et al., 2000), en los ácidos grasos libres y los cuerpos cetónicos (Rivera-Zavala et al., 2017), así como una disminución en los triacilglicéridos (Escobar et al., 1998) y la insulina sistémica (Díaz-Muñoz et al., 2000). Todas estas variables fisiológicas modificadas hacen suponer que la AAA es una actividad de optimización de forrajeo o a una respuesta de escape que conlleva a una mayor eficiencia metabólica.

Una vez que la AAA está bien establecida, muestra su persistencia apareciendo todos los días a la misma hora del HRA por un lapso de 3-5 días, aun cuando los animales estén privados de alimento. Además, presenta libre corrimiento, el cual desaparece rápidamente en condiciones *Ad libitum*, pero vuelve a reaparecer cercano a la hora de restricción alimenticia cuando después del período *Ad Libitum*, los animales vuelven a ser privados de alimento (Figura 8A). Otras características que reflejan a la AAA como parte del OSA son su sincronización al alimento, su expresión en ratas arrítmicas que son sincronizadas al alimento (Figura 8B) y su aparición en condiciones constantes de luz-luz (LL) (Figura 8C) u oscuridad-oscuridad (DD) del ciclo 12:12 h (Mistlberger, 2011).

Debido a que la AAA es una manifestación del OSA, diversos grupos de trabajo han tratado de identificar el sustrato anatómico de este reloj circadiano. Lo cual, se ha abordado a través de la lesión electrolítica o con ácido iboténico de diversas áreas cerebrales, para posteriormente ver los efectos de esas lesiones sobre la AAA y de esta manera tener una aproximación de la localización del OSA. Entre estos experimentos se tiene a la lesión del núcleo parabraquial, la cual reduce drásticamente la AAA, llegando a abolirla en algunos animales (Davidson, Cappendijk, & Stephan, 2000); las lesiones en el hipocampo (Mistlberger & Mumby, 1992), el núcleo ventromedial del hipotálamo (Mistlberger & Rechtschaffen, 1984), el núcleo arcuato del hipotálamo (Mistlberger & Antle, 1999) y el área postrema (Davidson et al., 2001) que sólo presentan una influencia muy pequeña sobre la expresión de la AAA. Otras maniobras como la hipofisectomía (Davidson & Stephan, 1999a) no han abolido la AAA, pero eliminan la anticipación en el incremento de la temperatura. En tanto que la vagotomía subdiafragmática no tiene ningún efecto en la AAA (Comperatore & Stephan, 1990), así como tampoco lo tienen la inducción de anosmia a través de sulfato de zinc (Coleman & Hay, 1990) o la bulbectomía olfatoria (Davidson et al., 2001). Debido a lo anterior, el sustrato anatómico del OSA continúa sin ser elucidado. No obstante, el interés por tener un conocimiento más detallado del mecanismo molecular de este reloj circadiano se ha visto reflejado en el estudio de mutaciones en los genes reloj de los mamíferos y su efecto en la expresión de la AAA.

En este sentido, se ha mostrado que los ratones mutantes para *Bmal1* (*Bmal1*<sup>-/-</sup>) presentan AAA tanto en condiciones de luz-oscuridad (LD), como en oscuridad constante (DD) (Pendergast et al., 2009). Sin embargo las mutaciones en los genes reloj *Per1* (*Per1*<sup>-/-</sup>) y *Per2* (*Per2*<sup>*Brdm1*</sup>) promueven una disminución de la AAA en condiciones LD y DD (Mendoza, Albrecht, & Challet, 2010).



**Figura 8. Ritmo de la Actividad Anticipatoria al Alimento (locomotora) en rata, bajo condiciones Ad Libitum y en horario de restricción de alimento.**

El horario diario de restricción de alimento (HRA) está representado por la barra vertical blanca. En cada gráfica (actograma), las líneas horizontales representan 1 día de registro, en los cuales el apagado de las luces se denota por el área sombreada. El conteo de la actividad (bins de 10 min) se esquematiza con las barras negras más gruesas, a lo largo de cada día. (A) Representación de la actividad locomotora de una rata en un ciclo luz-oscuridad 12:12 (LD 12:12), a la que se le restringió el acceso al alimento por 3h al día en el período de luz. La AAA se observa desde algunas horas antes de la restricción de alimento al comienzo del HRA. Se aprecia como la AAA va siguiendo a la restricción de alimento, aunque esta se alargue de 24-26 h. Sin embargo, cuando la comida se omite por completo “privación de alimento” (FD), el ritmo de AAA locomotriz persiste por 3 ciclos más. (B) Una rata con ablación completa del NSQ, presenta arritmicidad cuando es alimentada *Ad Libitum*, pero presenta un ritmo de AAA robusto cuando es alimentada sólo 3h/día diariamente. Este ritmo persiste o reaparece durante la privación completa de alimento. (C) Una rata en condiciones constantes de luz (LL), exhibe un ritmo de libre corrimiento (período >24h). No obstante, cuando se le impone un HRA, presenta un ritmo de AAA. Tomado y modificado de (Mistlberger, 2011).

En el caso de los animales dobles mutantes de *Per1<sup>-/-</sup>;Per2<sup>Brdm1</sup>* y *Per2<sup>Brdm1</sup>;Cry2<sup>-/-</sup>*, la AAA disminuyó respecto a los animales control y se perdió completamente en los animales *Per2<sup>Brdm1</sup>;Cry1<sup>-/-</sup>* (Mendoza et al., 2010). Cabe mencionar que tanto la disminución como la ausencia de la AAA en los animales mutantes no es debida a la hipoactividad de los mismos, ya que su actividad en la rueda de corrida durante la noche es similar a la de los animales control (Mendoza et al., 2010). Más bien, estaría indicando que el mecanismo molecular del OSA depende en cierta medida de los genes reloj.

En cuanto a la eficiencia del alimento como sincronizador, se ha determinado que tanto su calidad como por su cantidad (Mistlberger & Rusak, 1987) son importantes. Ya que, para que el alimento pueda producir un ritmo de la AAA, debe suplir las necesidades nutricionales diarias. Por lo tanto, las comidas palatables, pero no nutritivas como la sacarina o la celulosa endulzada con sacarina, parecen no tener efecto alguno sobre el OSA. Lo anterior, descarta al sabor del alimento o a la distensión estomacal como sincronizadores del OSA (Stephan, 1997). No obstante, las comidas palatables presentadas con un acceso restringido a los animales experimentales, producen AAA (Mendoza, Ángeles-Castellanos, & Escobar, 2005), siempre y cuando aporten aproximadamente un 30% de la ingesta calórica diaria del animal.

Además, hay que resaltar que la restricción calórica que normalmente acompaña al HRA no es esencial para producir anticipación al alimento, pero parece acelerar dicho proceso (Challet & Pévet, 1996).

## **8.6 Significado adaptativo de los ritmos biológicos**

Los cambios del ambiente debidos al movimiento rotacional y traslacional de la Tierra han conferido una presión selectiva constante sobre los organismos. Esto, ha determinado en gran manera que los sistemas biológicos sean periódicos. Ya que, la alternancia luz-oscuridad es la fuente primaria más confiable de información acerca de la hora del día y de las estaciones del año.

Es decir, la medida interna del tiempo a través de un reloj circadiano se considera como una ventaja en la organización fisiológica y metabólica de los organismos. Lo que permite una mejor coordinación entre los diferentes procesos biológicos, de acuerdo con el tiempo

geofísico. Por ejemplo, diariamente el ciclo sueño vigilia coincide con los ciclos de ayuno-alimentación en la mayoría de los mamíferos. Mientras que, las migraciones, la reproducción y la hibernación de muchos animales sólo se presentan en ciertas épocas del año.

Tal es la relevancia de los relojes circadianos en la biología de los seres vivos que las alteraciones en los genes reloj tienen efectos deletéreos en diversos procesos fisiológicos de los mamíferos, como se muestra en el Anexo D.

## **9. ANTECEDENTES**

En los humanos, la desregulación y/o mutación de diversos componentes de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina tienen efectos adversos sobre el metabolismo. Es sabido que el polimorfismo de un solo nucleótido en el gen de *Wnt5b* (Kanazawa et al., 2004) o en un alelo común de la familia TCF (TCF4) (Grant et al., 2006) propician una mayor susceptibilidad de padecer diabetes. Además, la mutación en el gen que codifica para el correceptor LRP6 está asociada a un desbalance en el manejo de glucosa y con hiperlipidemia (Mani et al., 2007).

En modelos de animales murinos, la pérdida del correceptor LRP5 produce un incremento en las concentraciones del colesterol plasmático, y una secreción de insulina pancreática desregulada (Fujino et al., 2003). Lo anterior, sugiere un rol importante de la vía Wnt en la regulación de diversas vías metabólicas.

### **9.1 La vía Wnt/ $\beta$ -catenina en el hígado**

En el hígado de ratón se han identificado a los 19 ligandos Wnt y a los 10 receptores Fzd (Zeng et al., 2007). Los cuales, muestran una expresión diferencial entre los diversos tipos celulares del hígado (hepatocitos, células de Kupffer, células estelares, células endoteliales y células biliares), así como entre el tejido hepático adulto y el embrionario (Zeng et al., 2007). Esto sugiere una comunicación cruzada entre las diferentes células del hígado e igualmente, un alto grado de complejidad en la señalización Wnt.

La vía Wnt/ $\beta$ -catenina ha sido estudiada en todos los estadios del tejido hepático, lo cual abarca el desarrollo prenatal del hígado y su organogénesis (Nejak-Bowen & Monga, 2008); el hígado adulto sano y sus funciones metabólicas y la patología del hígado en enfermedades como la fibrosis, el hígado graso o el cáncer (Russell & Monga, 2017). Sin embargo, en esta



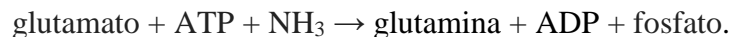
sección nos enfocaremos en las funciones metabólicas hepáticas que involucren a la vía Wnt canónica y a su efector principal, la proteína  $\beta$ -catenina.

## **9.2 La $\beta$ -catenina en la remoción del amonio hepático y en la zonación metabólica**

El ion amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) es un producto de desecho que se obtiene por el metabolismo de proteínas y aminoácidos. No obstante, es un metabolito tóxico a altas concentraciones por lo que debe ser removido eficazmente de las células. En el hígado, la remoción de amonio se lleva a cabo a través de 2 procesos metabólicos diferentes: el ciclo de la urea y la enzima glutamina sintetasa (GS).

En el ciclo de la urea, el amonio se transforma en una sustancia menos tóxica, llamada urea, por la cual el ciclo adquiere su nombre. Para la formación de urea se requieren 5 enzimas diferentes, siendo la carbamoilfosfato sintetasa 1 (CPS1) la enzima limitante del ciclo. La CPS1 se encuentra en las mitocondrias del hepatocito y su distribución en el acino hepático está zonada, ya que su presencia va de la zona periportal (ZPP) hacia la zona intermedia (ZI), estando ausente en los hepatocitos pericentrales (HPC) (Brosnan & Brosnan, 2009).

Por el contrario, la GS se localiza en las primeras 3 hileras de hepatocitos que conforman la zona pericentral hepática (ZPC) (Gebhardt & Mecke, 1983). La GS cataliza la condensación de glutamato y amoniaco para formar glutamina, en una reacción dependiente de ATP, como la siguiente:



El ciclo de la urea y la GS son sistemas complementarios que permiten al hígado regular de manera efectiva los niveles de amonio en sangre. Ya que, mientras que el ciclo de la urea es un sistema de alta capacidad y baja afinidad, la GS es un sistema de baja capacidad, pero alta afinidad (Haussinger, 1990). Lo cual significa que el poco amonio que escapa de su procesamiento por el ciclo de la urea en la ZPP es convertido a glutamina por la GS en los HPC. Por lo que, la remoción de amonio hepático está íntimamente relacionado con el fenómeno de la zonación metabólica.

La GS es también la enzima marcadora de la ZPC y la  $\beta$ -catenina es uno de sus factores transcripcionales (Burke & Tosh, 2006) que regula la expresión de la GS a través de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina.

La vía Wnt canónica se considera como el regulador maestro de la zonación metabólica. En ratones knockout para APC (un regulador negativo de  $\beta$ -catenina) hay una activación aberrante de la  $\beta$ -catenina y el fenotipo resultante es una expresión extendida de la GS de la ZPC hasta la ZPP (Benhamouche et al., 2006). Lo anterior, provoca la muerte de los animales experimentales debido a una hiperamonemia severa que va acompañada de hiperglutaminemia y hepatomegalia (Burke & Tosh, 2006).

Inversamente, cuando se inhibe la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en los hepatocitos a través de un antagonista (Dickkopf-1) (Benhamouche et al., 2006), hay un decremento en la expresión de los marcadores de la ZPC y un aumento en los marcadores de la ZPP. Estos experimentos indican que la activación de la  $\beta$ -catenina propicia un fenotipo pericentral, mientras que la inhibición de la vía Wnt/  $\beta$ -catenina promueve el establecimiento de un fenotipo periportal. Lo cual influye tanto en el establecimiento de la zonación metabólica y por ende para el manejo del amonio hepático.

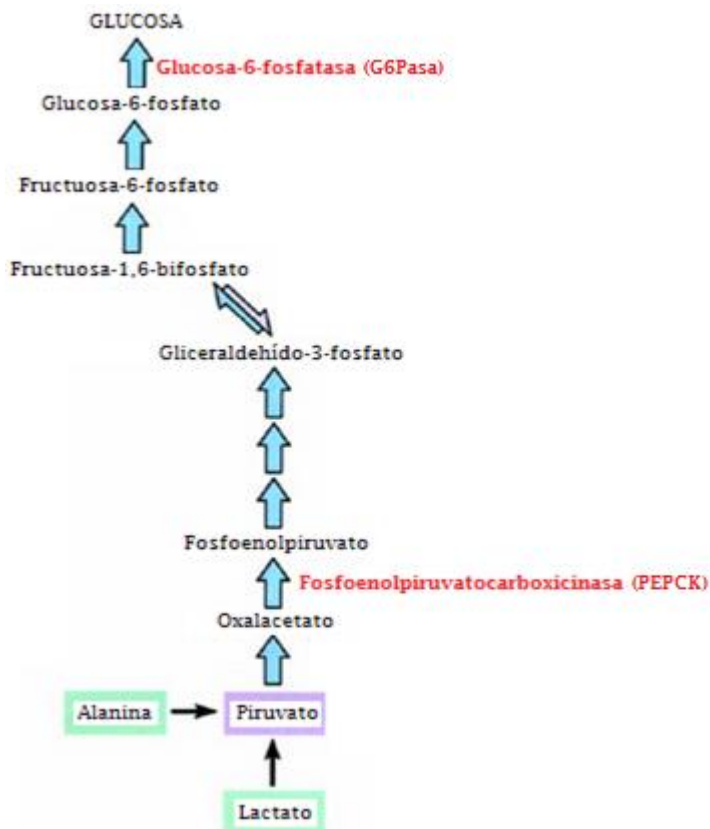
### **9.3 La $\beta$ -catenina y la gluconeogénesis hepática**

La gluconeogénesis (GNG) es una vía anabólica, en la cual se sintetiza glucosa a partir de intermediarios no glucocídicos como los aminoácidos (alanina) o algunos intermediarios metabólicos (glicerol, piruvato, lactato y oxaloacetato). Esta vía se lleva a cabo principalmente en el hígado y en menor grado en el riñón.

La GNG hepática mantiene los niveles de glucosa en sangre en rangos fisiológicos durante períodos prolongados de ayuno, lo cual asegura la demanda energética durante los ciclos de ayuno/alimentación. Si bien la vía gluconeogénica es catalizada por varias enzimas, 2 de ellas adquieren relevancia al ser las enzimas limitantes de esta ruta metabólica. Estas enzimas son la fosfoenol-piruvato carboxicinas (PEPCK) y la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa). Las cuales, se encuentran al inicio y al final de la vía, respectivamente (Figura 9).

La PEPCK cataliza la conversión de oxaloacetato a fosfoenolpiruvato, intermediario metabólico a partir del cual puede continuar la vía gluconeogénica. Por el otro lado, la G6Pasa cataliza la reacción de glucosa-6-fosfato a glucosa libre, la cual es liberada a la circulación para ser tomada por los tejidos. Tanto la PEPCK como la G6Pasa se encuentran reguladas transcripcionalmente por hormonas y otros factores de transcripción como forkhead (FOXO), sirtuina 1 (SIRT1), coactivadores transcripcionales como el coactivador

de PPAR gamma tipo 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) (Chakravarty et al., 2005; Xu et al., 2007) y proteínas reloj como REV-ERB $\alpha$ , CRY, BMAL-1 y CLOCK (Kennaway et al., 2007). Todos estos factores trabajan coordinadamente bajo condiciones de ayuno para permitir la expresión robusta de los genes que codifican para las enzimas PEPCK y G6Pasa en el hígado.



**Figura 9. La vía gluconeogénica simplificada.**

La gluconeogénesis hepática se caracteriza por la actividad de 4 enzimas distintivas, de las cuales 2 de ellas son las enzimas limitantes de la vía. Estas enzimas son la fosfoenolpiruvatocarboxinasa (PEPCK) y la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa), localizadas al inicio y al final de la vía gluconeogénica, respectivamente (letras rojas). Las flechas negras indican la incorporación de sustratos a la vía y las flechas azules indican la continuidad de las reacciones químicas de la vía, las cuales se han omitido.

En adición a los factores antes mencionados, la proteína  $\beta$ -catenina tiene un rol primordial en la regulación de la respuesta gluconeogénica. En experimentos *in vitro* con cultivos primarios de hepatocitos, una delección de  $\beta$ -catenina llevada a cabo a través de la enzima Cre-recombinasa reduce la abundancia del ARN mensajero (ARNm) de las enzimas PEPCK y G6Pasa. En tanto que, la sobreexpresión de  $\beta$ -catenina estimula la expresión de estas enzimas (Liu et al., 2011). Complementariamente a estos experimentos, los efectos *in vivo* de la  $\beta$ -catenina sobre la respuesta gluconeogénica son similares. Debido a que la delección de  $\beta$ -catenina reduce la expresión del ARNm de las enzimas PEPCK y G6Pasa y la sobreexpresión de  $\beta$ -catenina potencia la expresión de las enzimas anteriores (Liu et al., 2011). Adicionalmente, experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) mostraron un incremento en la unión de  $\beta$ -catenina y FOXO1 en los promotores de las enzimas G6Pasa y PEPCK, cuando los animales experimentales son sometidos a algunas horas de ayuno (Liu et al., 2011). Estos antecedentes indican una participación notable de la  $\beta$ -catenina en la GNG hepática.

Puesto que, tanto la presencia como la actividad enzimática de la G6Pasa y la PEPCK, así como algunos reguladores de la GNG (corticosterona) presentan un patrón rítmico (Pérez-Mendoza et al., 2014), se planteó la posibilidad de que la presencia de la  $\beta$ -catenina en el hepatocito fuera rítmica y que tuviera alguna relación con las proteínas reloj de este tejido. Esto nos llevo a explorar el vínculo entre la  $\beta$ -catenina y las proteínas reloj en otros tejidos y modelos experimentales como se aprecia a continuación.

#### **9.4 Relación de la $\beta$ -catenina y las proteínas reloj**

La relación entre la  $\beta$ -catenina y las proteínas reloj PER1 y PER2 (que conforman el asa de retroalimentación negativa del reloj molecular) viene de modelos experimentales de cáncer, tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*. En estos estudios, la regulación a la baja de las proteínas PERs, a través de un ARN pequeño de interferencia (siRNA) incrementa la expresión de la  $\beta$ -catenina (Wood, Xiaoming, and Hrushesky, 2009) y algunos de sus genes blanco como la ciclina D1 y c-myc. Ya que, la  $\beta$ -catenina promueve la inducción del complejo  $\beta$ -TrCP para degradar a PER1 y PER2 vía proteosomal (Yang et al., 2009). Por el contrario, la regulación a la baja de la  $\beta$ -catenina a través de un siRNA incrementa la expresión de PER2 en células de cáncer de colon humanas (Yang et al., 2009) y en la mucosa

del intestino delgado de ratones con mutaciones en APC ( $APC^{Min/+}$ ) (un regulador negativo de  $\beta$ -catenina). De manera interesante, en los animales  $APC^{Min/+}$  el ritmo diario de *Per1* presenta un cambio de fase (de la noche al día) y el ritmo de *Per2* conserva su fase de expresión, pero disminuye significativamente su amplitud (Yang et al., 2009).

En el caso de BMAL1 (integrante del asa de regulación positiva del reloj molecular), los ratones knockout para el gen de esta proteína ( $BMAL1^{-/-}$ ), presentan una disminución de los niveles de  $\beta$ -catenina respecto a los ratones silvestres (Guo et al., 2012). Lo anterior se debe a que BMAL1 actúa como un factor transcripcional de la  $\beta$ -catenina y de otros componentes de la vía Wnt canónica como Axina2, Wnt10a, Fzd5, Dvl2 y TCF3 (Guo et al., 2012).

Por otra parte, el mecanismo del reloj molecular y la vía Wnt/ $\beta$ -catenina tienen un punto de cruce en las proteínas cinasas CK1 y la GSK3 $\beta$ , las cuales modifican postraduccionalmente tanto a las proteínas reloj como a la  $\beta$ -catenina.

En el contexto de los ritmos circadianos, las cinasas mencionadas pueden determinar la localización subcelular, la estabilización, la heterodimerización y la degradación de las proteínas reloj (Gallego & Virshup, 2007). Mientras que, en la señalización de Wnt están involucradas en la degradación de  $\beta$ -catenina, principalmente.

Lo cual sugiere que la  $\beta$ -catenina podría tener un patrón rítmico en el hepatocito, como consecuencia de su relación con las proteínas reloj, así como por las funciones metabólicas en las que participa.

## 10. JUSTIFICACIÓN

Si bien, la proteína  $\beta$ -catenina tiene un papel fisiológico importante como regulador del metabolismo hepático y de la zonación metabólica, poco se conoce sobre el efecto que producen distintos patrones de alimentación, relativos a la respuesta gluconeogénica (como el ayuno) en la presencia y distribución celular de la  $\beta$ -catenina en el hepatocito.

Además, aunque genéricamente se habla de la proteína  $\beta$ -catenina, esta proteína presenta toda una dinámica celular, la cual se ve influenciada por distintas modificaciones postraduccionales como la fosforilación. Sin embargo, se desconoce si la  $\beta$ -catenina y 2 de sus formas fosforiladas implicadas en la degradación, como la  $\beta$ -catenina fosforilada en el residuo de serina 33 (pSer33  $\beta$ -catenina) y en la potenciación transcripcional, como la  $\beta$ -catenina fosforilada en el residuo de serina 675 (pSer675  $\beta$ -catenina), respectivamente, presentan una zonación metabólica en el acino hepático, ya que la  $\beta$ -catenina es un regulador importante de este fenómeno. Igualmente, puesto que la zonación metabólica es susceptible al ayuno, se desconoce si la zonación y la localización subcelular de las variantes de  $\beta$ -catenina varían en el hepatocito al cambiar el patrón de alimentación.

Adicionalmente, hay una influencia directa y recíproca entre los componentes del reloj molecular (PER1, PER2 y BMAL1) y la presencia de la  $\beta$ -catenina activa. Sin embargo, no se ha explorado si la  $\beta$ -catenina total o las 2 formas fosforiladas previamente mencionadas presentan un patrón de expresión circadiano en condiciones fisiológicas y si este podría variar bajo un horario diario de restricción de alimento (HRA).

Por lo tanto, este trabajo se centró en dilucidar la distribución subcelular y zonal de 2 variantes fosforiladas de la  $\beta$ -catenina y de la  $\beta$ -catenina total, así como sus patrones diarios de expresión en condiciones fisiológicas y bajo un HRA que promueve una sincronización por alimento.

## 11. HIPÓTESIS

- Las formas activas de la proteína  $\beta$ -catenina: la  $\beta$ -catenina total y la pSer675  $\beta$ -catenina), así como la forma fosforilada inactiva de la proteína (pSer33  $\beta$ -catenina) estarán zonadas a lo largo del acino hepático en función de su localización subcelular.
- El HRA incrementará el nivel de expresión de las proteínas  $\beta$ -catenina total y de la  $\beta$ -catenina que tiene una actividad transcripcional incrementada (pSer675  $\beta$ -catenina), pero disminuirá el nivel de expresión de la  $\beta$ -catenina marcada para su degradación (pSer33  $\beta$ -catenina) a lo largo de las 24 h del día.

## 12. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la distribución y el perfil de presencia diario de 2 formas fosforiladas de la proteína  $\beta$ -catenina (pSer33  $\beta$ -catenina y pSer675  $\beta$ -catenina), así como de la  $\beta$ -catenina total en el hígado de rata adulta y determinar si la modificación en el patrón diario de alimentación tiene alguna incidencia sobre ellos.

### 12.1 Objetivos específicos

- Determinar el perfil a lo largo de las 24 h del día en la presencia de la  $\beta$ -catenina total, de la pSer33  $\beta$ -catenina y de la pSer675  $\beta$ -catenina en diferentes fracciones subcelulares del hepatocito (homogenado total, citosol y núcleo) condiciones *Ad Libitum* y bajo un HRA.
- Determinar la presencia de las proteínas  $\beta$ -catenina total, pSer33  $\beta$ -catenina y pSer675  $\beta$ -catenina en el homogenado total y en las fracciones citosólica y nuclear del hepatocito durante un ayuno agudo de 22 h (Fa) y una realimentación aguda de 2 h posterior al ayuno simple (Rf).
- Determinar la localización subcelular de la  $\beta$ -catenina total, pSer33  $\beta$ -catenina y pSer675  $\beta$ -catenina en el hepatocito de rata en condiciones *Ad Libitum*, HRA, Fa y Rf.
- Determinar la distribución zonal de la  $\beta$ -catenina total, pSer33  $\beta$ -catenina y pSer675  $\beta$ -catenina en el acino hepático de rata en condiciones *Ad Libitum* y bajo un HRA.

## **13. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **13.1 Alojamiento de los animales y declaración ética**

Ratas macho de la cepa Wistar con un peso de  $200 \pm 20$  g al inicio del experimento fueron colocadas en grupos de 4 animales al interior de cajas de acrílico transparente (40 cm x 50 cm x 20 cm) para su aclimatación a las condiciones del laboratorio.

Los animales estuvieron en un ciclo luz-oscuridad 12:12 h (encendido de las luces a las 08:00 h), temperatura constante de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  y libre acceso al agua y al alimento (5001 rodent diet; Lab Diet, St Louis MO, USA) durante algunos días, antes de empezar el experimento.

Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México y conducidos de acuerdo a los estándares éticos internacionales reportados por (Portaluppi, Smolensky, & Touitou, 2010) y a los criterios dictados en la Norma Oficial Mexicana de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) clave NOM-062-ZOO-1999.

### **13.2 Grupos experimentales**

Los animales experimentales fueron asignados de manera arbitraria en 4 grupos diferentes, similares a los reportados previamente por (Ángeles-Castellanos et al., 2005; Davidson & Stephan, 1999b) y que se describen a continuación:

- 1) Grupo *Ad Libitum* (AL), el cual tuvo libre acceso al alimento y al agua a lo largo de un período de 24 h.
- 2) Grupo con un horario diario de restricción de alimento (HRA), en el cual los animales tuvieron acceso al alimento únicamente por 2 h al día (12:00-14:00 h), durante su fase de reposo (fase de luz).

La duración de los protocolos 1 y 2 fue de 3 semanas, al término de las cuales los animales fueron procesados para la obtención de muestras. La toma de muestras inició a las 08:00 h, a partir de lo cual las muestras siguientes fueron tomadas en intervalos de 3 h a lo largo de las 24 h del día.

Para descartar la posibilidad de que los efectos observados en el grupo HRA fueran debidos al ciclo diario de ayuno (22 h) y realimentación (2 h), se incluyeron 2 grupos



experimentales adicionales que sirvieron como controles de la condición alimenticia.

Estos grupos fueron:

- 3) Grupo con ayuno agudo de 22 h (Fa), en el cual los animales tuvieron libre acceso al alimento por 3 semanas para posteriormente ser deprivados de alimento por las siguientes 21 h. Una vez que los animales finalizaron sus 21 h de ayuno, lo cual ocurría a las 11:00 h, los animales fueron procesados para la obtención de muestras.
- 4) Grupo con realimentación aguda de 2 h (Rf), en el cual los animales tuvieron libre acceso al alimento por 3 semanas para posteriormente ser deprivados de alimento por las siguientes 21 h. Una vez finalizadas las 21 h de ayuno, los animales fueron realimentados de manera aguda por 2 h (de 12:00-14:00 h). Al término de la realimentación (14:00 h) los animales fueron procesados para la obtención de muestras.

Reportes previos del laboratorio han probado la efectividad del protocolo HRA a través de diversas adaptaciones fisiológicas y metabólicas como la aparición de la AAA, el cambio de fase de las proteínas reloj PER1 (Báez-Ruiz et al., 2013; Luna-Moreno et al., 2009) y BMAL1 (Arellanes-Licea et al., 2014) en el hígado de rata y la variación diaria de los niveles de la corticosterona sérica (Báez-Ruiz et al., 2013; Luna-Moreno et al., 2009).

### **13.3 Fraccionamiento subcelular**

Los animales experimentales se procesaron utilizando una guillotina para consecutivamente disectar el hígado. Muestras de tejido hepático de 5 g de peso fueron procesadas inmediatamente a 4 °C en buffer de homogenización (225 mM sucrosa, 0.3 mM EGTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) con un homogeneizador de vidrio-teflón Potter-Elvehjem a 40 rpm por 20 s. El homogenado total obtenido fue centrifugado (centrífuga Sorvall SS34) a 1,500 g por 15 min. El botón resultante de esta primera centrifugación se aisló usando el método del ácido cítrico (Reiners & Busch, 1980), con lo que se colectó la fracción nuclear. Por otro lado, el sobrenadante de esta primera centrifugación fue decantado y centrifugado a 10,000 g por 20 min para obtener la fracción mitocondrial del pellet (la cual se descartó) y la fracción citosólica del sobrenadante, cuando este último se ultracentrifugó (ultracentrífuga Beckman, rotor 70 Ti) a 100,000 g por 70 min (Aguilar-Delfín, López-Barrera, & Hernández-Muñoz,

1996). Todas las fracciones subcelulares obtenidas fueron alícuotadas y almacenadas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### **13.4 Western Blot**

El homogenado total, así como las fracciones citosólica y nuclear se emplearon para determinar el perfil diario (24 h) de las proteína  $\beta$ -catenina total,  $\beta$ -catenina fosforilada en el residuo de serina 33 (pSer33  $\beta$ -catenina) y la  $\beta$ -catenina fosforilada en el residuo de serina 675 (pSer675  $\beta$ -catenina) utilizando la técnica de Western blot.

La proteína soluble total (PST) fue cuantificada por el método de Bradford (Bradford, 1976). Cantidades equivalentes de PST fueron mezcladas con el buffer de muestra Laemmli 2X (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) e incubadas a  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 min. Posteriormente, fueron cargadas en un gel de poliacrilamida al 10% y separadas por una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) en condiciones reductoras y desnaturalizantes. Subsecuentemente, los geles fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa y estas se bloquearon por 1 h con leche sin grasa preparada al 5%. La leche fue lavada con Buffer Salino de Tris y Tween 20, pH 7.5 (TBST) 3 veces por 5 min cada vez. Consecutivamente, las membranas se incubaron toda la noche a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  con los siguientes anticuerpos primarios diluïdos en TBST: anti  $\beta$ -catenina de conejo (ab 32572), dilución 1:5000; anti (phospho S33)  $\beta$ -catenina (ab 73153) (Abcam, Cambridge, MA, USA), dilución 1:30,000 y anti  $\beta$ -catenina (Ser 675) (D2F1, Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA), dilución 1:1000. El día siguiente las membranas fueron lavadas con TBST e incubadas por 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario burro anti-conejo acoplado a fosfatasa alcalina (sc2083, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), dilución 1:5000. Las bandas de proteína fueron reveladas empleando el kit del sustrato para el conjugado de fosfatasa alcalina (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). La proteína  $\beta$ -tubulina se utilizó como un control de carga para el homogenado total y la fracción citosólica, para evidenciarla se utilizó el anticuerpo contra  $\beta$ -tubulina (ab 56676) (Abcam, Cambridge, MA, USA) a una dilución 1:1000. Por otra parte, la proteína de carga empleada para la fracción nuclear fue la lámina B1 y el anticuerpo utilizado para verla fue el anticuerpo contra lámina B1 (ab 184115) (Abcam, Cambridge, MA, USA) a una dilución 1:10,000.

La cuantificación de las proteínas de interés fue realizada por un análisis densitométrico usando el software Image J [National Institutes of Health (NIH), USA] (Abràmoff et al., 2004).

### **13.5 Inmunofluorescencia**

El tejido hepático se fijó en formalina al 10% durante 1 semana a 4 °C, con cambios de fijador cada 2 días. Luego, fue embebido en parafina para formar bloques, de los cuales se obtuvieron cortes de 7 µm que se montaron en portaobjetos electrocargados. Los cortes fueron desparafinados por 2 h a 60 °C en un horno de aire caliente, para luego ser rehidratados en un tren de los siguientes solventes: xilol al 100% (10 min), etanol al 100% (5 min), etanol al 96% (5 min), etanol al 80% (5 min) y agua desionizada (10 min). Enseguida los cortes se bañaron en buffer de permeabilización (3.9 mM citrato de sodio, Tween 20 al 0.1%) por 8 min, se lavaron con TBST 5 min y se hirvieron en buffer de EDTA (1 mM EDTA, Tween 20 al 0.05%, pH 8.0) por 1h a 96 °C para exponer el antígeno. Una vez que los cortes se atemperaron, se bloquearon con leche sin grasa al 1%, se lavaron 3 veces con TBST (5 min por vez) y se incubaron toda la noche a 4 °C con alguno de los anticuerpos siguientes diluïdos en TBST: anti β-catenina de conejo (ab 32572), dilución 1:100; anti (phospho S33) β-catenina (ab 73153) (Abcam, Cambridge, MA, USA), dilución 1:100 y anti β-catenina (Ser 675) (D2F1, Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA), dilución 1:100. Al otro día, los cortes se lavaron 3 veces con TBST (5 min/vez) y se incubaron por 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario burro anti-conejo IgG Alexa Fluor 594 (Invitrogen Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA), dilución 1:500. Ulteriormente, los cortes fueron lavados 3 veces con TBST (5 min/vez) y se volvieron a bloquear con leche sin grasa al 1%, durante 1 h. Se volvieron a lavar 3 veces con TBST (5 min/vez) y se incubaron toda la noche a 4 °C con el segundo anticuerpo primario el anti glutamina sintetasa (GS) de mouse (MAB302, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA), dilución 1:300, el anti (phospho S33) β-catenina (ab 73153) (Abcam, Cambridge, MA, USA), dilución 1:100 o el anti β-catenina (Ser 675) (D2F1, Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA), dilución 1:100. Finalmente, los cortes se lavaron 3 veces con TBST (5 min/vez) y se incubaron por 2 h a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo secundario burro anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 (A21202) o el burro anti-conejo IgG Alexa Fluor 488 (A21206)

(Invitrogen Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA), ambos dilución 1:300. La señal fluorescente fue visualizada tanto en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse E600, Minato, Japan) como con un microscopio confocal (Zeiss Axiovert 200 LSM 510 Meta-Multiphotonic, Oberkochen, Germany) y cuantificada con el software Image J [National Institutes of Health (NIH), USA] (Abràmoff et al., 2004).

### **13.6 Análisis de datos**

Los datos obtenidos fueron agrupados tanto por su condición experimental como por el horario en el que se colectaron y fueron expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). El número de muestras en cada punto temporal fue de al menos 4 animales experimentales. Los resultados se compararon utilizando una ANOVA de 1 y 2 vías para determinar el efecto del horario y de los tratamientos, respectivamente. Las diferencias significativas fueron detectadas a través de las pruebas *post hoc* de Tukey o de Sidak ( $p < 0.05$ ). Adicionalmente, un análisis cronobiológico fue realizado utilizando el programa Chronos Fit, donde los parámetros a tomar en cuenta fueron la acrofase, el mesor, la amplitud y el porcentaje de ritmicidad.

Por último, una prueba t de Student fue realizada para identificar las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos de condición alimenticia y la restricción diaria de alimento de la siguiente manera: ayuno agudo de 22 h (Fa) vs realimentación aguda de 2h (Rf), Fa vs HRA a las 11:00 h y Rf vs HRA a las 14:00 h.

Tanto las gráficas de los resultados como los análisis estadísticos fueron hechos en el software GraphPad Prism versión 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

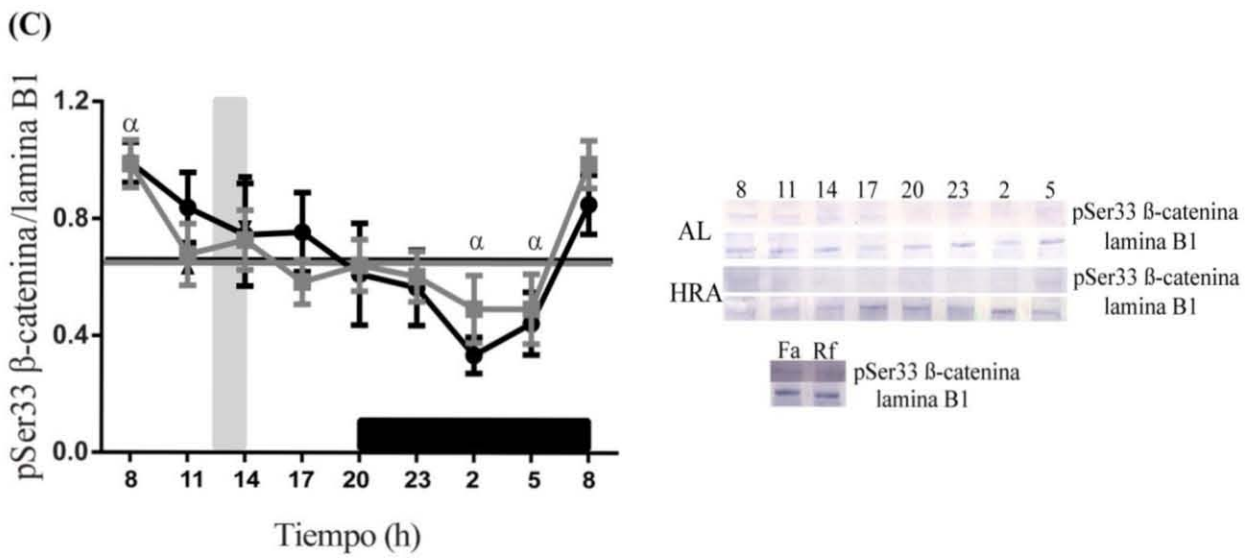
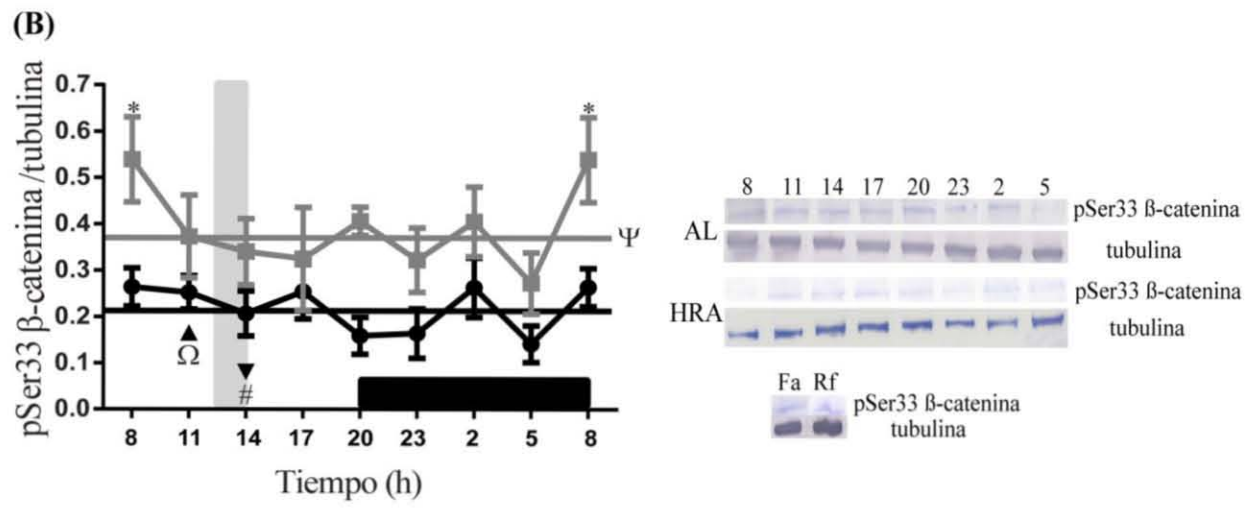
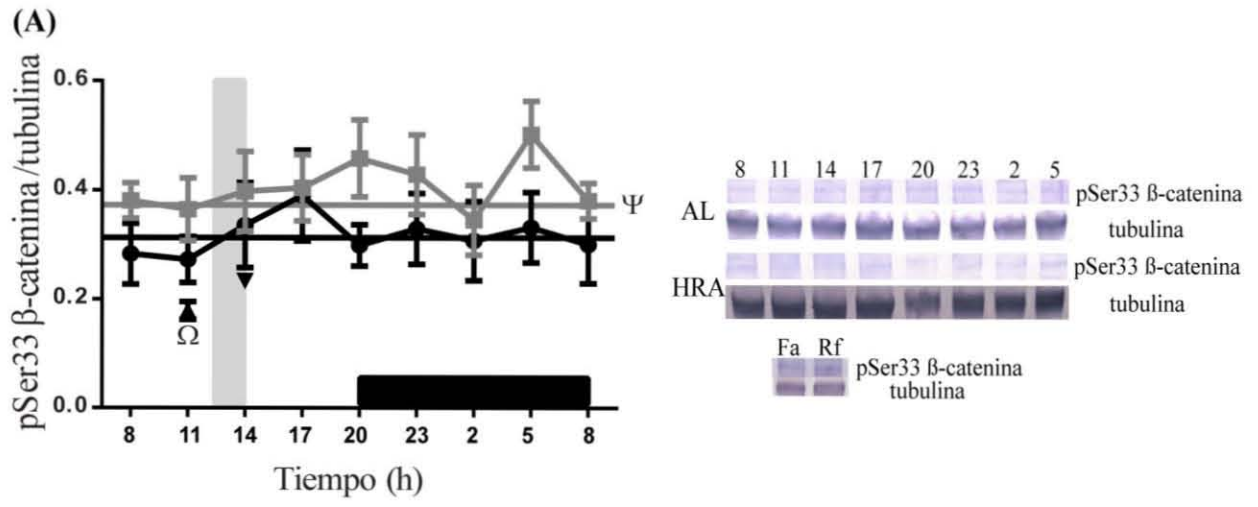
## 14. RESULTADOS

Inicialmente en nuestro protocolo experimental evaluamos el perfil diario de expresión (24 h) de las proteínas pSer33  $\beta$ -catenina (cuya fosforilación es una marca para su degradación), de la pSer675  $\beta$ -catenina (cuya fosforilación potencia su actividad transcripcional) y de la  $\beta$ -catenina total.

### 14.1 El horario diario de restricción de alimento (HRA) disminuyó el nivel medio de expresión de la pSer 33 $\beta$ -catenina

El perfil diario de expresión de la proteína pSer33  $\beta$ -catenina en las diferentes fracciones subcelulares hepáticas se muestra en la Figura 10. Los grupos AL y HRA mostraron una presencia constante de la proteína pSer33  $\beta$ -catenina durante el período de 24 h en el homogenado total y en la fracción citosólica hepática (Figura 10A-B). En la fracción citosólica, el grupo AL a las 08:00 h presentó una diferencia estadísticamente significativa (ANOVA de 2 vías, horas del día:  $F[1,48]=23.85$ ,  $p<0.0001$ ) en comparación al grupo HRA en el mismo punto temporal. Sin embargo, el nivel medio de expresión de la pSer33  $\beta$ -catenina en el grupo HRA disminuyó un 16% en el homogenado total y un 42% en la fracción citosólica, respectivamente. En la fracción nuclear, ambos grupos (AL y HRA) disminuyeron gradualmente su expresión de pSer33  $\beta$ -catenina del inicio de la fase de luz (08:00 h) a la primer mitad de la fase de oscuridad (02:00 h), lo cual fue estadísticamente significativo (ANOVA de 1 vía, grupo AL:  $F[7,32]=2.74$ ,  $p=0.02$ ; grupo HRA:  $F[7,32]=2.74$ ,  $p=0.02$ ), pero no se ajustó a un perfil rítmico al ser evaluado por un análisis cronobiológico (Figura 10C).

En el caso de los controles de alimentación, la expresión de la pSer33  $\beta$ -catenina en los grupos Fa y el HRA a las 11:00 h fue similar en todas las fracciones probadas. Mientras que, la expresión de la pSer33  $\beta$ -catenina en los grupos Rf y HRA a las 14:00 h fue semejante en el homogenado total y en la fracción nuclear, no así en la fracción citosólica, donde la expresión de la pSer33  $\beta$ -catenina en el grupo Rf con respecto al grupo HRA disminuyó un 61%. Conjuntamente, en el homogenado total, la expresión de la pSer33  $\beta$ -catenina en el grupo Fa disminuye un 23% al compararse con el grupo Rf. En contraste, la expresión de la pSer33  $\beta$ -catenina en el grupo Rf de la fracción citosólica aminoró su expresión un 51% con respecto al grupo Fa (Figuras 10A-C).



**Figura 10. Perfil diario de expresión de la proteína pSer33  $\beta$ -catenina en el hígado de rata, en un protocolo de restricción diaria de alimento (HRA).**

Análisis por Western Blot de la proteína pSer33  $\beta$ -catenina en el homogenado total (A), la fracción citosólica (B) y la fracción nuclear (C) hepáticas. Cada valor se normalizó contra las proteínas de carga tubulina (para A y B) y lamina B1 (para C). Se muestra un Western Blot representativo de cada condición. Cuadrados grises=grupo AL, círculos negros=grupo HRA, triángulos= grupo Fa, triángulo invertido=grupo Rf. Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM (n=4-5 animales diferentes por cada punto temporal). Las líneas horizontales representan el promedio de los datos en el ciclo de 24 h. La barra vertical de color gris indica el horario de acceso restringido al alimento (12:00-14:00 h). El rectángulo negro en el eje de las abscisas representa las 12 h de la fase de oscuridad. <sup>ψ</sup>Diferencia estadísticamente significativa entre los grupos AL y HRA en el promedio de 24 h (t de Student, p<0.05). \*Diferencia estadísticamente significativa entre los grupos AL y HRA en el mismo punto temporal (ANOVA de 2 vías, seguida de una prueba post hoc de Sidak, p<0.0001). <sup>α</sup>Diferencia estadísticamente significativa entre los puntos temporales del mismo grupo experimental (ANOVA de 1 vía, seguida de una prueba post hoc de Tukey, p<0.0001). <sup>Ω</sup>Diferencia estadísticamente significativa entre los grupos Fa y Rf (prueba t de Student, p<0.05).

#Diferencia estadísticamente significativa entre los grupos HRA (a las 11:00 o 14:00 h) y los grupos Fa o Rf (prueba t de Student, p<0.05).

**14.2 El horario diario de restricción de alimento (HRA) incrementó la presencia nuclear de la pSer675  $\beta$ -catenina**

El patrón diario de expresión de la proteína pSer675  $\beta$ -catenina fue evaluado en diferentes compartimentos subcelulares del hígado tanto en el grupo AL como en el HRA (Figura 11). En el homogenado total, el grupo AL mostró una disminución en la expresión de pSer675  $\beta$ -catenina a lo largo de la fase de luz (de 08:00 a 20:00 h), la cual se incrementó gradualmente en la fase de oscuridad (de 20:00-08:00 h), alcanzando un pico de expresión a las 05:00 h (Figura 11A) (ANOVA de 1 vía, horas del día F [7,32]=5.08, p=0.0006). Lo que favoreció un patrón rítmico de 24 h en la expresión de la pSer675  $\beta$ -catenina cuyo pico o acrofase se presentó a las 04:55 h (Tabla 4). Por el contrario, la expresión de pSer675  $\beta$ -catenina en el grupo HRA se mantuvo constante a lo largo del día.

En la fracción citosólica, la expresión de la pSer675  $\beta$ -catenina del grupo AL fue mayor durante la fase de oscuridad que durante la fase luminosa (Figura 11B). Mientras que en el grupo HRA la expresión de la proteína fosforilada fue constante a lo largo del día. Sin

embargo, el nivel medio de expresión de la pSer675  $\beta$ -catenina en las 24 h del día en el grupo AL manifestó una elevación del 21% en comparación al grupo HRA.

En la fracción nuclear, tanto el grupo AL como el HRA mostraron una expresión constante de la pSer675  $\beta$ -catenina durante el período de 24 h. No obstante, el nivel medio de expresión de la pSer675  $\beta$ -catenina a lo largo de las 24 h del día en el grupo HRA se incrementó un 21% respecto al grupo AL (Figura 11C).

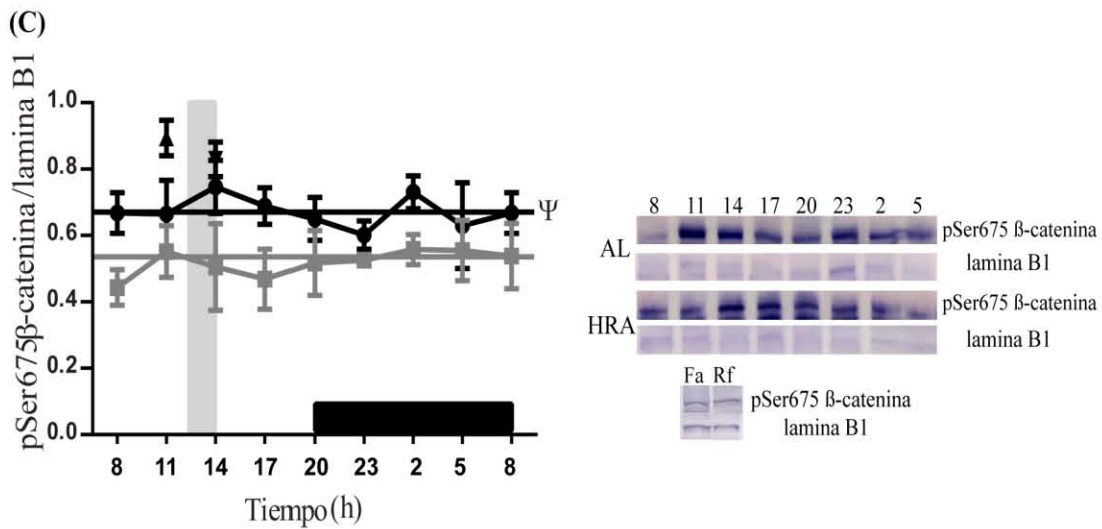
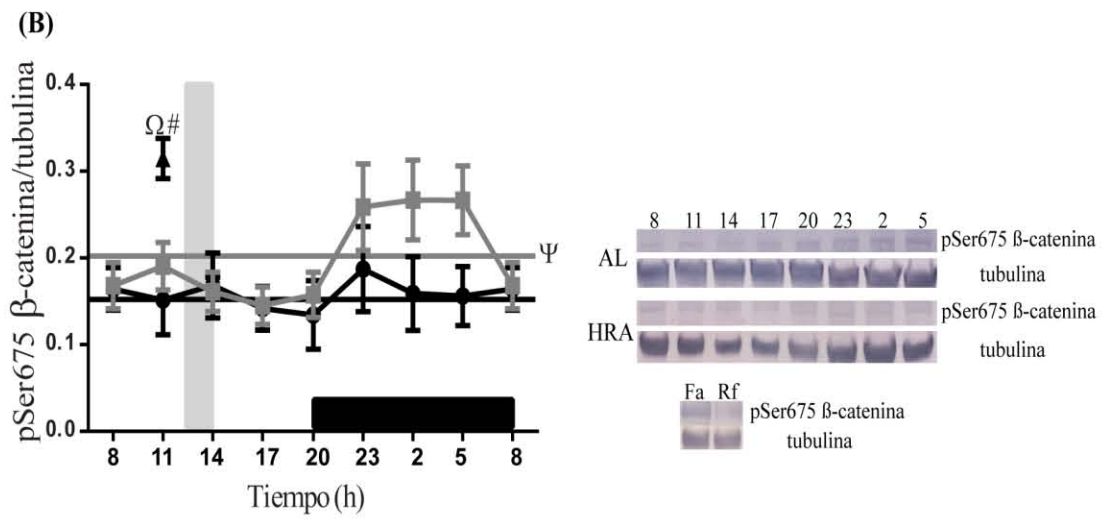
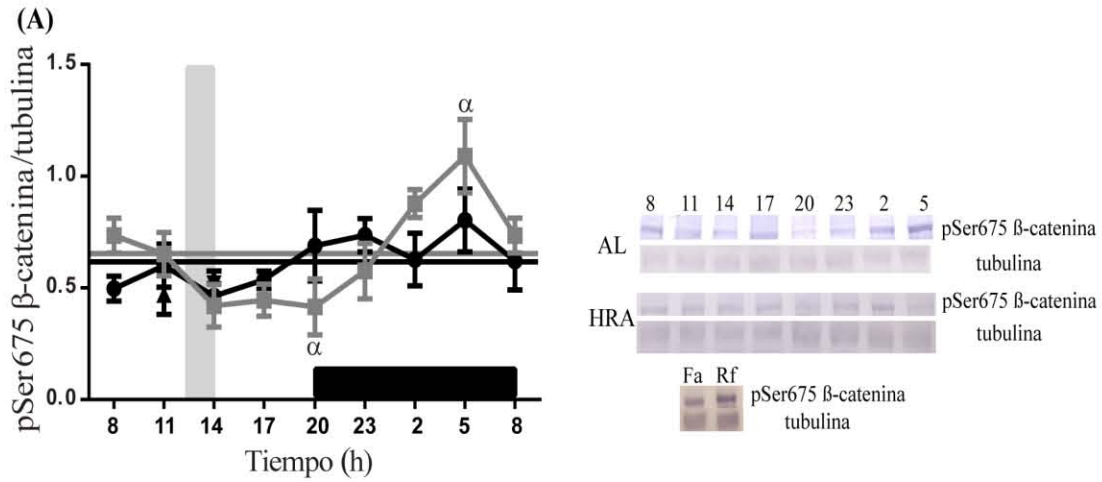
En los grupos Fa y Rf, la expresión de la pSer675  $\beta$ -catenina en el homogenado total y la fracción nuclear fue similar a la que presentó el grupo HRA a las 11:00 y 14:00 h, en esos mismos compartimentos subcelulares. Inversamente, la expresión de la pSer675  $\beta$ -catenina en el grupo Fa de la fracción citosólica se elevó un 52% respecto al grupo HRA a las 11:00 h y un 50% en relación al grupo Rf.

	MESOR	Amplitud	Acrofase (horas:minutos)	% Ritmicidad
pSer675				
$\beta$ -catenina	0.65±0.24	0.30	4:55	87.43

**Tabla 4. Análisis cronobiológico de la expresión de la pSer675  $\beta$ -catenina en el homogenado hepático total del grupo AL.**

El análisis en CHRONOS-FIT permitió evaluar la ritmicidad diaria de la proteína pSer675  $\beta$ -catenina. La amplitud representa la diferencia entre el pico o el valle de una señal rítmica y su valor medio (mesor). La acrofase indica la hora a la cual se presentó el pico de expresión de la pSer675  $\beta$ -catenina. La existencia de un patrón rítmico se determinó debido al alto porcentaje de ritmicidad que presentó la proteína de interés (87.43%). Cabe mencionar que antes de realizar el análisis cronobiológico, se determinó si el perfil diario de la proteína presentaba un pico o un valle, lo cual se infirió a través de una ANOVA de 1 vía.





**Figura 11. Perfil diario de expresión de la proteína pSer675  $\beta$ -catenina en el hígado de rata, en un protocolo de restricción diaria de alimento (HRA).**

Análisis por Western Blot de la proteína pSer675  $\beta$ -catenina en el homogenado total (A), la fracción citosólica (B) y la fracción nuclear (C) hepáticas. Cada valor se normalizó contra las proteínas de carga tubulina (para A y B) y lamina B1 (para C). Se muestra un Western Blot representativo de cada condición. Cuadrados grises=grupo AL, círculos negros=grupo HRA, triángulos= grupo Fa, triángulo invertido=grupo Rf. Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM (n=4-5 animales diferentes por cada punto temporal). Las líneas horizontales representan el promedio de los datos en el ciclo de 24 h. La barra vertical de color gris indica el horario de acceso restringido al alimento (12:00-14:00 h). El rectángulo negro en el eje de las abscisas representa las 12 h de la fase de oscuridad. <sup>Ψ</sup>Diferencia estadísticamente significativa entre los grupos AL y HRA en el promedio de 24 h (t de Student, p<0.05). <sup>□</sup>Diferencia estadísticamente significativa entre los puntos temporales del mismo grupo experimental (ANOVA de 1 vía, seguida de una prueba post hoc de Tukey, p<0.05). <sup>Ω</sup>Diferencia estadísticamente significativa entre los grupos Fa y Rf (prueba t de Student, p<0.05). <sup>#</sup> Diferencia estadísticamente significativa entre los grupos HRA (a las 11:00 o 14:00 h) y los grupos Fa o Rf (prueba t de Student, p<0.05).

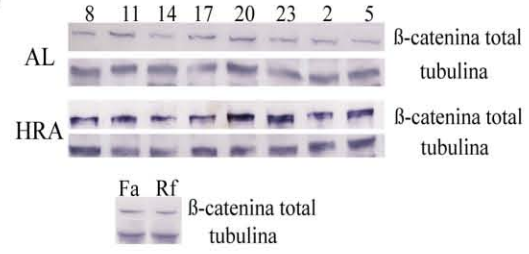
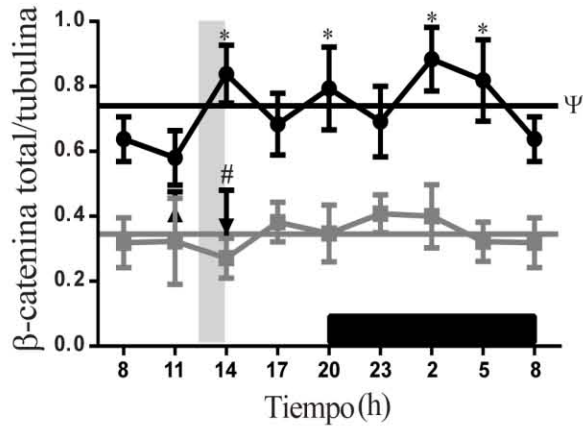
En la estructura de la proteína  $\beta$ -catenina existen al menos 20 sitios distintos de fosforilación (Valenta et al., 2012), los cuales son diferentes a los que nosotros probamos (Ser33 y Ser675). Por lo tanto, el paso siguiente en el proyecto fue discriminar el efecto del HRA sobre la forma total de la  $\beta$ -catenina ( $\beta$ -catenina total). Esto nos daría un panorama general de cómo las diversas formas fosforiladas y no fosforiladas de la  $\beta$ -catenina, se estarían comportando bajo el reto alimenticio que se les impone. Además, nos brindaría información para contextualizar la relevancia funcional de las fosforilaciones previamente evaluadas (Ser33 y Ser675) que se sabe tienen un rol específico en la transducción de la señal de la  $\beta$ -catenina.

### **14.3 El horario diario de restricción de alimento (HRA) aumentó la presencia de la $\beta$ -catenina total**

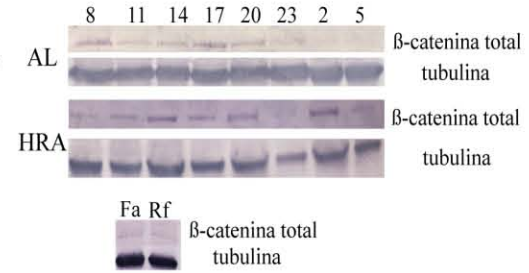
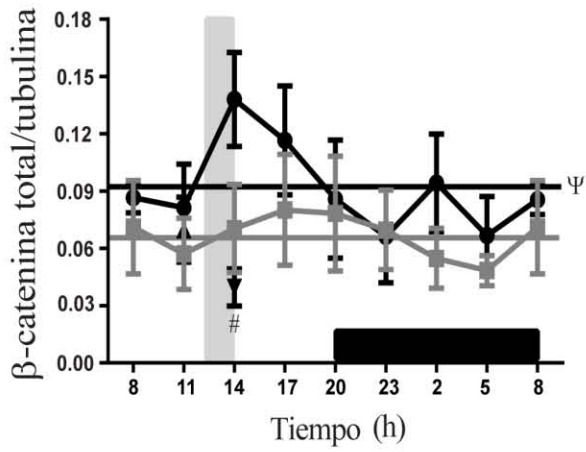
La figura 12 muestra el patrón diario de expresión de la proteína  $\beta$ -catenina total en los diferentes compartimentos subcelulares del hepatocito de rata, en condiciones AL y de HRA. El grupo AL exhibió una expresión constante de la  $\beta$ -catenina total a lo largo del período de 24 h en todas las fracciones evaluadas. En tanto que, el grupo HRA presentó variaciones en la expresión de la  $\beta$ -catenina total a lo largo del día, las cuales no fueron significativas. Además, en el grupo HRA los perfiles diarios de expresión de la  $\beta$ -catenina total no tuvieron un patrón rítmico. Sin embargo, el protocolo de restricción de alimento promovió el incremento en el nivel medio de expresión de la  $\beta$ -catenina total a lo largo de las 24 h del día como sigue: Un 113% de aumento en el homogenado total (Figura 12A), un 39% de elevación en la fracción citosólica (Figura 12B) y un alza del 75% en la fracción nuclear (Figura 12C). Dichos incrementos en la expresión de la  $\beta$ -catenina total fueron mayores durante la fase de luz, cuando los animales del grupo HRA tienen acceso al alimento. Aunado a lo anterior, en el grupo HRA del homogenado total, la expresión de la  $\beta$ -catenina total mostró diferencias temporales respecto al grupo AL a las 14:00, 20:00, 02:00 y 05:00 h (ANOVA de 2 vías, horas del día,  $F [1,88]=69.56$ ,  $p<0.0001$ ) (Figura 12A).

En el caso de los controles de la condición alimenticia, en el grupo Fa la expresión de la  $\beta$ -catenina total en las 3 fracciones probadas fue parecida al grupo HRA (11:00 h). Opuestamente, en el grupo Rf la expresión de la  $\beta$ -catenina total fue semejante al grupo HRA (14:00 h) sólo en la fracción nuclear. En esta última fracción, la expresión de la  $\beta$ -catenina total en el grupo Fa respecto al grupo Rf fue estadísticamente significativa (prueba t de Student,  $p<0.05$ ). Por otra parte, en el homogenado total y en la fracción citosólica hepática, la expresión de la  $\beta$ -catenina total en el grupo Rf disminuyó en comparación al grupo HRA a las 14:00 h (prueba t de Student,  $p<0.05$ ) (Figuras 12A-B).

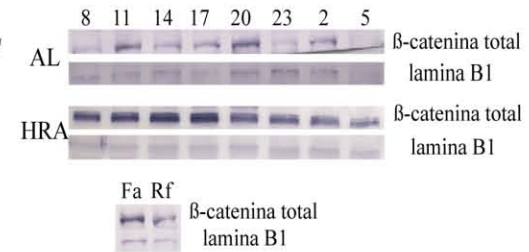
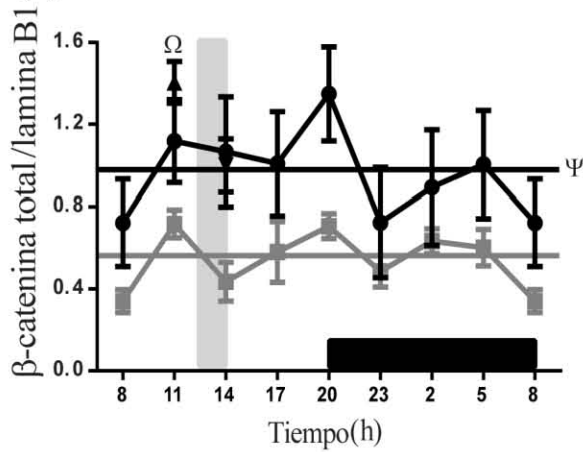
(A)



(B)



(C)



**Figura 12. Perfil diario de expresión de la proteína  $\beta$ -catenina total en el hígado de rata, en un protocolo de restricción diaria de alimento (HRA).**

Análisis por Western Blot de la proteína  $\beta$ -catenina total en el homogenado (A), la fracción citosólica (B) y la fracción nuclear (C) hepáticas. Cada valor se normalizó contra las proteínas de carga tubulina (para A y B) y lamina B1 (para C). Se muestra un Western Blot representativo de cada condición. Cuadrados grises=grupo AL, círculos negros=grupo HRA, triángulos= grupo Fa, triángulo invertido=grupo Rf. Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM (n=5-7 animales diferentes por cada punto temporal). Las líneas horizontales representan el promedio de los datos en el ciclo de 24 h. La barra vertical de color gris indica el horario de acceso restringido al alimento (12:00-14:00 h). El rectángulo negro en el eje de las abscisas representa las 12 h de la fase de oscuridad. <sup>¶</sup>Diferencia estadísticamente significativa entre los grupos AL y HRA en el promedio de 24 h (t de Student, p<0.05). <sup>Ω</sup>Diferencia estadísticamente significativa entre los grupos Fa y Rf (prueba t de Student, p<0.05). <sup>#</sup> Diferencia estadísticamente significativa entre los grupos HRA (a las 11:00 o 14:00 h) y los grupos Fa o Rf (prueba t de Student, p<0.05).

La proteína  $\beta$ -catenina en la célula tiene una función dual, ya que actúa tanto como un factor transcripcional y como un elemento estructural. Esta última función, debido a que forma las uniones adherentes entre células (AJ). De este modo, el paso subsiguiente en el proyecto fue complementar las observaciones sobre la localización subcelular de las variantes fosforiladas de la  $\beta$ -catenina (pSer33  $\beta$ -catenina y pSer675  $\beta$ -catenina) y de  $\beta$ -catenina total, así como su posible colocalización en el hepatocito. Además de evaluar cómo la hora del día y las condiciones alimenticias (grupos HRA, Fa y Rf) influyen dicha localización. Tal evaluación se realizó por una inmunohistoquímica sencilla o doble en condiciones Fa y Rf, así como en 3 puntos temporales diferentes a lo largo de las 24 h del día. Los primeros 2 puntos temporales evaluados son de importancia en el protocolo HRA y se presentan en la fase de luz, estos son a las 11:00 h (antes de que los animales experimentales coman y donde se presenta la AAA) y a las 14:00 h (cuando los animales experimentales terminaron de comer). El tercer punto temporal evaluado fue durante la fase de oscuridad, a las 02:00 h, donde los animales del grupo AL presentan una mayor actividad motora y de forrajeo.

#### **14.4 El horario diario de restricción de alimento (HRA) incrementó la localización de la $\beta$ -catenina total en la membrana plasmática del hepatocito**

En todos los horarios de los grupos AL y HRA, la  $\beta$ -catenina total se localizó en la membrana plasmática del hepatocito (Figura 13A), mientras que sólo en algunos horarios su presencia fue citosólica. La cuantificación de la señal fluorescente de la  $\beta$ -catenina total en la membrana plasmática del hepatocito mostró una presencia similar de la proteína en todos los puntos temporales del grupo AL. Por el contrario, en el grupo HRA hubo una mayor presencia de la  $\beta$ -catenina total a las 11:00 y 14:00 h respecto a los mismos horarios del grupo AL (Figura 13B). En contraste, los grupos Fa y Rf tuvieron la menor presencia de la  $\beta$ -catenina total en la membrana plasmática del hepatocito (Figura 13B).

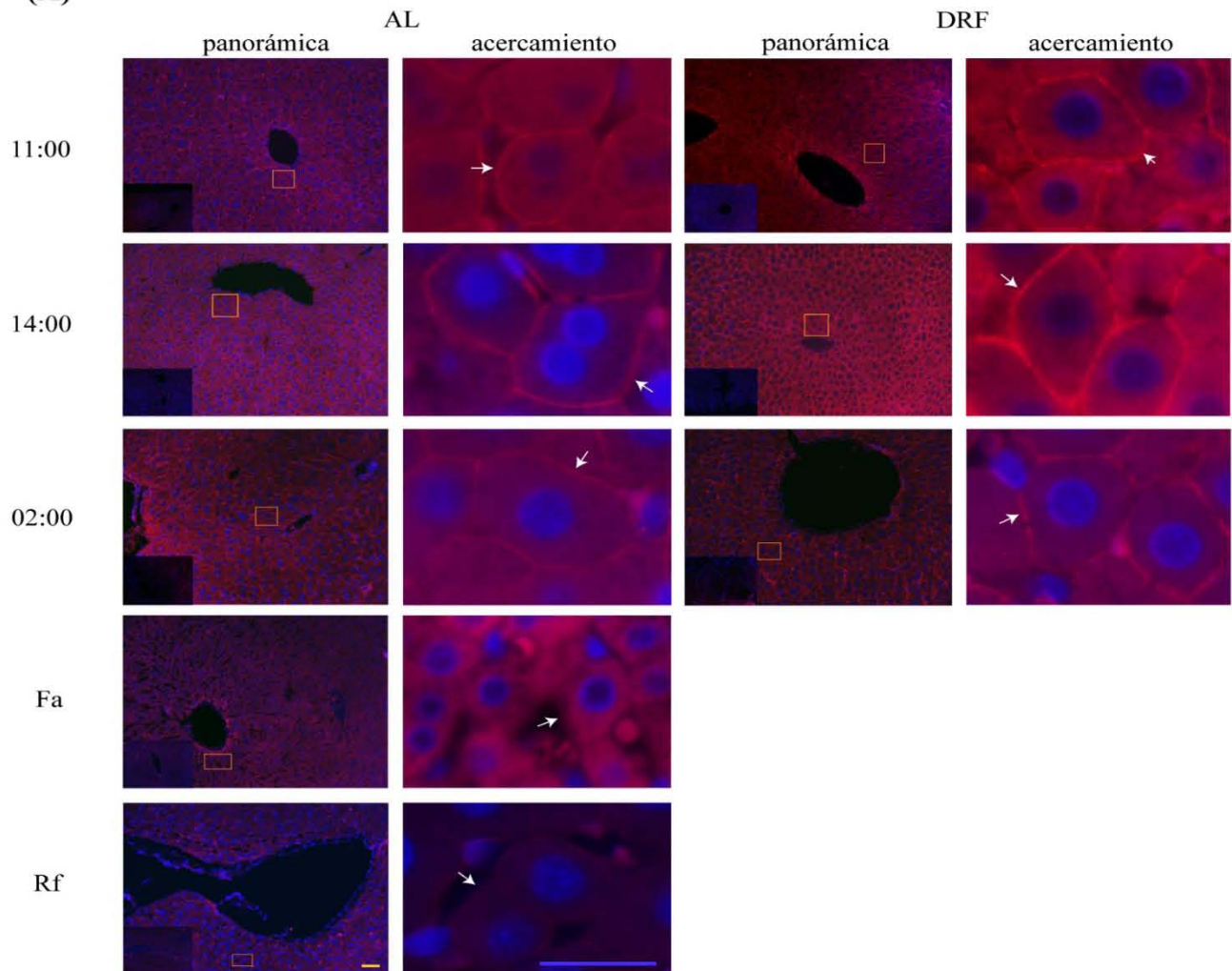
Reportes previos de nuestro grupo de trabajo han mostrado que en los tratamientos experimentales (el HRA, y el Fa) hay una oscilación en el tamaño de los hepatocitos de acuerdo a la hora del día y a la condición alimenticia (Díaz-Muñoz et al., 2010). Asimismo, se ha observado que la regulación a la alta de la  $\beta$ -catenina produce hepatomegalia (Reed et al., 2008) y que en el grupo HRA a las 14:00 h existe un incremento en las proteínas claudina 1 y la cadherina 22 (datos no publicados), las cuales se encuentran en las uniones celulares. Lo anterior nos hizo preguntarnos si existía alguna correlación entre la presencia de la  $\beta$ -catenina total en la membrana plasmática y el tamaño de los hepatocitos. Esto fue determinado al medir el diámetro de los hepatocitos en los diferentes tratamientos y horarios establecidos.

Cabe señalar que en dicha determinación, sólo los hepatocitos con un núcleo celular evidente, el cual fue marcado con 4'-6 diamino-2-fenilindol (DAPI) fueron considerados para el análisis morfométrico. Los resultados revelaron un diámetro constante (aproximadamente 20.5  $\mu$ m) en los hepatocitos del grupo AL en los 3 horarios probados (Figura 13C). En contraste, hubo una fluctuación en el diámetro de los hepatocitos del grupo HRA que inició con una disminución del 12% a las 11:00 h. Posteriormente, hubo un aumento del diámetro del hepatocito hasta su tamaño original (similar al grupo AL) a las 14:00 h y finalmente una reducción del diámetro del hepatocito en un 5% a las 02:00 h.

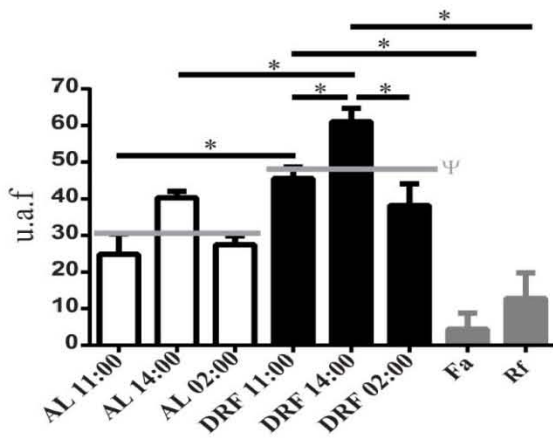
En los grupos Fa y Rf el diámetro del hepatocito disminuyó un 23% a las 11:00 h y un 12% a las 14:00 h, respectivamente, en comparación al grupo HRA en los mismos horarios. Por

lo que al comparar los grupos Fa y Rf entre ellos, sus diámetros difirieron significativamente (Figura 13 C).

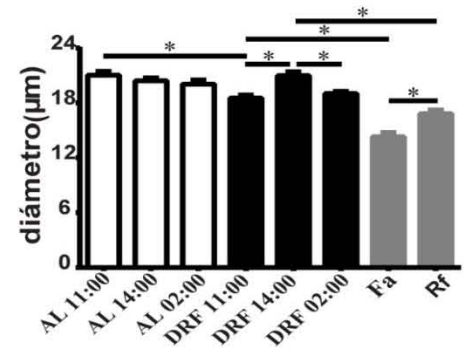
(A)



(B)



(C)



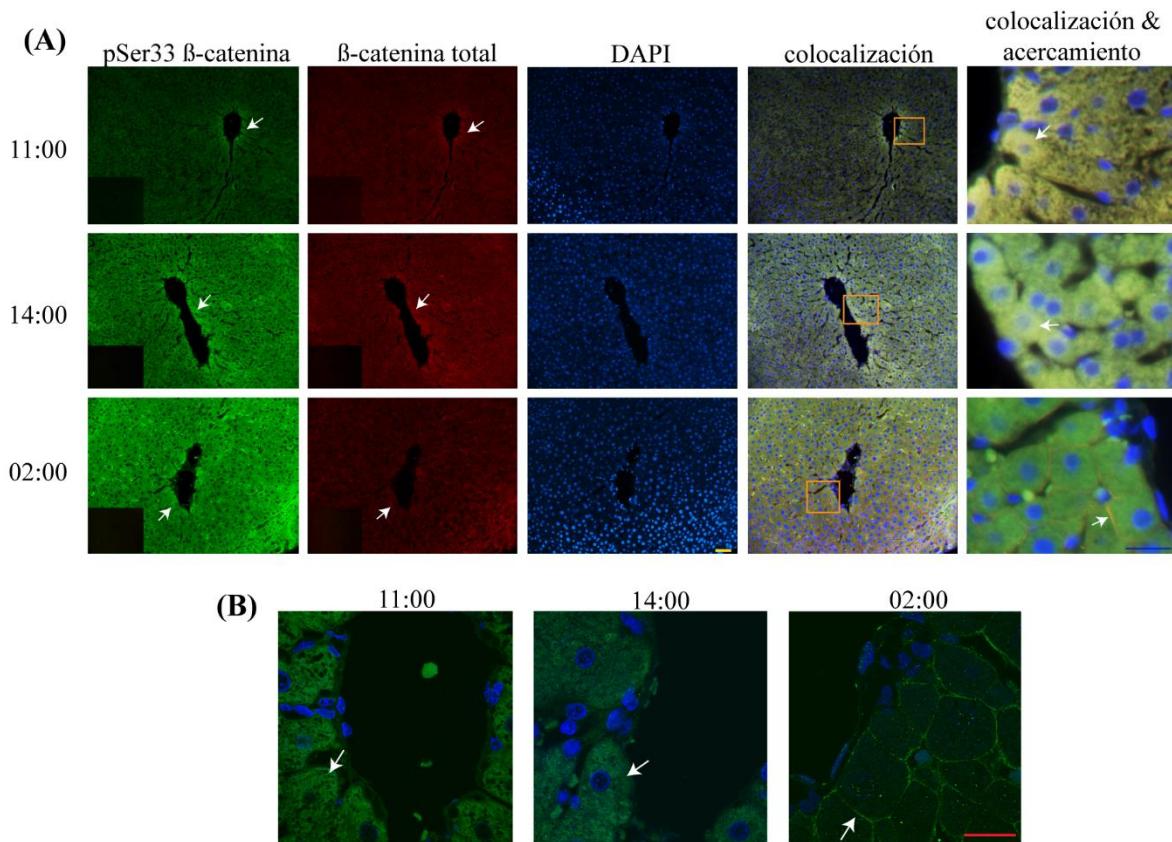
**Figura 13. Localización de la proteína  $\beta$ -catenina total en la membrana plasmática del hepatocito de rata, en un protocolo de restricción diaria de alimento (HRA).**

(A) Señal inmunofluorescente de la  $\beta$ -catenina total en condiciones Fa y Rf, así como en 3 puntos temporales diferentes: antes de que los animales experimentales coman y cuando se presenta la actividad anticipatoria al alimento (AAA) (11:00 h), después de la AAA y de que los animales experimentales han comido (14:00 h) y a la mitad del período de oscuridad (02:00 h), donde los animales AL presentan su mayor actividad. Se muestran una fotografía panorámica (barra de calibración amarilla = 50  $\mu$ m) y un acercamiento (barra de calibración azul = 25  $\mu$ m) de esta, indicado por el recuadro anaranjado. Un control negativo (anticuerpo primario omitido) se muestra en la esquina inferior izquierda de las fotografías panorámicas. Los histogramas indican la cuantificación de (B) la presencia de la  $\beta$ -catenina total en la membrana del hepatocito (n=3 animales/punto temporal) y (C) el diámetro del hepatocito en los horarios mencionados anteriormente, en los grupos AL (barras blancas), HRA (barras negras), Fa y Rf (barras grises) (n=200 hepatocitos/punto temporal). Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM. La línea horizontal en color gris sobre las barras del histograma representa el promedio de los 3 horarios de los grupos AL y HRA.  $\Psi$  Diferencia estadísticamente significativa entre los grupos AL y HRA en el promedio de 24 h (t de Student, p<0.05). \* Diferencia estadísticamente significativa entre los grupos AL y Rf en el mismo punto temporal (prueba t de Student, p<0.05). u.a.f= unidades arbitrarias de fluorescencia.



### 14.5 La transición luz-oscuridad enriqueció la presencia de la pSer33 $\beta$ -catenina en la membrana plasmática del hepatocito.

Durante de la fase de luz (11:00 y 14:00 h), los grupos AL y el HRA presentaron una localización citosólica de la pSer33  $\beta$ -catenina, la cual colocalizó con la proteína  $\beta$ -catenina total (Figura 14A-B y 14A-B). A pesar de ello, la distribución subcelular de ambas formas de la  $\beta$ -catenina cambió en la fase de oscuridad (02:00 h) del citosol a la membrana plasmática del hepatocito (Figura 14A-B y 14A-B).



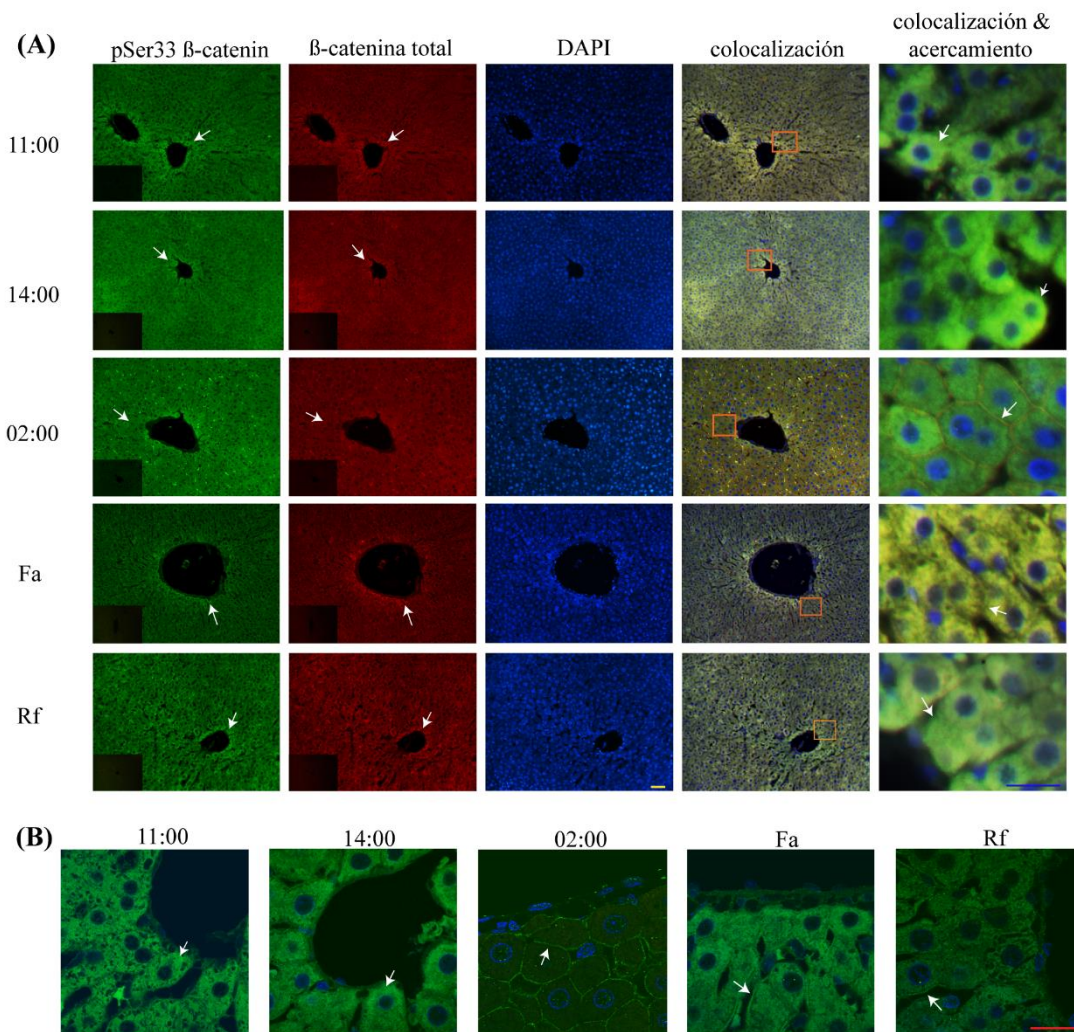
**Figura 14. Localización celular de la pSer33  $\beta$ -catenina en el hígado de rata en condiciones AL y su colocalización con la  $\beta$ -catenina total.**

(A) Señal inmunofluorescente de la pSer33  $\beta$ -catenina (verde), la  $\beta$ -catenina total (rojo) y DAPI (azul) en 3 horarios diferentes en condiciones AL. Se muestra una fotografía panorámica (barra de calibración amarilla = 50  $\mu$ m) y un acercamiento de la misma (barra de calibración azul = 25  $\mu$ m) indicado por el recuadro anaranjado (n=3 animales diferentes/punto temporal). Se colocó un control negativo (anticuerpo primario omitido) en la esquina inferior izquierda de las fotografías panorámicas. (B) Fotografías representativas de cada punto temporal, donde se muestra a mayor

detalle (microscopía confocal) la localización subcelular de la pSer33  $\beta$ -catenina (verde) (barra de calibración roja = 20  $\mu$ m).

### 14.5.1 El ciclo de ayuno agudo (Fa)-realimentación (Rf) propició la localización de la pSer33 $\beta$ -catenina en la membrana plasmática del hepatocito

Similar a los grupos AL y HRA, la presencia de la pSer33  $\beta$ -catenina en los animales con un Fa y una Rf colocalizó con la proteína  $\beta$ -catenina total en el citosol de los hepatocitos. Sin embargo, también favoreció la localización de la pSer33  $\beta$ -catenina en la membrana plasmática del hepatocito (Figura 15A-B).



**Figura 15. Localización celular de la pSer33  $\beta$ -catenina en el hígado de rata bajo las condiciones HRA y Fa-Rf, así como su colocalización con la  $\beta$ -catenina total.**

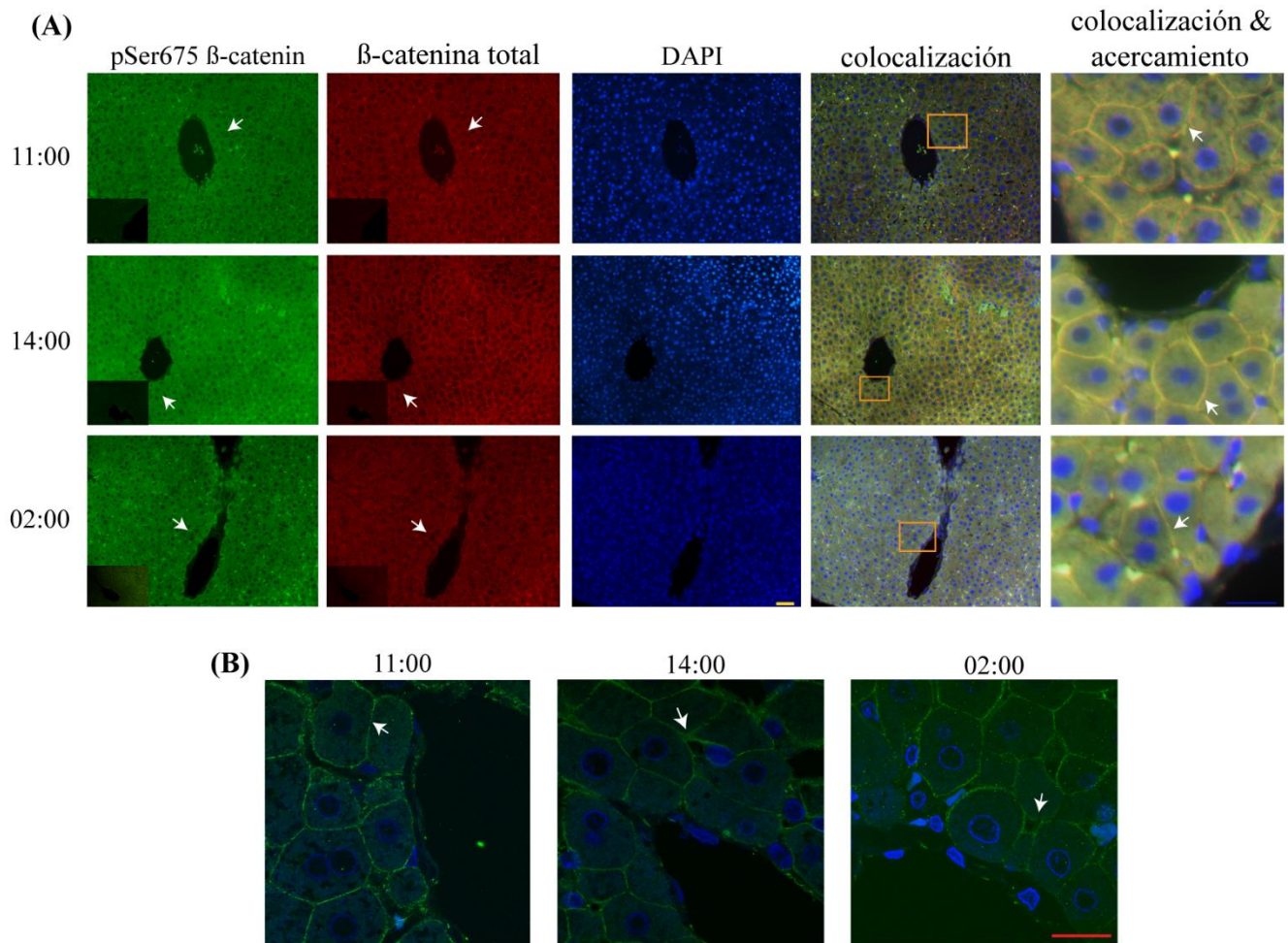
(A) Señal inmunofluorescente de la pSer33  $\beta$ -catenina (verde), la  $\beta$ -catenina total (rojo) y DAPI (azul) en condiciones HRA y Fa-Rf. Se muestra una fotografía panorámica (barra de calibración amarilla = 50  $\mu$ m) y un acercamiento de la misma (barra de calibración azul = 25  $\mu$ m) indicado por el recuadro anaranjado (n=3 animales diferentes/punto temporal). Un control negativo (anticuerpo primario omitido) se presenta en la esquina inferior izquierda de las fotografías panorámicas. (B) Fotografías representativas de cada condición alimenticia y sus puntos temporales, donde se muestra a mayor detalle (microscopía confocal) la localización subcelular de la pSer33  $\beta$ -catenina (verde) (barra de calibración roja = 20  $\mu$ m).

**14.6 El horario diario de restricción de alimento (HRA) disminuyó la localización de la pSer675  $\beta$ -catenina en la membrana plasmática del hepatocito.**

En todos los horarios (11:00, 14:00 y 02:00 h) de los grupos AL y HRA la localización subcelular de la pSer675  $\beta$ -catenina fue principalmente membranal y colocalizó con la  $\beta$ -catenina total (Figuras 16A-B y 16A-B). No obstante, en el grupo HRA a las 14:00 h la pSer675  $\beta$ -catenina también se ubicó en el citoplasma de los hepatocitos que circundan a la vasculatura hepática (muy probablemente la vena central). La cuantificación de la señal fluorescente de la pSer675  $\beta$ -catenina en la membrana celular del hepatocito evidenció una disminución del 43% en el valor promedio de los 3 horarios del grupo HRA en comparación al grupo AL (Figura 17C).

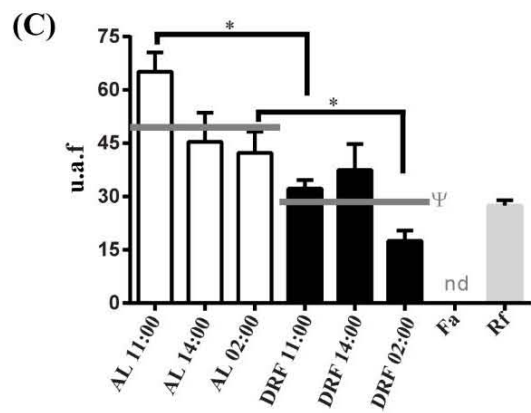
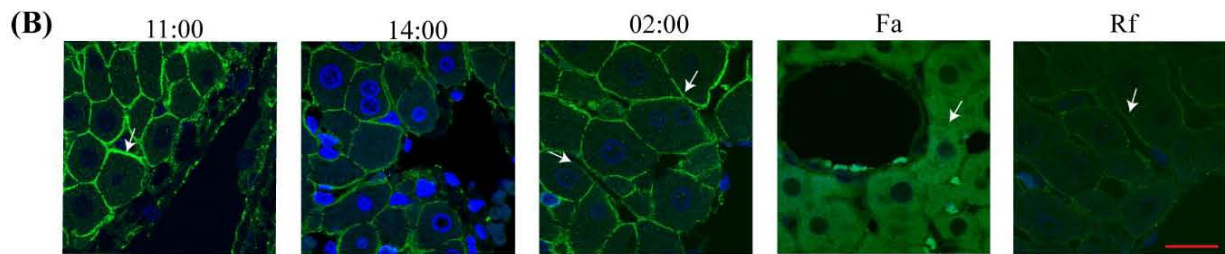
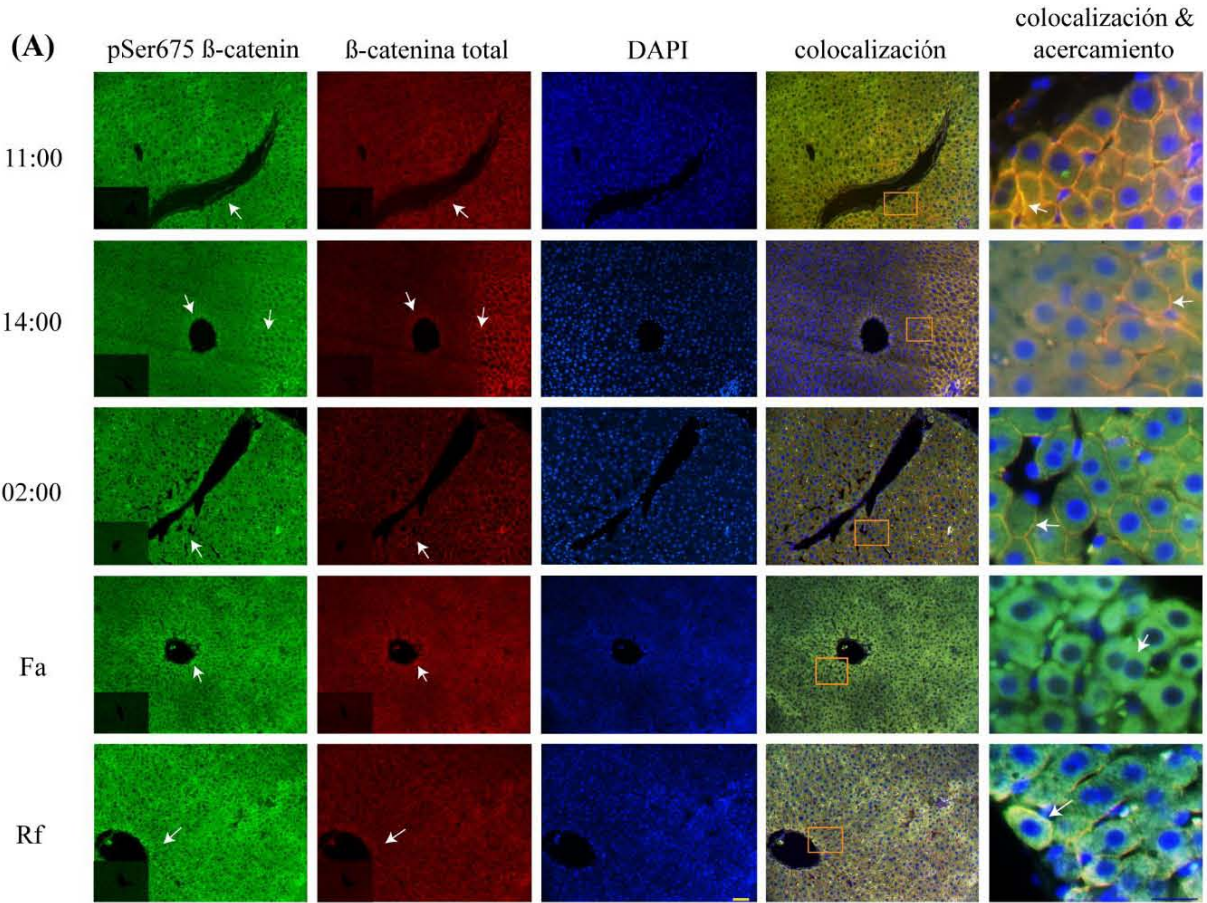
Por su parte, en los controles de condición alimenticia la localización de la pSer675  $\beta$ -catenina fue citoplasmática para el grupo Fa, pero sufrió una relocalización hacia la membrana plasmática en el grupo Rf. En ambos casos, la ubicación de la pSer675  $\beta$ -catenina mantuvo su colocalización con la  $\beta$ -catenina total (Figura 16A y 17A).





**Figura 16. Localización celular de la pSer675  $\beta$ -catenina en el hígado de rata en condiciones AL y su colocalización con la  $\beta$ -catenina total.**

(A) Señal inmunofluorescente de la pSer675  $\beta$ -catenina (verde), la  $\beta$ -catenina total (rojo) y DAPI (azul) en condiciones AL. Se muestra una fotografía panorámica (barra de calibración amarilla = 50  $\mu$ m) y un acercamiento de la misma (barra de calibración azul = 25  $\mu$ m) indicado por el recuadro anaranjado (n=3 animales diferentes/punto temporal). Un control negativo (anticuerpo primario omitido) se presenta en la esquina inferior izquierda de las fotografías panorámicas. (B) Fotografías representativas de cada punto temporal, donde se muestra a mayor detalle (microscopía confocal) la colocalización subcelular de la pSer675  $\beta$ -catenina (verde) (barra de calibración roja = 20  $\mu$ m).



**Figura 17. Localización celular de la pSer675  $\beta$ -catenina en el hígado de rata bajo las condiciones HRA y Fa-Rf, así como su colocalización con la  $\beta$ -catenina total.**

(A) Señal inmunofluorescente de la pSer675  $\beta$ -catenina (verde), la  $\beta$ -catenina total (rojo) y DAPI (azul) en condiciones de HRA y Fa-Rf. Se muestra una fotografía panorámica (barra de calibración amarilla = 50  $\mu$ m) y un acercamiento de la misma (barra de calibración azul = 25  $\mu$ m) indicado por el recuadro anaranjado (n=3 animales diferentes/punto temporal). Un control negativo (anticuerpo primario omitido) se presenta en la esquina inferior izquierda de las fotografías panorámicas. (B) Fotografías representativas de cada punto temporal, donde se muestra a mayor detalle (microscopía confocal) la localización subcelular de la pSer675  $\beta$ -catenina (verde) (barra de calibración roja = 20  $\mu$ m). (C) Presencia membranal de la pSer675  $\beta$ -catenina en el hepatocito de rata, en los horarios mencionados anteriormente para los grupos AL (barras blancas), HRA (barras negras), Fa y Rf (barras grises) (n=3 animales/punto temporal). Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM. La línea horizontal en color gris sobre las barras del histograma representa el promedio de los 3 horarios evaluados en los grupos AL y HRA. <sup>‡</sup>Diferencia estadísticamente significativa entre los grupos AL y HRA en el promedio de 24 h (t de Student, p<0.05). \*Diferencia estadísticamente significativa entre los grupos AL y HRA en el mismo punto temporal (prueba t de Student, p<0.05). u.a.f= unidades arbitrarias de fluorescencia, nd= no detectada.

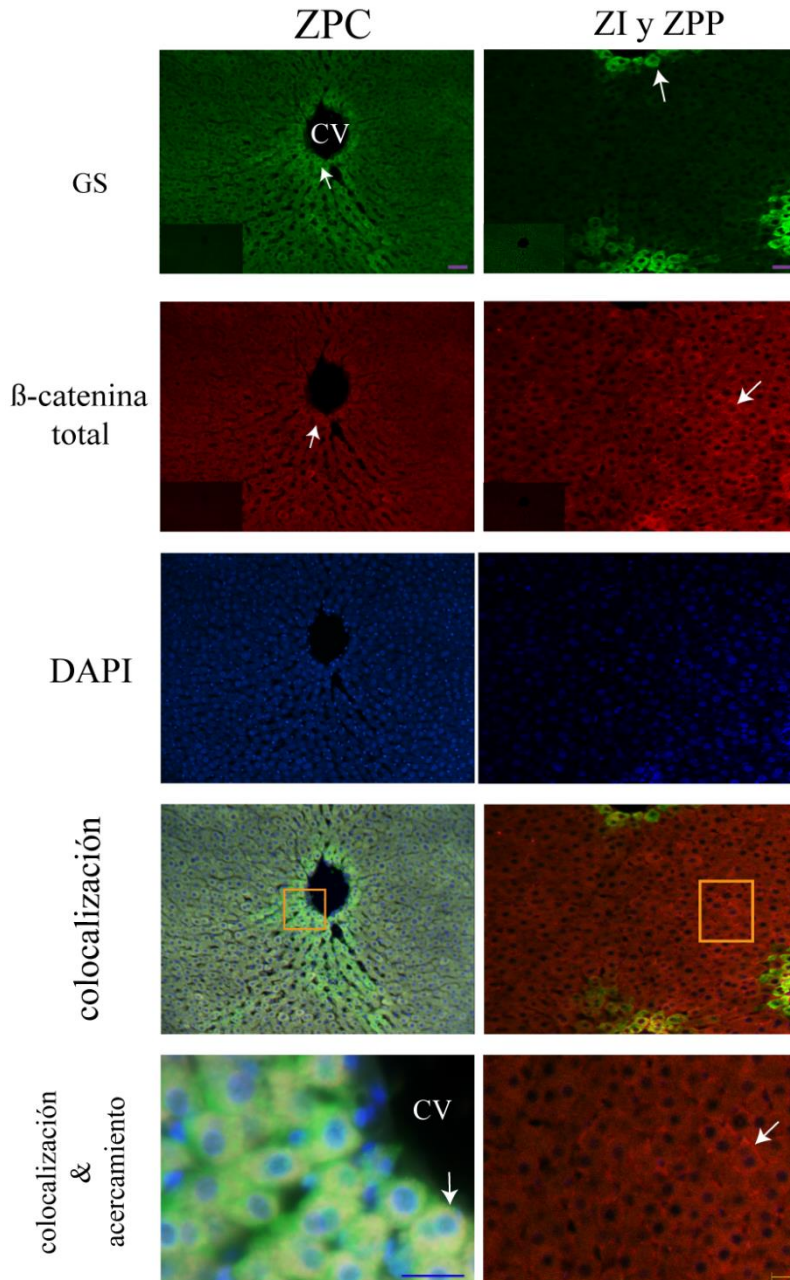
Hasta el momento, los resultados de inmunohistoquímica han demostrado que 2 variantes fosforiladas de la  $\beta$ -catenina (pSer33  $\beta$ -catenina y pSer675  $\beta$ -catenina), así como la  $\beta$ -catenina total tienen una localización subcelular distintiva en el hepatocito. La cual, depende tanto de la hora del día como de la condición alimenticia. Además, se vió que la localización de las formas de  $\beta$ -catenina en un mismo horario puede variar entre los hepatocitos, como en el caso de las Figuras 15 y 17. Esto nos llevó a preguntarnos si las 3 formas de  $\beta$ -catenina estudiadas estaban zonadas en el acino hepático. Ya que, reportes previos han mostrado que algunas variantes de la  $\beta$ -catenina difieren entre los hepatocitos centrales y los portales (Benhamouche et al., 2006; Monga, 2014).

Para responder la pregunta anterior, una doble inmunohistoquímica fue llevada a cabo para cada variante fosforilada de la  $\beta$ -catenina y la enzima GS, la cual es el marcador de referencia para la zona central del acino hepático.

#### **14.7 Zonación metabólica de las variantes de la $\beta$ -catenina**

En todos los horarios evaluados (11:00, 14:00 y 02:00) tanto del grupo AL como del HRA, así como en los grupos Fa y Rf la distribución de las distintas formas de la  $\beta$ -catenina en el acino hepático de rata fue la siguiente: Una localización citoplasmática de la  $\beta$ -catenina total y la pSer675  $\beta$ -catenina en los hepatocitos pericentrales (HPC), pero una ubicación membranal de las mismas formas de  $\beta$ -catenina en los hepatocitos de la zona intermedia (ZI) y la zona portal (Figura 18). Por el contrario, la pSer33  $\beta$ -catenina se delimitó a la membrana plasmática y el citosol de los HPC. Ya que su presencia no fue observada ni en los hepatocitos de la ZI, ni en los hepatocitos periportales (HPP) (Figura 19).

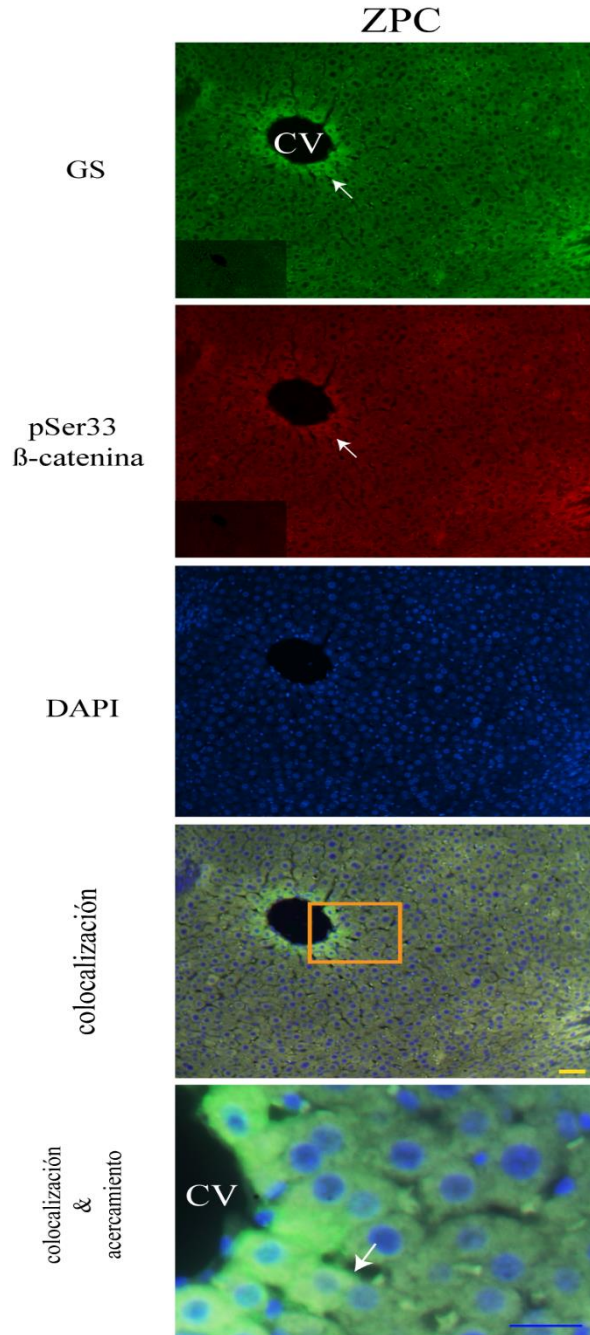




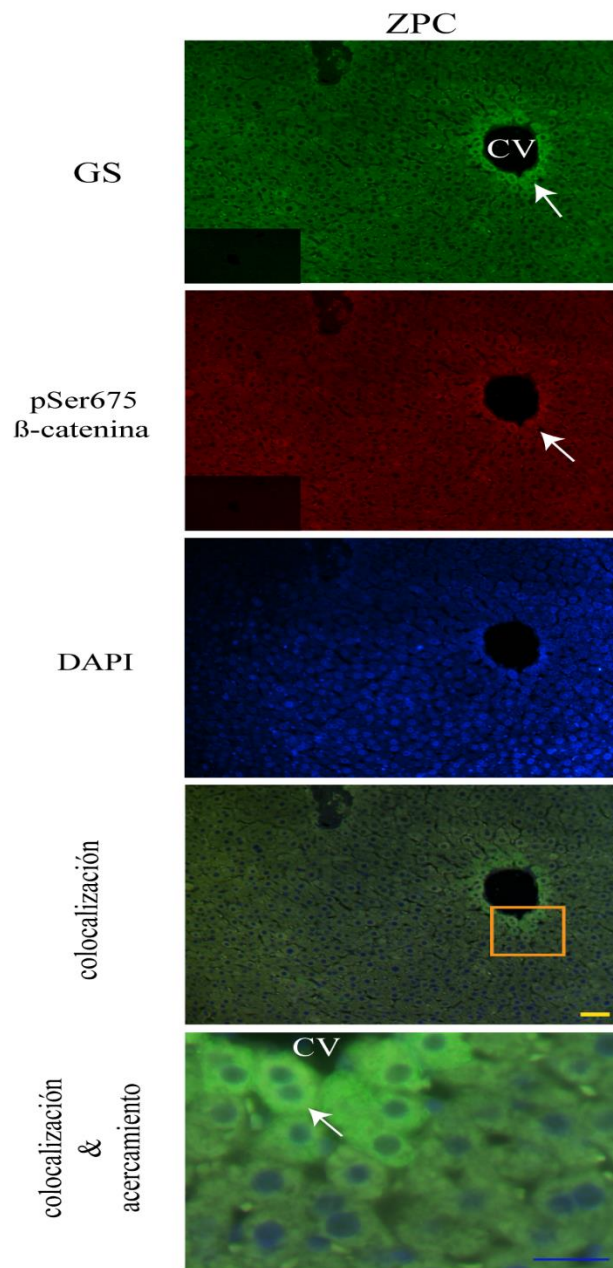
**Figura 18. Distribución zonal de la  $\beta$ -catenina total en el acino hepático de rata.**

Señal inmunofluorescente para la GS (verde), la  $\beta$ -catenina total (rojo) y DAPI (azul). Se presenta una fotografía panorámica (barra de calibración morada = 50  $\mu$ m) y un acercamiento de la misma (barra de calibración azul = 25  $\mu$ m y barra de calibración amarilla = 20  $\mu$ m) indicado por el recuadro anaranjado (n=3 animales diferentes). Un control negativo (anticuerpo primario omitido) se presenta en la esquina inferior izquierda de las fotografías panorámicas. ZPC = zona pericentral; ZI = zona intermedia; ZPP = zona periportal; CV = vena central hepática.





**Figura 19. Distribución zonal de la pSer33  $\beta$ -catenina en el acino hepático de rata.** Señal inmunofluorescente para la GS (verde), la pSer33  $\beta$ -catenina (rojo) y DAPI (azul). Se presenta una fotografía panorámica (barra de calibración morada = 50  $\mu$ m) y un acercamiento de la misma (barra de calibración azul = 25  $\mu$ m y barra de calibración amarilla = 20  $\mu$ m) indicado por el recuadro anaranjado (n=3 animales diferentes). Un control negativo (anticuerpo primario omitido) se presenta en la esquina inferior izquierda de las fotografías panorámicas. ZPC = zona pericentral; CV = vena central hepática.



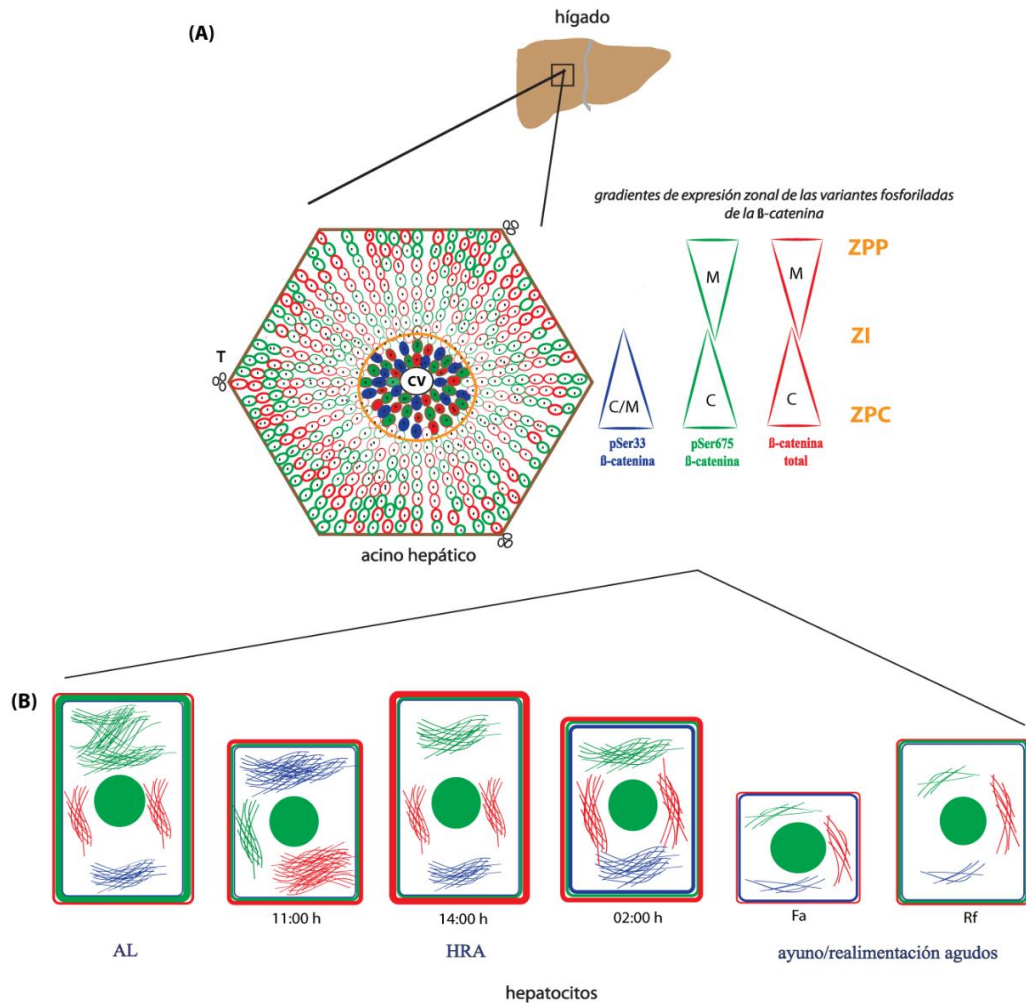
**Figura 20. Distribución zonal de la pSer675 β-catenina en el acino hepático de rata.**

Señal inmunofluorescente para la GS (verde), la pSer675 β-catenina (rojo) y DAPI (azul). Se presenta una fotografía panorámica (barra de calibración morada = 50 μm) y un acercamiento de la misma (barra de calibración azul = 25 μm y barra de calibración amarilla = 20 μm) indicado por el recuadro anaranjado (n=3 animales diferentes). Un control negativo (anticuerpo primario omitido) se presenta en la esquina inferior izquierda de las fotografías panorámicas. ZPC = zona pericentral; CV = vena central hepática.

Los resultados obtenidos por inmunohistoquímica y Western blot de las 2 variantes fosforiladas de  $\beta$ -catenina (pSer33  $\beta$ -catenina y pSer675  $\beta$ -catenina) y de la  $\beta$ -catenina total se integraron en un modelo (Figura 21) que trata de representar los cambios que sufre el hígado de rata como una respuesta adaptativa a los protocolos HRA y Fa-Rf.

El modelo presentado ilustra el gradiente de expresión de la pSer33  $\beta$ -catenina, pSer 675  $\beta$ -catenina y  $\beta$ -catenina total a lo largo del acino hepático de rata. Así como la morfometría de los hepatocitos y la localización subcelular de las 2 variantes fosforiladas de la  $\beta$ -catenina y de la  $\beta$ -catenina total en éstos cuando se encuentran bajo cada protocolo de alimentación.

En resumen, el modelo expone una segregación en las variantes fosforiladas de la  $\beta$ -catenina y en la  $\beta$ -catenina total a lo largo del acino hepático. Del mismo modo, permite apreciar la dinámica subcelular de estas formas de la  $\beta$ -catenina y los cambios anatómicos que esta célula manifiesta como una adaptación a diferentes protocolos de alimentación.



**Figura 21. Modelo de los cambios principales de 3 formas distintas de la  $\beta$ -catenina en el hígado de rata, bajo diferentes protocolos de alimentación.**

(A) Distribución zonal de 2 diferentes formas fosforiladas de la  $\beta$ -catenina: pSer33  $\beta$ -catenina (azul) y pSer675  $\beta$ -catenina (verde), así como de la  $\beta$ -catenina total (rojo) en el acino hepático de rata. La localización de cada  $\beta$ -catenina está representada en forma de gradiente (triángulos) y la ZPC de acino está delimitada por un círculo anaranjado. (B) Localización subcelular de las distintas formas fosforiladas de  $\beta$ -catenina mencionadas en (A), así como de la  $\beta$ -catenina total en el hepatocito de rata en 3 puntos temporales (11:00, 14:00 y 02:00 h), así como en condiciones de Fa y Rf. Los filamentos de colores dentro de cada hepatocito representan la localización citosólica de las variantes de  $\beta$ -catenina. El círculo verde dentro de cada hepatocito ilustra el núcleo celular. CV =vena central hepática, T = triada portal, ZPC = zona pericentral, ZI = zona intermedia, ZPP = zona periportal, C = localización citosólica, M = localización membranal.

## 15. DISCUSIÓN

### 15.1 Biología celular y señalización de la $\beta$ -catenina

La vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina se encuentra conservada a lo largo de la evolución (Cadigan & Nusse, 1997) y desempeña un papel esencial tanto en la adhesión celular ( $\beta$ -catenina asociada a la membrana celular), como en la actividad transcripcional ( $\beta$ -catenina nuclear) (Bienz, 2005) de ciertos genes blanco. Estas funciones se coordinan a través de diversas modificaciones postraduccionales, principalmente la fosforilación (Daugherty & Gottardi, 2007).

En el hígado murino adulto, la  $\beta$ -catenina cumple roles metabólicos importantes. Nuestros resultados mostraron una disminución en el perfil diario de expresión de la pSer33  $\beta$ -catenina en el homogenado total y en el citosol del grupo HRA. La pSer33  $\beta$ -catenina está marcada para su degradación proteosomal. Por lo tanto, la disminución en esta proteína a lo largo de las 24 h del día, podría estar indicando una menor tasa de degradación de la  $\beta$ -catenina y por ende, una mayor oportunidad para que esta trasloque al núcleo y active transcripcionalmente a sus genes blanco.

La fosforilación de  $\beta$ -catenina en el residuo de serina 33, es llevada a cabo por la GSK3 $\beta$ , una de las cinasas participantes en el mecanismo molecular del reloj circadiano. Sin embargo, el perfil de expresión diario de la pSer33  $\beta$ -catenina no mostró una expresión rítmica (Figuras 10A-B). Presumiblemente, la ausencia de ritmicidad se deba a que fosforilaciones múltiples y consecutivas (priming) por distintas cinasas son necesarias para fosforilar a la  $\beta$ -catenina en el residuo de serina 33 (Figura 4). Ya que, en primera instancia las cinasas CK1 $\alpha$  y GSK3 $\beta$  hiperfosforilan a las proteínas andamio APC y Axina (integrantes del complejo de destrucción de la  $\beta$ -catenina). La hiperfosforilación de APC-Axina incrementa su afinidad por la  $\beta$ -catenina y se forma el complejo APC-Axina-  $\beta$ -catenina. En este complejo, la CK1 fosforila a la  $\beta$ -catenina en el residuo de serina 45, aunque la I $\kappa$ B cinasa  $\alpha$  (Provost et al., 2003) y la ciclina D1/Cdk6 (Park et al., 2007) también lo hacen. Esta primera fosforilación propicia fosforilaciones subsecuentes por la GSK3 $\beta$  en los residuos serina 41, serina 37 y serina 33 (Liu et al. 2002). No obstante, los 3 residuos de serina anteriores también pueden ser fosforilados por la PKC (Gwak et al., 2006). Adicionalmente, ciertas fosfatasa como la proteína fosfatasa 1 (PP1) actúan sobre la Axina (Luo et al., 2007), impidiendo la acción de la GSK3 $\beta$ .

Lo anterior estaría indicando una interacción múltiple de cinasas, mostrando la complejidad del proceso de fosforilación de la  $\beta$ -catenina en el residuo de serina 33. Además, en las células epiteliales, la  $\beta$ -catenina es sintetizada de manera constitutiva para formar las uniones adherentes (AJ) entre células al unirse con proteína E-cadherina (Yap, Brieher, & Gumbiner, 1997). La disociación de las AJ, así como la síntesis constante de  $\beta$ -catenina, implican una regulación continua del complejo de destrucción sobre la  $\beta$ -catenina, lo cual tiene como paso final la fosforilación en el residuo de serina 33. Lo anterior promueve que el proceso de degradación de la  $\beta$ -catenina sea constitutivo (Verheyen & Gottardi, 2010), lo cual explicaría nuestros resultados.

En cuanto a las diferencias de expresión en el perfil diario de la pSer33  $\beta$ -catenina en el núcleo celular (Figura 10C), se explicarían bajo el hecho de que la pSer33  $\beta$ -catenina no es transcripcionalmente activa. Consecuentemente, aunque llegue a traslocar al núcleo del hepatocito es exportada de este continuamente. Dicha exportación es máxima a la mitad del período de oscuridad (02:00 h) (Figura 10C), lo cual coincide con la presencia de la pSer33  $\beta$ -catenina en la membrana del hepatocito en el mismo horario (Figuras 14 y 15).

En el caso de la pSer675  $\beta$ -catenina, la expresión diaria de proteína en el grupo AL mostró cambios sustanciales en la fase nocturna (Figuras 11A-B). Lo cual se relacionaría con que los animales experimentales (ratas) son de hábitos nocturnos y estarían activos y consumiendo alimento. Por ende, parámetros metabólicos como la glicemia y la insulina se elevan (Pérez-Mendoza et al., 2014) y se conoce que la  $\beta$ -catenina en el hígado es un regulador de la glucosa hepática debido a su interacción con el factor FoxO1.

En el grupo HRA, la expresión diaria de la pSer675  $\beta$ -catenina fue constante en todas las fracciones celulares probadas, pero incrementó en el núcleo celular, respecto a los animales AL (Figura 11C). Tal incremento podría estar relacionado con la activación de la vía gluconeogénica debida al ayuno repetido que tienen los animales. Se conoce que la  $\beta$ -catenina regula transcripcionalmente a 2 enzimas limitantes de la gluconeogénesis (GNG) hepática, a la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa) y a la fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK), las cuales son las enzimas limitantes de esta vía metabólica. Conjuntamente, los animales experimentales son hipoglucémicos y presentan niveles elevados de corticosterona y glucagon, pero niveles bajos de insulina (Pérez-Mendoza et al., 2014), los cuales son 3

reguladores de la GNG. Asimismo, la proteína cinasa A (PKA) la cual fosforila a la  $\beta$ -catenina en el residuo de serina 675 (van Veelen et al., 2011) es estimulada por glucagon. Igualmente, se ha observado que en el hígado de animales privados de alimentos, la  $\beta$ -catenina regula el metabolismo hepático de glucosa (Liu et al., 2011) a través de la regulación transcripcional de la ciclina D1, la cual controla la respuesta gluconeogénica adicionalmente a su rol en el ciclo celular (Bhalla et al., 2014; Shtutman et al., 1999).

El grupo Fa también incrementa su expresión nuclear de la pSer675  $\beta$ -catenina de manera similar al grupo HRA. Sin embargo, en la fracción citosólica el grupo Fa muestra una mayor expresión de la pSer675  $\beta$ -catenina que el grupo HRA. Lo cual podría deberse a una activación sinérgica de la  $\beta$ -catenina por otras cinasas o elementos señalizadores como Akt (Ying et al., 2015), el péptido 1 parecido a glucagon (GLP-1) (Ying et al., 2015), el péptido 2 parecido a glucagon (Dubé, Rowland, & Brubaker, 2008), p21 (Zhu et al., 2012) o el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (Desbois-Mouthon et al., 2001), de acuerdo al contexto celular.

En los animales HRA, el pico de máxima expresión de las enzimas G6Pasa y PEPCCK se presenta alrededor de la hora de alimentación (11:00-14:00 h). Además, en este punto temporal, la actividad enzimática de la PEPCCK se ve potenciada (Pérez-Mendoza et al., 2014). Esto coincide con el aumento de la  $\beta$ -catenina total principalmente en la fase diurna (Figura 12). Por lo tanto, pensamos que los niveles elevados de la  $\beta$ -catenina total y la pSer675 en el núcleo celular del hepatocito estarían activando transcripcionalmente a las enzimas PEPCCK y G6Pasa para exacerbar la GNG hepática y proveer al hígado con un aporte constante de glucosa. Ya que se sabe que la producción de glucosa hepática es regulada por  $\beta$ -catenina (Liu et al., 2011). Además, en condiciones de ayuno se favorece la interacción de  $\beta$ -catenina con el factor de transcripción FoxO1, para regular la activación transcripcional de los genes que codifican para las enzimas G6Pasa y PEPCCK (Liu et al., 2011), las cuales son las enzimas limitantes de la gluconeogénesis hepática.

Por el contrario, el elevado nivel medio de expresión de la  $\beta$ -catenina total en la membrana plasmática del grupo HRA (Figura 13A-B) podría relacionarse con la adhesión celular. Es sabido que la  $\beta$ -catenina puede unirse a las proteínas cadherina de tipo I, lo que desempeña un rol esencial en la organización estructural de los tejidos, al formar las uniones adherentes (AJ) entre células, que establecen y mantienen la polaridad epitelial (Gumbiner, 2000). En el

hepatocito (una célula polarizada), nuestro grupo de trabajo detectó por la técnica de microarreglos que bajo condiciones de HRA la cadherina y la claudina se elevan 13.3 y 6.4 veces, respectivamente (datos no publicados) después de que el animal come (14:00 h). Este hallazgo coincide con la alta expresión de la  $\beta$ -catenina total en la membrana plasmática del hepatocito a las 14:00 h (Figura 13B). En este sentido, Díaz-Muñoz et al (2010) mostró que el HRA puede modificar el área transversal de los hepatocitos antes de que el animal coma (11:00 h) y posterior a que el animal se alimenta (14:00 h). Es decir, el cambio en el tamaño de los hepatocitos bajo un HRA se da en un período de tiempo corto (aproximadamente 3h), por lo que consideramos que es debido a un reabastecimiento del contenido de glucógeno hepático una vez que el animal ha comido (14:00 h). Este razonamiento correlaciona con lo reportado por Pérez-Mendoza et al (2014), donde los niveles de glucógeno hepático en el HRA se elevan a partir de las 14:00 h en comparación al grupo AL, para posteriormente alcanzar su pico de expresión a las 17:00 h. Lo que promueve un incremento global de glucógeno hepático en el HRA respecto al grupo AL. Este mismo patrón fue observado en estudios de los años 60s donde se observó que el peso del hígado en las aves tiene una oscilación diaria de entre el 20-30%, revisado en (Sinturel et al., 2017), lo cual correspondía con el contenido de lípidos y glucógeno medido.

Aunado a lo anterior, los cambios morfológicos del hepatocito también han sido observados a nivel celular. Entre estos se incluyen el aumento en el número y la estructura de algunos organelos, como el citoesqueleto de actina, el cual presenta una mayor cantidad de fibras cuando el hepatocito alcanza su mayor tamaño, revisado en (Sinturel et al., 2017). Por lo que, parece haber una correlación entre la presencia de la  $\beta$ -catenina total y las proteínas de adhesión (cadherina/claúdina) respecto a la morfología del hepatocito. Ya que, en la membrana celular, la  $\beta$ -catenina es la conexión entre la E-cadherina y los filamentos de actina del citoesqueleto. En este caso, se ha postulado que el nivel de expresión de las moléculas de adhesión como las cadherinas, influyen la fuerza adherente del tejido (Steinberg & Takeichi, 1994), manteniendo su integridad y determinando configuraciones anatómicas específicas (Nardi & Kafatos, 1976). Ahora bien, considerando que el peso del hígado disminuye aproximadamente un 15% bajo el protocolo HRA en la fase de luz (Arellanes-Licea et al., 2014) es posible considerar que el complejo  $\beta$ -catenina-E-cadherina pudiera estar



manteniendo la cohesión celular y la forma del tejido hepático durante las fluctuaciones diarias en el tamaño de los hepatocitos (Figura 13C).

Ahora bien, hay que considerar que las fluctuaciones en el tamaño de los hepatocitos reportadas en este trabajo (diámetro celular), tienen una repercusión directa cuando se considera al hepatocito como una célula completa (esfera). Lo cual nos habla de un cambio significativo en la membrana celular hepática. A través de microscopía electrónica, nuestro grupo de trabajo ha observado que en el HRA la membrana celular del hepatocito es más ancha que en el grupo AL (datos no publicados). Lo cual podría indicar que hay alguna variación en su composición. Estudios pioneros, demostraron que la composición de la membrana plasmática del hepatocito puede ser influenciada por la calidad y composición de la dieta (Hopkins & West, 1977), así como por el protocolo de alimentación, como el “every-other-day schedule” (EOD), en el cual el alimento se da un día por la mañana y se retira a la mañana siguiente (Pieri et al., 1990; Pieri, 1991).

Tanto el HRA como el EOD son 2 modalidades particulares de restricción de alimento y de ayuno, puesto que los animales pasan cierto tiempo sin alimento (en el caso del HRA, 22 h), antes de volver a acceder a él. En el EOD se observó que hay un cambio en la microviscosidad y en el ratio de insaturación/saturación de lípidos en la membrana del hepatocito (Pieri et al., 1990), lo cual tienen relevancia fisiológica. Por ejemplo, las membranas naturales y artificiales compuestas por lípidos insaturados presentan una mayor permeabilidad que aquellas integradas por lípidos saturados (McElhane, de Gier, & van Deene, 1970; Klein, Moore, & Smith, 1971). Además, la composición lipídica modifica la actividad de las enzimas asociadas a la membrana celular (De Kruffyff et al., 1973). Los cambios mencionados, tienen una influencia directa en la señalización celular, sugiriendo que en el HRA la transducción de señales a nivel membranal podría ser diferente a las condiciones AL. Esto pudiera estar propiciando los cambios observados en el HRA, cuando se evalúan las diferentes formas fosforiladas de la  $\beta$ -catenina.

En cuanto a la localización subcelular de las formas fosforiladas de la  $\beta$ -catenina, nuestros resultados arrojaron que tanto en el grupo HRA como AL, la expresión de la pSer33  $\beta$ -catenina es citosólica a las 11:00 y 14:00 h, pero membranal a las 02:00 h (Figura 14 y 15

A). Lo que nos lleva a plantear que la fosforilación que marca a la  $\beta$ -catenina para su degradación (residuo de serina 33) se lleva a cabo principalmente en la fase luminosa del día, difiriendo con los grupos Fa y Rf, donde la localización de la proteína es dual (Figura 15B). Experimentos en distintas líneas celulares ya han mostrado la presencia de la pSer33  $\beta$ -catenina en la membrana celular (Faux et al., 2010; Maher et al., 2010). Esto ha llevado a sugerir que existen diferentes poblaciones subcelulares de  $\beta$ -catenina fosforilada en el extremo N-terminal, las cuales están reguladas diferencialmente. Lo anterior, implicaría que la pSer33  $\beta$ -catenina participa paralelamente en diversas funciones celulares, a su degradación proteosomal. Entre estas funciones se encuentran la regulación de los microtúbulos y las interacciones célula-célula o célula-matriz extracelular (Faux et al., 2010). Ya que, esta forma fosforilada de la  $\beta$ -catenina se ha encontrado en las terminaciones de las protusiones celulares (microtúbulos) en asociación con APC (Faux et al., 2010) y en las uniones celulares dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , pero sin formar parte del complejo de la E-cadherina (Faux et al., 2010). Lo cual sugeriría que la pSer33  $\beta$ -catenina ubicada en la membrana celular de los hepatocitos participa en los cambios morfológicos de estos, de manera complementaria y/o coadyuvante a la  $\beta$ -catenina total.

Respecto a la expresión de la pSer675  $\beta$ -catenina (la cual potencia la actividad transcripcional de la  $\beta$ -catenina), ésta se encontró adosada a la membrana plasmática del hepatocito y correlacionando directamente con la  $\beta$ -catenina total (Figuras 16-17). Este resultado reproduce lo obtenido en líneas celulares (Maher et al., 2010), donde se determinó que ambas formas de  $\beta$ -catenina se localizan en los contactos célula-célula.

En nuestros resultados, el promedio de expresión de la pSer675  $\beta$ -catenina en la membrana celular del hepatocito decrementó en el grupo HRA con respecto al grupo AL (figura 17C). Lo que nos lleva a pensar que la pSer675  $\beta$ -catenina actúa como un reservorio de  $\beta$ -catenina potenciada transcripcionalmente, la cual eventualmente trasloca al núcleo del hepatocito para incidir en sus genes blanco, como son las enzimas gluconeogénicas. Debido a que la GNG está exacerbada en el HRA (Pérez-Mendoza et al., 2014), consideramos que el proceso anterior está más acentuado en el grupo HRA, lo que explicaría la disminución de la pSer675  $\beta$ -catenina en la membrana del hepatocito.

Asumiendo que la dinámica de trasloque nuclear de la pSer675  $\beta$ -catenina es distinta entre los grupos HRA y AL, podría especularse que ésta  $\beta$ -catenina contribuye diferencialmente a los eventos de señalización cercanos a la membrana celular, como son el reclutamiento de factores dependientes de fosforilación que estén mediando tanto la adhesión celular como la señalización.

En relación a la distribución de las 2 variantes fosforiladas de la  $\beta$ -catenina y la  $\beta$ -catenina total en el acino hepático, Benhamouche et al (2006) evidenció una localización complementaria de la  $\beta$ -catenina a lo largo de esta unidad funcional del hígado. En nuestros resultados, apreciamos una segregación en las distintas formas de la  $\beta$ -catenina. Ya que, la pSer675  $\beta$ -catenina y la  $\beta$ -catenina total se localizan en la membrana celular de los hepatocitos periportales (HPP), pero en el citoplasma de los hepatocitos pericentrales (HPC) (Figuras 18 y 20). En tanto que la pSer33  $\beta$ -catenina se localiza exclusivamente en la membrana celular y el citosol de los HPC (Figura 14). Previamente, se había establecido un papel crucial de la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina en el fenómeno de zonación metabólica (Benhamouche et al., 2006).

La zonación metabólica le confiere al hígado una heterogeneidad estructural y celular, propiciando una mejor adaptación ante los retos metabólicos. Nosotros consideramos que la especialización de la  $\beta$ -catenina en el acino hepático, su función transcripcional en la zona pericentral (ZPC) y su función estructural en la zona periportal (ZPP) actúan complementariamente para responder eficazmente a los protocolos de alimentación probados. Sin embargo, el fenómeno de la zonación metabólica es complicado, lo cual se demuestra a través de su mecanismo molecular (Planas-Paz et al., 2016). Por lo que, probablemente en el futuro se evidencien otros elementos que actúen en conjunto con la  $\beta$ -catenina para mantener la heterogeneidad hepática.

## **15.2 La proteína $\beta$ -catenina y la expresión del OSA**

La parte central de los relojes circadianos incluyendo el del hígado, recae en un mecanismo molecular que incluye asas de retroalimentación transcripción/traducción (Lowrey & Takahashi, 2011). En este mecanismo, encontramos reguladores positivos como BMAL1 y reguladores negativos como PER1. Tanto BMAL1 como PER1 muestran una ritmicidad

circadiana en el hígado (Reppert & Weaver, 2002). Sin embargo estas proteínas reloj modifican sus acrofases bajo el protocolo de HRA (Arellanes-Licea et al., 2014).

En este sentido, experimentos en líneas celulares de fibroblastos (NIH-3T3) han mostrado que la sobreexpresión de BMAL1 incrementa los niveles del ARN mensajero de  $\beta$ -catenina, indicando una relación entre ambas proteínas (Lin et al., 2013). Asimismo, la regulación a la baja de la proteína PER2 aumenta la expresión de  $\beta$ -catenina en células de cáncer de colon y en la línea celular de cáncer de mama MTCL (Wood, Xiaoming, & Hrushesky, 2009). Lo anterior, sugiere que los genes/proteínas reloj de los tejidos periféricos podrían regular la expresión de la  $\beta$ -catenina o viceversa.

En el hígado y otros órganos periféricos, el protocolo de HRA promueve adaptaciones metabólicas y cambios en la ritmicidad circadiana de diversas proteínas y enzimas (Pérez-Mendoza et al., 2014) que participan en ciertas vías metabólicas. Así como también de algunas hormonas (Arellanes-Licea et al., 2014; Díaz-Muñoz et al., 2000), receptores nucleares (Rivera-Zavala et al., 2011; Luna-Moreno et al., 2012) y la dinámica de calcio (Báez-Ruiz et al., 2013). Liu et al. (2011) demostró que la  $\beta$ -catenina en el hígado actúa como un regulador de la glucosa circulante, de la GNG y como un modulador de la señalización de insulina. Además, la  $\beta$ -catenina desempeña un papel fundamental en la homeostasis mitocondrial y por tanto en el balance energético (Lehwald et al., 2012). Interesantemente, todas las funciones previamente mencionadas además de presentan una ritmicidad circadiana que se ve modificada por el protocolo HRA, están relacionadas con la  $\beta$ -catenina. Lo que refuerza la idea de una interacción entre la  $\beta$ -catenina y la ritmicidad circadiana de varios parámetros metabólicos en el hígado.

En los mamíferos, el NSQ hipotalámico es el reloj circadiano principal (Moore & Eichler, 1972b; Reppert & Weaver, 2002), el cual es sincronizado por el ciclo luz-oscuridad. Posteriormente, el NSQ transmite la información del ambiente a los relojes periféricos (como el hígado) a través de vías nerviosas y humorales (Albrecht, 2012). Sin embargo, adicionalmente a la luz, otros factores del ambiente como la disponibilidad del alimento puede actuar como sincronizadores de los osciladores periféricos.

Está bien documentado que bajo un horario diario de restricción de alimento de 2-3 h por día (HRA) durante varios días consecutivos, se produce un desacople entre los osciladores

periféricos y el NSQ. Por lo cual, una nueva configuración del sistema circadiano se hace evidente. Este nuevo reloj circadiano que pierde la influencia del NSQ se denomina Oscilador Sincronizado por el Alimento (OSA).

El protocolo HRA implica una restricción alimenticia y calórica, lo que fomenta un estado anticipatorio generalizado en la fisiología del animal, el cual optimiza la búsqueda, la asimilación y el procesamiento de nutrientes. En dicho protocolo, se encuentran interaccionando estrechamente el reloj molecular y el metabolismo bajo una regulación cronostática (Aguilar-Roblero & Díaz-Muñoz, 2010).

Debido a que en el protocolo HRA el animal sólo puede alimentarse por unas horas al día, estos ingiere un 36% menos de comida y disminuye su peso corporal alrededor de un 28% (Challet, 2010). Esto implica que las condiciones nutricionales pasan a ser hipocalóricas (Masoro et al., 1995) al compararse con los animales AL. Ya que, los animales experimentales reducen su ingesta de calorías en un 24-60% respecto a los animales AL (Froy, 2007). No obstante, los animales con ingesta hipocalórica no presentan malnutrición, lo cual ya se ha comprobado en nuestro laboratorio a través de la evaluación de parámetros como la albúmina, la concentración de hemoglobina y la hemoglobina corpuscular media (Molina-Aguilar et al., 2017).

La importancia de la restricción calórica combinada o no con el protocolo HRA consiste en el reajuste del NSQ (Mendoza et al., 2008) lo que promueve la interacción entre el reloj maestro y el metabolismo.

Lo anterior señala que el estado metabólico de los animales bajo el protocolo HRA es único y distinto al de los animales bajo un Fa y los animales AL. Lo que hace relevante el papel de la  $\beta$ -catenina en el hígado, debido a que esta incide en los cambios producidos en cada protocolo de alimentación. Además, 2 cinasas involucradas en el mecanismo del reloj molecular presentan una comunicación cruzada con la señalización por Wnt. Estas cinasas son CK1 y GSK3, las cuales fosforilan a las proteínas reloj contribuyendo a la regulación fina del mecanismo del reloj molecular (Gallego & Virshup, 2007), pero que regulan a la baja la actividad de  $\beta$ -catenina en su vía de señalización (Stamos & Weis, 2013). Estas interacciones entre proteínas reloj, la  $\beta$ -catenina y las cinasas mencionadas podrían ser una señal robusta que coordina los cambios metabólicos del hígado durante el protocolo de HRA.

No obstante, experimentos posteriores son necesarios para elucidar si la  $\beta$ -catenina actúa como un elemento en el mecanismo del reloj molecular hepático que promueve el reajuste metabólico bajo diferentes protocolos de alimentación.

### **15.3 Implicaciones de la $\beta$ -catenina en las patologías hepáticas**

La  $\beta$ -catenina es un factor de transcripción de algunos reguladores del ciclo celular como la ciclina D1 (Shtutman et al., 1999) y c-myc (He et al., 1998). Además, es una proteína esencial en la fisiología hepática (Thompson & Monga, 2007). La activación aberrante de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina se ha asociado a varias patologías hepáticas como el defecto en el metabolismo de los ácidos biliares, la hepatoesteatosis, la colestasis (Behari et al., 2010), la enfermedad hepática crónica, la fibrosis hepática y el hepatocarcinoma (HCC) (Boyault et al., 2007). Se ha reportado que tanto en modelos animales como en humanos, las células de HCC muestran una activación constitutiva de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina (Okabe et al., 2016). Adicionalmente se ha propuesto que las proteínas PERs y BMAL1 podrían influenciar la proliferación celular a través de la señalización por Wnt (Lin et al., 2013), indicando que el cáncer podría considerarse como un desorden circadiano (Rana & Mahmood, 2010). Recientemente, se ha mostrado que el protocolo de HRA disminuye el tamaño de los tumores en un modelo de HCC inducido por dimetilnitrosamina (DEN) (Molina-Aguilar et al., 2017). Tales antecedentes refuerzan la relación de la  $\beta$ -catenina y los elementos del reloj molecular no sólo en el metabolismo hepático, sino también en estados patológicos del hígado. Además, resalta la idea de que la  $\beta$ -catenina podría ser considerada como un factor clave en futuras estrategias terapéuticas contra diversas patologías hepáticas. Por ejemplo, la administración de triyodotironina (T3) induce la activación de la  $\beta$ -catenina, a través de la PKA (pSer675  $\beta$ -catenina) (Fanti et al., 2014), por lo que se le ha considerado como una alternativa en las terapias de regeneración hepática (Monga, 2014). Igualmente, la administración de algunos agonistas de los ligandos Wnt como el 6-bromoindirrubina,-3'oxima (BIO), activan a la  $\beta$ -catenina al inhibir a la GSK3 $\beta$  (Sato et al., 2004), por lo que se ha empleado para mantener la pluripotencialidad de las células madre. Finalmente, el 2-amino-4-[3,4(metilenedioxibencilamino)-6-3(metoxifenil) pirimidina activa a la  $\beta$ -catenina por un mecanismo independiente de GSK3 $\beta$ , lo cual lo hace atractivo para estimular la regeneración hepática en un modelo de daño hepático (Monga, 2014).

## 16. CONCLUSIONES

Nuestros resultados demostraron que 2 diferentes formas fosforiladas de la proteína  $\beta$ -catenina (pSer33  $\beta$ -catenina y pSer675  $\beta$ -catenina), así como la  $\beta$ -catenina total (la cual incluye a las formas fosforiladas y no fosforiladas de la proteína) son sensibles a la condición alimenticia y también son moduladas diferencialmente por el protocolo de HRA. Interesantemente, las funciones de las 3 formas evaluadas de la  $\beta$ -catenina en el hígado están zonadas. Es decir, tienen una segregación funcional de acuerdo a la población de hepatocitos del acino hepático en la que se encuentren. Esto denota la importancia de la  $\beta$ -catenina en el metabolismo y su relación con el mecanismo del reloj molecular hepático. Lo que incide en la plasticidad del hígado para adaptarse a distintos retos metabólicos alimenticios como son el protocolo HRA y el ayuno agudo-realimentación agudo.

## 17. PERSPECTIVAS

De acuerdo a los antecedentes de este trabajo, la  $\beta$ -catenina tiene una relación directa con los genes reloj *Per1*, *Per2* y *BMAL1* en líneas celulares de cáncer (HCT116 y MTCL) (Wood et al., 2008; Yang et al., 2009) y en fibroblastos (NIH3T3) (Lin et al., 2013), respectivamente. Lo cual denota su importancia en el mecanismo molecular de los relojes circadianos. Además, en esta tesis se mostró que *in vivo*, la  $\beta$ -catenina hepática responde al OSA, otro reloj circadiano distinto al NSQ. Por lo que, nuestras perspectivas están orientadas a determinar el papel que desempeña la  $\beta$ -catenina como un elemento “potencial” en el mecanismo del reloj circadiano del hepatocito. Lo cual, se podría estudiar a través del noqueo y la sobreexpresión de la  $\beta$ -catenina en líneas celulares y en cultivos primarios de hepatocitos.

## 18. REFERENCIAS

- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., & Kemler, R. (1997). B-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *The EMBO journal*, *16*(13), 3797-3804. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.13.3797>
- Abràmoff, M. D., Magalhaes, P. J., & Ram, S. J. (2004). Image Processing with ImageJ Second Edition. *Biophotonics International*, *11*(7), 36-42.
- Aguilar-Delfín, I., López-Barrera, F., & Hernández-Muñoz, R. (1996). Selective Enhancement of Lipid Peroxidation in Plasma Membrane in Two Experimental Models of Liver Regeneration: Partial Hepatectomy and Acute CCl 4 Administration. *Hepatology*, *24*(3), 657-662.
- Aguilar-Roblero, R., & Díaz-Muñoz, M. (2010). Chronostatic adaptations in the liver to restricted feeding: The FEO as an emergent oscillator. *Sleep and Biological Rhythms*, *8*(1), 9-17. <https://doi.org/10.1111/j.1479-8425.2009.00415.x>
- Aguilar-Roblero, R., García-Hernández, F., Aguilar, R., Arankowsky-Sandoval, G., & Drucker-Colín, R. (1986). Suprachiasmatic nucleus transplants function as an endogenous oscillator only in constant darkness. *Neuroscience Letters*, *69*, 47-52.
- Albrecht, U. (2012). Timing to Perfection: The Biology of Central and Peripheral Circadian Clocks. *Neuron*, *74*(2), 246-260. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.04.006>
- Alonso, L., & Fuchs, E. (2003). Stem cells in the skin: waste not, Wnt not. *Genes & Development*, *17*(10), 1189-1200. <https://doi.org/10.1101/gad.1086903>
- Alpini, G., Roberts, S., Kuntz, S. M., Ueno, Y., Gubba, S., Podila, P. V., Sage, G. L. E., & Russo, N. F. L. A. (1996). Morphological, Molecular, and Functional Heterogeneity of Cholangiocytes From Normal Rat Liver. *Gastroenterology*, *110*(5), 1636-1643.
- Alvaro, D., Mancino, M. G., Glaser, S., Gaudio, E., Marzioni, M., Francis, H., & Alpini, G. (2007). Proliferating Cholangiocytes: A Neuroendocrine Compartment in the Diseased Liver. *Gastroenterology*, *132*(1), 415-431. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.07.023>
- Ángeles-Castellanos, M., Mendoza, J., Díaz-Muñoz, M., & Escobar, C. (2005). Food entrainment modifies the c-Fos expression pattern in brain stem nuclei of rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *288*(3), R678-R684. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00590.2004>
- Arellanes-Licea, E. del C., Báez-Ruiz, A., Carranza, M. E., Arámburo, C., Luna, M., & Díaz-Muñoz, M. (2014). Daily Patterns and Adaptation of the Ghrelin, Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor-1 System Under Daytime Food Synchronisation in Rats. *Journal of Neuroendocrinology*, *26*(5), 282-295. <https://doi.org/10.1111/jne.12145>
- Atcha, F. A., Syed, A., Wu, B., Hoverter, N. P., Yokoyama, N. N., Ting, J.-H. T., Munguia, J. E., Mangalam, H. J., Marsh, J. L., & Waterman, M. L. (2007). A Unique DNA Binding Domain Converts T-Cell Factors into Strong Wnt Effectors. *Molecular and Cellular Biology*, *27*(23), 8352-8363. <https://doi.org/10.1128/MCB.02132-06>
- Báez-Ruiz, A., Cázares-Gómez, K., Vázquez-Martínez, O., Aguilar-Roblero, R., & Díaz-Muñoz, M. (2013). Diurnal and nutritional adjustments of intracellular Ca<sup>2+</sup> release channels and Ca<sup>2+</sup> ATPases associated with restricted feeding schedules in the rat liver. *Journal of Circadian Rhythms*, *11*(1), 8. <https://doi.org/10.1186/1740-3391-11-8>
- Balsalobre, A., Brown, S. A., Marcacci, L., Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H. M., Schutz, G., & Schibler, U. (2000). Resetting of Circadian Time in Peripheral Tissues by Glucocorticoid Signaling. *Science*, *289*(5488), 2344-2347. <https://doi.org/10.1126/science.289.5488.2344>



- Bash, E. (1999). Textbook of Hepatology From Basic Science to Clinical Practice. En J. Rodés, J.-P. Benhamou, A. Bleri, J. Reichen, & M. Rizzetto (Eds.) (Third Edit, Vol. 1, pp. 3-52). Blackweel Publishing.
- Behari, J., Yeh, T.-H., Krauland, L., Otruba, W., Cieply, B., Hauth, B., Apte, U., Wu, T., Evans, R., & Monga, S. P. S. (2010). Liver-Specific  $\beta$ -Catenin Knockout Mice Exhibit Defective Bile Acid and Cholesterol Homeostasis and Increased Susceptibility to Diet-Induced Steatohepatitis. *The American Journal of Pathology*, *176*(2), 744-753. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090667>
- Behrens, J., Jerchow, B.-A., Würtele, M., Grimm, J., Asbrand, C., Wirtz, R., Kühl, M., Doris, W., & Birchmeier, W. (1998). Functional Interaction of an Axin Homolog, Conductin, with  $\beta$ -Catenin, APC, and GSK3. *Science*, *280*(5363), 596-599. <https://doi.org/10.1126/science.280.5363.596>
- Benedetti, A., Bassotti, C., Rapino, K., Marucci, L., & Jezequel, A. M. (1996). A morphometric study of the epithelium lining the rat intrahepatic biliary tree. *Journal of Hepatology*, *24*(3), 335-342. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(96\)80014-6](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(96)80014-6)
- Benhamouche, S., Decaens, T., Godard, C., Chambrey, R., Rickman, D. S., Moinard, C., Vasseur-Cognet, M., Kuo, C. J., Kahn, A., Perret, C., & Colnot, S. (2006a). Apc Tumor Suppressor Gene Is the «Zonation-Keeper» of Mouse Liver. *Developmental Cell*, *10*(6), 759-770. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.03.015>
- Benhamouche, S., Decaens, T., Godard, C., Chambrey, R., Rickman, D. S., Moinard, C., Vasseur-Cognet, M., Kuo, C. J., Kahn, A., Perret, C., & Colnot, S. (2006b). Apc Tumor Suppressor Gene Is the «Zonation-Keeper» of Mouse Liver. *Developmental Cell*, *10*(6), 759-770. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.03.015>
- Berger, W., van de Po, D., Warburg, M., Gal, A., Bleeker-Wagemakers, L., de Silva, H., Meindl, A., Meitinger, T., Cremers, F., & Ropers, H. (1992). Mutations in the candidate gene for Norrie disease. *Hum Mol Genet*, *1*(7), 461-465.
- Berson, D. (2003). Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. *Trends in Neurosciences*, *26*(6), 314-320. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(03\)00130-9](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00130-9)
- Bhalla, K., Liu, W.-J., Thompson, K., Anders, L., Devarakonda, S., Dewi, R., Buckley, S., Hwang, B.-J., Polster, B., Dorsey, S. G., Sun, Y., Sicinski, P., & Girnun, G. D. (2014). Cyclin D1 Represses Gluconeogenesis via Inhibition of the Transcriptional Coactivator PGC1. *Diabetes*, *63*(10), 3266-3278. <https://doi.org/10.2337/db13-1283>
- Bienz, M. (2005).  $\beta$ -Catenin: A Pivot between Cell Adhesion and Wnt Signalling. *Current Biology*, *15*(2), R64-R67. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.12.058>
- Blitzer, J. T., & Nusse, R. (2006). A critical role for endocytosis in Wnt signaling. *BMC Cell Biology*, *7*(1), 28. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-7-28>
- Boyault, S., Rickman, D. S., de Reyniès, A., Balabaud, C., Rebouissou, S., Jeannot, E., Hérault, A., Saric, J., Belghiti, J., Franco, D., Bioulac-Sage, P., Laurent-Puig, P., & Zucman-Rossi, J. (2007). Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology*, *45*(1), 42-52. <https://doi.org/10.1002/hep.21467>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Braeuning, A., Ittrich, C., Köhle, C., Hailfinger, S., Bonin, M., Buchmann, A., & Schwarz, M. (2006). Differential gene expression in periportal and perivenous mouse hepatocytes. *FEBS Journal*, *273*(22), 5051-5061. <https://doi.org/10.1111/j.1742->

4658.2006.05503.x

- Breitman, M., Zilberberg, A., Caspi, M., & Rosin-Arbesfeld, R. (2008). The armadillo repeat domain of the APC tumor suppressor protein interacts with Striatin family members. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1783(10), 1792-1802. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.04.017>
- Brosnan, M. E., & Brosnan, J. T. (2009). Hepatic glutamate metabolism: a tale of 2 hepatocytes. *American Journal of Clinical Nutrition*, 90(3), 857S - 861S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.27462Z>
- Burke, Z. D., & Tosh, D. (2006). The Wnt/ $\beta$ -catenin pathway: Master regulator of liver zonation? *BioEssays*, 28(11), 1072-1077. <https://doi.org/10.1002/bies.20485>
- Buscarlet, M., & Stifani, S. (2007). The 'Marx' of Groucho on development and disease. *Trends in Cell Biology*, 17(7), 353-361. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.07.002>
- Cadigan, K. M., & Nusse, R. (1997). Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes & Development*, 11(24), 3286-3305. <https://doi.org/10.1101/gad.11.24.3286>
- Cadigan, K. M., & Waterman, M. L. (2012). TCF/LEFs and Wnt Signaling in the Nucleus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(11), a007906-a007906. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007906>
- Carneiro, B. T. S., & Araujo, J. F. (2012). Food entrainment: major and recent findings. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 6, 1-6. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2012.00083>
- Ceulemans, H., & Bollen, M. (2004). Functional Diversity of Protein Phosphatase-1, a Cellular Economizer and Reset Button. *Physiological Reviews*, 84(1), 1-39. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2003>
- Chakravarty, K., Cassuto, H., Reshef, L., & Hanson, R. W. (2005). Factors that control the tissue-specific transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase-C. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 40(3), 129-154. <https://doi.org/10.1080/10409230590935479>
- Challet, E. (2010). Interactions between light, mealtime and calorie restriction to control daily timing in mammals. *Journal of Comparative Physiology B*, 180(5), 631-644. <https://doi.org/10.1007/s00360-010-0451-4>
- Challet, E., & Pévet, M. P. (1996). Daily hypocaloric feeding entrains circadian rhythms of wheel-running and body temperature in rats kept in constant darkness. *Neuroscience Letters*, 211(1), 1-4.
- Chen, J., Chen, L., Zern, M. A., Theise, N. D., Diehl, A. M., Liu, P., & Duan, Y. (2017). The diversity and plasticity of adult hepatic progenitor cells and their niche. *Liver International*, 37(9), 1260-1271. <https://doi.org/10.1111/liv.13377>
- Cheong, J. K., & Virshup, D. M. (2011). Casein kinase 1: Complexity in the family. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43(4), 465-469. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.12.004>
- Choi, C. Y., Kim, Y. H., Kim, Y. O., Park, S. J., Kim, E. A., Riemenschneider, W., Gajewski, K., Schulz, R. A., & Kim, Y. (2005). Phosphorylation by the DHIPK2 protein kinase modulates the corepressor activity of Groucho. *Journal of Biological Chemistry*, 280(22), 21427-21436. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500496200>
- Coleman, G. J., & Hay, M. (1990). Anticipatory wheel-running in behaviorally anosmic rats. *Physiology & Behavior*, 47(6), 1145-1151. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(90\)90365-B](https://doi.org/10.1016/0031-9384(90)90365-B)

- Comperatore, C. A., & Stephan, F. K. (1987). Entrainment of Duodenal Activity to Periodic Feeding. *J Biol Rhythms*, 2(3), 227-242.
- Comperatore, C. A., & Stephan, F. K. (1990). Effects of Vagotomy on Entrainment of Activity Rhythms to Food Access. *Physiology & Behavior*, 47(4), 671-678. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(90\)90076-G](https://doi.org/10.1016/0031-9384(90)90076-G)
- Cong, F., Schweizer, L., & Varmus, H. (2004). Wnt signals across the plasma membrane to activate the B-catenin pathway by forming oligomers containing its receptors, Frizzled and LRP. *Development*, 131(20), 5103-5115. <https://doi.org/10.1242/dev.01318>
- Coudreuse, D., & Korswagen, H. C. (2007). The making of Wnt: new insights into Wnt maturation, sorting and secretion. *Development*, 134(1), 3-12. <https://doi.org/10.1242/dev.02699>
- Dajani, R., Fraser, E., Roe, S. M., Yeo, M., Good, V. M., Thompson, V., Dale, T. C., & Pearl, L. H. (2003). Structural basis for recruitment of glycogen synthase kinase 3beta to the axin-APC scaffold complex. *The EMBO journal*, 22(3), 494-501. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg068>
- Damiola, F., Le Minh, N., Preitner, N., Kornmann, B., Fleury-Olela, F., & Schibler, U. (2000). Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes & Development*, 14(23), 2950-2961. <https://doi.org/10.1101/gad.183500>
- Daniels, D. L., & Weis, W. I. (2005).  $\beta$ -catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 12(4), 364-371. <https://doi.org/10.1038/nsmb912>
- Daugherty, R. L., & Gottardi, C. J. (2007). Phospho-regulation of -Catenin Adhesion and Signaling Functions. *Physiology*, 22(5), 303-309. <https://doi.org/10.1152/physiol.00020.2007>
- Davidson, A. J., Aragona, B. J., Haupt, T. A., & Stephan, F. K. (2001). Persistence of meal-entrained circadian rhythms following area postrema lesions in the rat. *Physiology & Behavior*, 74(3), 349-354. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(01\)00567-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(01)00567-4)
- Davidson, A. J., Aragona, B. J., Werner, R. M., Schroeder, E., Smith, J. C., & Stephan, F. K. (2001). Food-anticipatory activity persists after olfactory bulb ablation in the rat. *Physiology & Behavior*, 72(1-2), 231-235. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(00\)00417-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(00)00417-0)
- Davidson, A. J., Cappendijk, S. L. T., & Stephan, F. K. (2000). Feeding-entrained circadian rhythms are attenuated by lesions of the parabrachial region in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 278(5), R1296-R1304.
- Davidson, A. J., & Stephan, F. K. (1999a). Feeding-entrained circadian rhythms in hypophysectomized rats with suprachiasmatic nucleus lesions. *The American journal of physiology*, 277(5 Pt 2), R1376-R1384. <https://doi.org/10564210>
- Davidson, A. J., & Stephan, F. K. (1999b). Plasma Glucagon, Glucose, Insulin, and Motilin in Rats Anticipating Daily Meals. *Physiology & Behavior*, 66(2), 309-315. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(98\)00308-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(98)00308-4)
- Day, C. L., & Alber, T. (2000). Crystal structure of the amino-terminal coiled-coil domain of the APC tumor suppressor. *Journal of Molecular Biology*, 301(1), 147-156. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3895>
- De Kruffy, B., Van Dijk, P. W. ., Goldbach, R. W., Demel, R. A., & Van Deenen, L. L. . (1973). Influence of fatty acid and sterol composition on the lipid phase transition and activity of membrane-bound enzymes in *Acholeplasma Laidlawii*. *Biochimica Et*

- Biophysica Acta*, 330, 269-282.
- De Vos, R., & Desmet, V. (1992). Ultrastructural characteristics of novel epithelial cell types identified in human pathologic liver specimens with chronic ductular reaction. *The American journal of pathology*, 140(6), 1441-1450.
- Desbois-Mouthon, C., Cadoret, A., Blivet-Van Eggelpoël, M.-J., Bertrand, F., Cherqui, G., Perret, C., & Capeau, J. (2001). Insulin and IGF-1 stimulate the  $\beta$ -catenin pathway through two signalling cascades involving GSK-3 $\beta$  inhibition and Ras activation. *Oncogene*, 20(2), 252-259. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204064>
- Deuel, T. F., Louie, M., & Lerner, A. (1978). from Rat Liver \*. *The Journal of Biological Chemistry*, 253(17), 6111-6118.
- Díaz-Muñoz, M., Vázquez-Martínez, O., Aguilar-Roblero, R., & Escobar, C. (2000). Anticipatory changes in liver metabolism and entrainment of insulin, glucagon, and corticosterone in food-restricted rats. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 279(6), R2048-R2056.
- Díaz-Muñoz, M., Vázquez-Martínez, O., Báez-Ruiz, A., Martínez-Cabrera, G., Soto-Abraham, M. V., Ávila-Casado, M. C., & Larriva-Sahd, J. (2010). Daytime food restriction alters liver glycogen, triacylglycerols, and cell size. A histochemical, morphometric, and ultrastructural study. *Comparative Hepatology*, 9(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1476-5926-9-5>
- Dillman, A. R., Minor, P. J., & Sternberg, P. W. (2013). Origin and Evolution of Dishevelled. *G3 Bethesda*, 3(2), 251-262. <https://doi.org/10.1534/g3.112.005314>
- Dintilhac, A., & Bernués, J. (2002). HMGB1 Interacts with Many Apparently Unrelated Proteins by Recognizing Short Amino Acid Sequences \*. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(9), 7021-7028. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108417200>
- Doble, B. W., Patel, S., Wood, G. A., Kockeritz, L. K., & Woodgett, J. R. (2007). Functional Redundancy of GSK-3 $\alpha$  and GSK-3 $\beta$  in Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Shown by Using an Allelic Series of Embryonic Stem Cell Lines. *Developmental Cell*, 12(6), 957-971. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.04.001>
- Dubé, P. E., Rowland, K. J., & Brubaker, P. L. (2008). Glucagon-Like Peptide-2 Activates  $\beta$ -Catenin Signaling in the Mouse Intestinal Crypt: Role of Insulin-Like Growth Factor-I. *Endocrinology*, 149(1), 291-301. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0561>
- Embi, N., Rylatt, D. B., & Cohen, P. (1980). Glycogen synthase kinase 3 from rabbit skeletal muscle. *European Journal of Biochemistry*, 107(2), 519-527. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1980.tb06059.x>
- Engelberth, R. C. G. J., de Pontes, A. L. B., Fiuza, F. P., Silva, K. D. de A., Resende, N. da S., Azevedo, C. V. de M., Costa, M. S. M. O., Cavalcante, J. C., Nascimento, E. S., Gavioli, E. C., & Cavalcante, J. S. (2013). Changes in the suprachiasmatic nucleus during aging: Implications for biological rhythms. *Psychology & Neuroscience*, 6(3), 287-297. <https://doi.org/10.3922/j.psns.2013.3.07>
- Escobar, C., Díaz-Muñoz, M., Encinas, F., & Aguilar-Roblero, R. (1998). Persistence of metabolic rhythmicity during fasting and its entrainment by restricted feeding schedules in rats. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 274(5), R1309-R1316.
- Faber, E. (1956). Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene, and 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res*, 16(2), 142-148.
- Faux, M. C., Coates, J. L., Kershaw, N. J., Layton, M. J., & Burgess, A. W. (2010).

- Independent Interactions of Phosphorylated  $\beta$ -Catenin with E-Cadherin at Cell-Cell Contacts and APC at Cell Protrusions. *PLoS ONE*, 5(11), e14127. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014127>
- Feldman, M., Friedman, L. S., & Brandt, L. J. (2010). *Gastrointestinal and Liver Disease*. (Saunders & Elsevier, Eds.) (9th ed). Philadelphia.
- Froy, O. (2007). The relationship between nutrition and circadian rhythms in mammals. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 28(2-3), 61-71. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2007.03.001>
- Fujino, T., Asaba, H., Kang, M., Ikeda, Y., Sone, H., Takada, S., Kim, D.-H., Ioka, R. X., Ono, M., Tomoyori, H., Okubo, M., Murase, T., Kamataki, A., Yamamoto, J., Magoori, K., Takahashi, S., Miyamoto, Y., Oishi, H., Nose, M., et al. (2003). Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) is essential for normal cholesterol metabolism and glucose-induced insulin secretion. *Proc Nat Acad Sci USA*, 100(1), 229-234.
- Gallego, M., & Virshup, D. M. (2007). Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(2), 139-148. <https://doi.org/10.1038/nrm2106>
- Gao, C., & Chen, Y.-G. (2010). Dishevelled: The hub of Wnt signaling. *Cellular Signalling*, 22(5), 717-727. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.11.021>
- Gebhardt, R., Baldysiak-Figiel, A., Krügel, V., Ueberham, E., & Gaunitz, F. (2007). Hepatocellular expression of glutamine synthetase: An indicator of morphogen actions as master regulators of zonation in adult liver. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 41(4), 201-266. <https://doi.org/10.1016/j.proghi.2006.12.001>
- Gebhardt, R., Gaunitz, F., & Mecke, D. (1994). Heterogeneous (positional) expression of hepatic glutamine synthetase: features, regulation and implications for hepatocarcinogenesis. *Advan. Enzyme Regul*, 34, 27-56.
- Gebhardt, R., & Mecke, D. (1983). Heterogeneous distribution of glutamine synthetase among rat liver parenchymal cells in situ and in primary culture. *The EMBO journal*, 2(4), 567-570.
- Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H. B., Davis, F. C., Wilsbacher, L. D., King, D. P., Takahashi, J. S., & Weitz, C. J. (1998). Role of the CLOCK Protein in the Mammalian Circadian Mechanism. *Science*, 280(5369), 1564-1569.
- Go, G.-W., & Mani, A. (2012). Low-density lipoprotein receptor (LDLR) family orchestrates cholesterol homeostasis. *The Yale journal of biology and medicine*, 85(1), 19-28.
- Grant, S. F. A., Thorleifsson, G., Reynisdottir, I., Benediktsson, R., Manolescu, A., Sainz, J., Helgason, A., Stefansson, H., Emilsson, V., Helgadóttir, A., Styrkarsdóttir, U., Magnusson, K. P., Walters, G. B., Palsdóttir, E., Jonsdóttir, T., Gudmundsdóttir, T., Gylfason, A., Saemundsdóttir, J., Wilensky, R. L., et al. (2006). Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nature Genetics*, 38(3), 320-323. <https://doi.org/10.1038/ng1732>
- Grumolato, L., Liu, G., Mong, P., Mudbhary, R., Biswas, R., Arroyave, R., Vijayakumar, S., Economides, A. N., & Aaronson, S. A. (2010). Canonical and noncanonical Wnts use a common mechanism to activate completely unrelated coreceptors. *Genes & Development*, 24(22), 2517-2530. <https://doi.org/10.1101/gad.1957710>
- Guillaumond, F., Dardente, H., Giguère, V., & Cermakian, N. (2005). Differential Control of Bmal1 Circadian Transcription by REV-ERB and ROR Nuclear Receptors. *Journal of Biological Rhythms*, 20(5), 391-403. <https://doi.org/10.1177/0748730405277232>

- Gumbiner, B. M. (2000). Regulation of Cadherin Adhesive Activity. *The Journal of Cell Biology*, 148(3), 399-404. <https://doi.org/10.1083/jcb.148.3.399>
- Guo, B., Chatterjee, S., Li, L., Kim, J. M., Lee, J., Yechoor, V. K., Minze, L. J., Hsueh, W., & Ma, K. (2012). The clock gene, brain and muscle Arnt-like 1, regulates adipogenesis via Wnt signaling pathway. *The FASEB Journal*, 26(8), 3453-3463. <https://doi.org/10.1096/fj.12-205781>
- Gwak, J., Cho, M., Gong, S.-J., Won, J., Kim, D.-E., Kim, E.-Y., Lee, S. S., Kim, M., Kim, T. K., Shin, J.-G., & Oh, S. (2006). Protein-kinase-C-mediated -catenin phosphorylation negatively regulates the Wnt/ -catenin pathway. *Journal of Cell Science*, 119(22), 4702-4709. <https://doi.org/10.1242/jcs.03256>
- Hara, R., Wan, K., Wakamatsu, H., Aida, R., Moriya, T., Akiyama, M., & Shibata, S. (2001). Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes to Cells*, 6(3), 269-278. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2001.00419.x>
- Hasson, P., Egoz, N., Winkler, C., Volohonsky, G., Jia, S., Dinur, T., Volk, T., Courey, A. J., & Paroush, Z. (2005). EGFR signaling attenuates Groucho-dependent repression to antagonize Notch transcriptional output. *Nature Genetics*, 37(1), 101-105. <https://doi.org/10.1038/ng1486>
- Haubrich, W. S. (2004). Disse of the space of Disse. *Gastroenterology*, 127(6), 1684. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.10.021>
- Haussinger, D. (1990). Nitrogen metabolism in the liver: structural and functional organization and physiological relevance. *Biochemical Journal*, 267, 281-290.
- He, T.-C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., Morin, P. J., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1998). Identification of c-MYC as a Target of the APC Pathway. *Science*, 281(5382), 1509-1512. <https://doi.org/10.1126/science.281.5382.1509>
- He, X., Semenov, M., Tamai, K., & Zeng, X. (2004). LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/B-catenin signaling: Arrows point the way. *Development*, 131(8), 1663-1677. <https://doi.org/10.1242/dev.01117>
- Hopkins, G. J., & West, C. E. (1977). Diet-induced Changes in the Fatty Acid Composition of Mouse Hepatocyte Plasma Membranes. *Lipids*, 12(4), 327-334.
- Hsu, W., Zeng, L., & Costantini, F. (1999). Identification of a Domain of Axin That Binds to the Serine/Threonine Protein Phosphatase 2A and a Self-binding Domain. *Journal of Biological Chemistry*, 274(6), 3439-3445. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.6.3439>
- Huber, A. H., & Weis, W. I. (2001). The Structure of the B-Catenin/E-Cadherin Complex and the Molecular Basis of Diverse Ligand Recognition by B-Catenin. *Cell*, 105, 391-402. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00330-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00330-0)
- Jamora, C., & Fuchs, E. (2002). Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nature Cell Biology*, 4(4), E101-E108. <https://doi.org/10.1038/ncb0402-e101>
- Johnson, C. H., & Golden, S. S. (1999). Circadian Programs in Cyanobacteria: Adaptiveness and Mechanism. *Annual Review of Microbiology*, 53(1), 389-409. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.53.1.389>
- Jungermann, K., & Keitzmann, T. (1996). Zonation of Parenchymal and Nonparenchymal Metabolism in Liver. *Annual Review of Nutrition*, 16(1), 179-203. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.16.070196.001143>
- Kanazawa, A., Tsukada, S., Sekine, A., Tsunoda, T., Takahashi, A., Kashiwagi, A., Tanaka, Y., Babazono, T., Matsuda, M., Kaku, K., Iwamoto, Y., Kawamori, R., Kikkawa, R.,

- Nakamura, Y., & Maeda, S. (2004). Association of the Gene Encoding Wingless-Type Mammary Tumor Virus Integration-Site Family Member 5B (WNT5B) with Type 2 Diabetes. *The American Journal of Human Genetics*, 75(5), 832-843. <https://doi.org/10.1086/425340>
- Katz, N. R. (1992). Conference : Hepatic Metabolism of Organic Acids in Ruminants Metabolic Heterogeneity of Hepatocytes across the Liver Acinus. En *Journal of Nutrition* (Vol. 122, pp. 850-854).
- Katz, N. R., Teutsch, H. F., Sasse, D., & Jungermann, K. (1977). Heterogeneous distribution of glucose-6-phosphatase in microdissected periportal and perivenous rat liver tissue. *FEBS Letters*, 76(2), 226-230. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(77\)80157-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(77)80157-9)
- Kawano, Y. (2003). Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *Journal of Cell Science*, 116(13), 2627-2634. <https://doi.org/10.1242/jcs.00623>
- Kennaway, D. J., Owens, J. A., Voultzios, A., Boden, M. J., & Varcoe, T. J. (2007). Metabolic homeostasis in mice with disrupted Clock gene expression in peripheral tissues 47. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol*, 293(4), R1528-R1537. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00018.2007>.
- Kinugasa, A., & Thurman, R. G. (1986). Differential effect of glucagon on gluconeogenesis in periportal and pericentral regions of the liver lobule, 236, 425-430.
- Klein, P. S., & Melton, D. A. (1996). A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(16), 8455-8459. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.16.8455>
- Klein, R., Moore, M., & Smith, M. (1971). Selective diffusion of neutral amino acids across lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 233(2), 420-433.
- Knippschild, U., Gocht, A., Wolff, S., Huber, N., Löhler, J., & Stöter, M. (2005). The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cellular Signalling*, 17(6), 675-689. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2004.12.011>
- Ko, C. H., & Takahashi, J. S. (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human Molecular Genetics*, 15(suppl\_2), R271-R277. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl207>
- Kohsaka, A., & Bass, J. (2007). A sense of time: how molecular clocks organize metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 18(1), 4-11. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2006.11.005>
- Koukkari, W. L., & Sothorn, R. B. (2006). *Introducing biological rhythms*. (Springer, Ed.) (9.<sup>a</sup> ed.). New York.
- Koval, A., & Katanaev, V. L. (2011). Wnt3a stimulation elicits G-protein-coupled receptor properties of mammalian Frizzled proteins. *Biochemical Journal*, 433(3), 435-440. <https://doi.org/10.1042/BJ20101878>
- Koval, A., Purvanov, V., Egger-Adam, D., & Katanaev, V. L. (2011). Yellow submarine of the Wnt/Frizzled signaling: Submerging from the G protein harbor to the targets. *Biochemical Pharmacology*, 82(10), 1311-1319. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.06.005>
- Kramps, T., Peter, O., Nellen, D., Chatterjee, S., & Züllig, S. (2002). Wnt/Wingless Signaling Requires BCL9/Legless-Mediated Recruitment of Pygopus to the Nuclear  $\beta$ -Catenin-TCF Complex. *Cell*, 109(1), 47-60.
- Kühl, M. (2002). Non-canonical Wnt signaling in Xenopus: regulation of axis formation and gastrulation. *Seminars in cell & developmental biology*, 13(3), 243-249.

- <https://doi.org/10.1016/S1084-9521>
- Kuntz, E., & Kuntz, H.-D. (2008). *Hepatology Textbook and Atlas* (3rd ed.). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-76839-5>
- Lazaridis, K. N., Strazzabosco, M., & LaRusso, N. F. (2004). The cholangiopathies: Disorders of biliary epithelia. *Gastroenterology*, *127*(5), 1565-1577. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.08.006>
- Leak, R. K., Card, J. P., & Moore, R. Y. (1999). Suprachiasmatic pacemaker organization analyzed by viral transynaptic transport. *Brain Research*, *819*(1-2), 23-32. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(98\)01317-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)01317-1)
- Leak, R. K., & Moore, R. Y. (2001). Topographic organization of suprachiasmatic nucleus projection neurons. *The Journal of Comparative Neurology*, *433*(3), 312-334. <https://doi.org/10.1002/cne.1142>
- Lee, Y.-L., Gao, Y., & Wang, H. (2008). Differential mediation of the Wnt canonical pathway by mammalian Dishevelleds-1,-2, and -3. *Cell Signal*, *20*(2), 443-452.
- Lehman, M. N., Silver, R., Gladstone, W. R., Kahn, R. M., Gibson, M., & Bittman, E. L. (1987). Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *The Journal of Neuroscience*, *7*(6), 1626-1638.
- Lehwald, N., Tao, G., Jang, K. Y., Papandreou, I., Liu, B., Liu, B., Pysz, M. A., Willmann, J. K., Knoefel, W. T., Denko, N. C., & Sylvester, K. G. (2012).  $\beta$ -Catenin Regulates Hepatic Mitochondrial Function and Energy Balance in Mice. *Gastroenterology*, *143*(3), 754-764. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.05.048>
- Leung, J. Y., Kolligs, F. T., Wu, R., Zhai, Y., Kuick, R., Hanash, S., Cho, K. R., & Fearon, E. R. (2002). Activation of AXIN2 Expression by B-catenin-T cell factor A feedback repressor pathway regulating Wnt signaling. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(24), 21657-21665. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200139200>
- Lin, F., Chen, Y., Li, X., Zhao, Q., & Tan, Z. (2013). Over-expression of circadian clock gene Bmal1 affects proliferation and the canonical Wnt pathway in NIH-3T3 cells. *Cell Biochemistry and Function*, *31*(2), 166-172. <https://doi.org/10.1002/cbf.2871>
- Lindsley, D., & Grell, E. (1968). *Genetic Variations of Drosophila melanogaster* (Vol. 627).
- Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G.-H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X., & He, X. (2002). Control of  $\beta$ -Catenin Phosphorylation/Degradation by a Dual-Kinase Mechanism. *Cell*, *108*(6), 837-847. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00685-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00685-2)
- Liu, H., Fergusson, M. M., Wu, J. J., Rovira, I. I., Liu, J., Gavrilova, O., Lu, T., Bao, J., Han, D., Sack, M. N., & Finkel, T. (2011). Wnt Signaling Regulates Hepatic Metabolism. *Science Signaling*, *4*(158), ra6-ra6. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001249>
- Louie, M., Deuel, T. F., & Morris, H. P. (1978). Abnormal dietary regulation of glutamine synthetase in rat hepatomas. *Journal of Biological Chemistry*, *253*(17), 6119-6124.
- Lowrey, P. L., & Takahashi, J. S. (2011). Genetics of Circadian Rhythms in Mammalian Model Organisms. *En Adv Genet* (Vol. 100, pp. 175-230). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387690-4.00006-4>
- Luna-Moreno, D., Aguilar-Roblero, R., & Díaz-Muñoz, M. (2009). RESTRICTED FEEDING ENTRAINS RHYTHMS OF INFLAMMATION-RELATED FACTORS WITHOUT PROMOTING AN ACUTE-PHASE RESPONSE. *Chronobiology International*, *26*(7), 1409-1429. <https://doi.org/10.3109/07420520903417003>
- Luna-Moreno, D., García-Ayala, B., & Díaz-Muñoz, M. (2012). Daytime restricted feeding modifies 24 h rhythmicity and subcellular distribution of liver glucocorticoid receptor



- and the urea cycle in rat liver. *British Journal of Nutrition*, 108(11), 2002-2013. <https://doi.org/10.1017/S0007114512000268>
- Luo, D. Z., Vermijlen, D., Ahishali, B., Triantis, V., Plakoutsi, G., Braet, F., Vanderkerken, K., & Wisse, E. (2000). On the cell biology of pit cells, the liver-specific NK cells. *World Journal of Gastroenterology*, 6(1), 1-11.
- Luo, W., Peterson, A., Garcia, B. A., Coombs, G., Kofahl, B., Heinrich, R., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Yost, H. J., & Virshup, D. M. (2007). Protein phosphatase 1 regulates assembly and function of the  $\beta$ -catenin degradation complex. *The EMBO Journal*, 26(6), 1511-1521. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601607>
- MacDonald, B. T., & He, X. (2012). Frizzled and LRP5/6 Receptors for Wnt/B-Catenin Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(12), a007880-a007880. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007880>
- Maher, M. T., Mo, R., Flozak, A. S., Peled, O. N., & Gottardi, C. J. (2010).  $\beta$ -Catenin Phosphorylated at Serine 45 Is Spatially Uncoupled from  $\beta$ -Catenin Phosphorylated in the GSK3 Domain: Implications for Signaling. *PLoS ONE*, 5(4), e10184. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010184>
- Mancinelli, R., Franchitto, A., Gaudio, E., Onori, P., Glaser, S., Francis, H., Venter, J., DeMorrow, S., Carpino, G., Kopriva, S., White, M., Fava, G., Alvaro, D., & Alpini, G. (2010). After Damage of Large Bile Ducts by Gamma-Aminobutyric Acid, Small Ducts Replenish the Biliary Tree by Amplification of Calcium-Dependent Signaling and de Novo Acquisition of Large Cholangiocyte Phenotypes. *The American Journal of Pathology*, 176(4), 1790-1800. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090677>
- Mani, A., Radhakrishnan, J., Wang, H., Mani, A., Mani, M.-A., Nelson-Williams, C., Carew, K. S., Mane, S., Najmabadi, H., Wu, D., & Lifton, R. P. (2007). LRP6 Mutation in a Family with Early Coronary Disease and Metabolic Risk Factors. *Science*, 315(5816), 1278-1282. <https://doi.org/10.1126/science.1136370.LRP6>
- Mason, J. O., Kitajewski, J., & Varmus, H. E. (1992). Mutational analysis of mouse Wnt-1 identifies two temperature-sensitive alleles and attributes of Wnt-1 protein essential for transformation of a mammary cell line. *Molecular biology of the cell*, 3(5), 521-533. <https://doi.org/10.1091/MBC.3.5.521>
- Masoro, E. J., Shimokawa, I., Higami, Y., McMahan, C. A., & Yu, B. P. (1995). Temporal Pattern of Food Intake Not a Factor in the Retardation of Aging Processes by Dietary Restriction. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 50A(1), B48-B53. <https://doi.org/10.1093/gerona/50A.1.B48>
- Masyuk, A. I., Masyuk, T. V., & LaRusso, N. F. (2008). Cholangiocyte primary cilia in liver health and disease. *Developmental Dynamics*, 237(8), 2007-2012. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21530>
- Matsuno, T., & Goto, I. (1992). Glutaminase and Glutamine Synthetase Activities in Human Cirrhotic Liver and Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Research*, 52(11), 1192-1194.
- McElhane, R. N., de Gier, J., & van Deene, L. . (1970). The Effect of Alterations in Fatty Acid Composition and Cholesterol Content on Permeability of Mycoplasma Laidlawii-B Cells and Derived Liposomes. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 219(1), 245-247.
- Mendoza, J., Albrecht, U., & Challet, E. (2010). Behavioural food anticipation in clock genes deficient mice: confirming old phenotypes, describing new phenotypes. *Genes, Brain and Behavior*, 9(5), 467-477. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2010.00576.x>

- Mendoza, J., Angeles-Castellanos, M., & Escobar, C. (2005). A daily palatable meal without food deprivation entrains the suprachiasmatic nucleus of rats. *European Journal of Neuroscience*, 22(11), 2855-2862. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04461.x>
- Mendoza, J., Drevet, K., Pévet, P., & Challet, E. (2008). Daily Meal Timing is Not Necessary for Resetting the Main Circadian Clock by Calorie Restriction. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(2), 251-260. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2007.01636.x>
- Mistlberger, R. E. (1994). Circadian Food-Anticipatory Activity: Formal Models and Physiological Mechanisms. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 18(2), 171-195. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(94\)90023-X](https://doi.org/10.1016/0149-7634(94)90023-X)
- Mistlberger, R. E. (2011). Neurobiology of food anticipatory circadian rhythms. *Physiology & Behavior*, 104(4), 535-545. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.04.015>
- Mistlberger, R. E., & Antle, M. C. (1999). Neonatal monosodium glutamate alters circadian organization of feeding, food anticipatory activity and photic masking in the rat. *Brain Research*, 842(1), 73-83. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)01836-3](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01836-3)
- Mistlberger, R. E., & Mumby, D. G. (1992). The limbic system and food-anticipatory circadian rhythms in the rat: ablation and dopamine blocking studies. *Behavioural Brain Research*, 47(2), 159-168.
- Mistlberger, R. E., & Rechtschaffen, A. (1984). Recovery of anticipatory activity to restricted feeding in rats with ventromedial hypothalamic lesions. *Physiology & Behavior*, 33(2), 227-235. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(84\)90104-5](https://doi.org/10.1016/0031-9384(84)90104-5)
- Mistlberger, R. E., & Rusak, B. (1987). Palatable daily meals entrain anticipatory activity rhythms in free-feeding rats: Dependence on meal size and nutrient content. *Physiology and Behavior*, 41(3), 219-226. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(87\)90356-8](https://doi.org/10.1016/0031-9384(87)90356-8)
- Mohawk, J. A., & Takahashi, J. S. (2011). Cell autonomy and synchrony of suprachiasmatic nucleus circadian oscillators. *Trends in Neurosciences*, 34(7), 349-358. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.05.003>
- Molina-Aguilar, C., Guerrero-Carrillo, M. de J., Espinosa-Aguirre, J. J., Olguin-Reyes, S., Castro-Belio, T., Vázquez-Martínez, O., Rivera-Zavala, J. B., & Díaz-Muñoz, M. (2017). Time-caloric restriction inhibits the neoplastic transformation of cirrhotic liver in rats treated with diethylnitrosamine. *Carcinogenesis*, 38(8), 847-858. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgx052>
- Monga, S. (Paul) S. (2014). Role and Regulation of  $\beta$ -Catenin Signaling During Physiological Liver Growth. *Gene Expression*, 16(2), 51-62. <https://doi.org/10.3727/105221614X13919976902138>
- Moore, R. Y., & Eichler, V. B. (1972a). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Research*, 42(1), 201-206. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(72\)90054-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(72)90054-6)
- Moore, R. Y., & Eichler, V. B. (1972b). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Research*, 42(1), 201-206. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(72\)90054-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(72)90054-6)
- Moore, R. Y., & Speh, J. C. (1993). GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neuroscience Letters*, 150(1), 112-116. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(93\)90120-A](https://doi.org/10.1016/0304-3940(93)90120-A)
- Morin, L. P., Shivers, K.-Y., Blanchard, J. H., & Muscat, L. (2006). Complex organization of mouse and rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*, 137(4), 1285-1297. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.10.030>

- Nardi, J., & Kafatos, F. (1976). Polarity and gradients in lepidopteran wing epidermis. *J. Embryol. exp. Morph.*, *36*(3), 469-487.
- Nejak-Bowen, K., & Monga, S. P. S. (2008). Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in hepatic organogenesis. *Organogenesis*, *4*(2), 92-99. <https://doi.org/10.4161/org.4.2.5855>
- Netter, F. H. (2014). *Atlas of Human Anatomy*. (Saunders & Elsevier, Eds.) (6 th).
- Neumann, C. J., & Cohen, S. M. (1997). Long-range action of Wingless organizes the dorsal-ventral axis of the Drosophila wing. *Development*, *124*(4), 871-880. <https://doi.org/10.1126/science.271.5257.1826>
- Niehrs, C., & Shen, J. (2010). Regulation of Lrp6 phosphorylation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *67*(15), 2551-2562. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0329-3>
- Nusse, R., & Varmus, H. (1982). Many tumors induced by mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host chromosome. *Cell*, *31*(1), 99-109.
- Okabe, H., Kinoshita, H., Imai, K., Nakagawa, S., Higashi, T., Arima, K., Uchiyama, H., Ikegami, T., Harimoto, N., Itoh, S., Ishiko, T., Yoshizumi, T., Beppu, T., Monga, S. P. S., Baba, H., & Maehara, Y. (2016). Diverse Basis of  $\beta$ -Catenin Activation in Human Hepatocellular Carcinoma: Implications in Biology and Prognosis. *PLOS ONE*, *11*(4), e0152695. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152695>
- Ozawa, M., Baribault, H., & Kemler, R. (1989). The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *The EMBO journal*, *8*(6), 1711-1717.
- Pablo Valdés Ramírez. (2009). *Cronobiología respuestas psicofisiológicas al tiempo*. (U. A. de N. León & P. Valdez Ramírez, Eds.) (Primera). Monterrey, Nuevo León, México.
- Park, C. S., Lee, M. S., Oh, H., Choi, K. Y., Yeo, M. G., Chun, J., & Song, W. K. (2007). Modulation of  $\beta$ -catenin by cyclin-dependent kinase 6 in Wnt-stimulated cells. *European Journal of Cell Biology*, *86*(2), 111-123. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2006.10.004>
- Pendergast, J. S., Nakamura, W., Friday, R. C., Hatanaka, F., Takumi, T., & Yamazaki, S. (2009). Robust Food Anticipatory Activity in BMAL1-Deficient Mice. *PLoS ONE*, *4*(3), e4860. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004860>
- Pérez-Mendoza, M., Rivera-Zavala, J. B., & Díaz-Muñoz, M. (2014). Daytime restricted feeding modifies the daily variations of liver gluconeogenesis: Adaptations in biochemical and endocrine regulators. *Chronobiology International*, *31*(7), 815-828. <https://doi.org/10.3109/07420528.2014.908898>
- Pieri, C. (1991). Food Restriction Slows Down Age-Related Changes in Cell Membrane Parameters. *Ann. NY Acad. Sci.*, *621*, 353-362. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01501.x>
- Pieri, C., Falasca, M., Moroni, F., Marcheselli, F., & Recchioni, R. (1990). Food restriction in female Wistar rats. III. Thermotropic transition of membrane lipid and 5'-nucleotidase activity in hepatocytes. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, *11*(2), 117-124. [https://doi.org/10.1016/0167-4943\(90\)90003-O](https://doi.org/10.1016/0167-4943(90)90003-O)
- Pizzuti, A., Amati, F., Calabrese, G., Mari, A., Colosimo, A., Silani, V., Giardini, L., Ratti, A., Penso, D., Calzá, L., Palka, G., Scarlato, G., Novelli, G., & Dallapiccola, B. (1996). cDNA characterization and chromosomal mapping of two human homologues of the Drosophila dishevelled polarity gene. *Hum Mol Genet*, *5*(7), 953-958.
- Planas-Paz, L., Orsini, V., Boulter, L., Calabrese, D., Pikiolek, M., Nigsch, F., Xie, Y., Roma, G., Donovan, A., Marti, P., Beckmann, N., Dill, M. T., Carbone, W., Bergling, S., Isken,

- A., Mueller, M., Kinzel, B., Yang, Y., Mao, X., et al. (2016). The RSPO–LGR4/5–ZNRF3/RNF43 module controls liver zonation and size. *Nature Cell Biology*, *18*(5), 467-479. <https://doi.org/10.1038/ncb3337>
- Portaluppi, F., Smolensky, M. H., & Touitou, Y. (2010). ETHICS AND METHODS FOR BIOLOGICAL RHYTHM RESEARCH ON ANIMALS AND HUMAN BEINGS. *Chronobiology International*, *27*(9-10), 1911-1929. <https://doi.org/10.3109/07420528.2010.516381>
- Preitner, N., Damiola, F., Luis-Lopez-Molina, Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U., & Schibler, U. (2002). The Orphan Nuclear Receptor REV-ERB $\alpha$  Controls Circadian Transcription within the Positive Limb of the Mammalian Circadian Oscillator. *Cell*, *110*(2), 251-260. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00825-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00825-5)
- Provost, E., Yamamoto, Y., Lizardi, I., Stern, J., D'Aquila, T. G., Gaynor, R. B., & Rimm, D. L. (2003). Functional Correlates of Mutations in  $\beta$ -Catenin Exon 3 Phosphorylation Sites. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(34), 31781-31789. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304953200>
- Rana, S., & Mahmood, S. (2010). Circadian rhythm and its role in malignancy. *Journal of Circadian Rhythms*, *8*(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1740-3391-8-3>
- Reed, K. R., Athineos, D., Meniel, V. S., Wilkins, J. A., Ridgway, R. A., Burke, Z. D., Muncan, V., Clarke, A. R., & Sansom, O. J. (2008). B-catenin deficiency, but not Myc deletion, suppresses the immediate phenotypes of APC loss in the liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(48), 18919-18923. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805778105>
- Reiners, J. J., & Busch, H. (1980). Transcriptional and posttranscriptional modulation of cytoplasmic ribonucleic acids in regenerating liver and Novikoff hepatoma. *Biochemistry*, *19*(5), 833-841. <https://doi.org/10.1021/bi00546a002>
- Reppert, S. M., & Weaver, D. R. (2001). Molecular Analysis of Mammalian Circadian Rhythms. *Annual Review of Physiology*, *63*, 647-676. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.63.1.647>
- Reppert, S. M., & Weaver, D. R. (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, *418*(6901), 935-941. <https://doi.org/10.1038/nature00965>
- Reya, T., Duncan, A. W., Laurie, A., Domen, J., Scherer, D. C., Willert, K., Hintz, L., Nusse, R., & Weissman, I. L. (2003). A role for Wnt signaling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, *423*(6938), 409-414.
- Richter, C. P. (1960). Biological clocks in medicine and psychiatry: shock-phase hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *46*, 1506-1530.
- Riggleman, B., Schedl, P., & Wieschaus, E. (1990). Spatial expression of the *Drosophila* segment polarity gene *armadillo* is posttranscriptionally regulated by *wingless*. *Cell*, *63*(3), 549-560.
- Rijsewijk, F., Schuermann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D., & Nusse, R. (1987). The *Drosophila* homology of the mouse mammary oncogene *int-1* is identical to the segment polarity gene *wingless*. *Cell*, *50*(4), 649-657. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90038-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90038-9)
- Rivera-Zavala, J. B., Báez-Ruiz, A., & Díaz-Muñoz, M. (2011). Changes in the 24 h Rhythmicity of Liver PPARs and Peroxisomal Markers When Feeding Is Restricted to Two Daytime Hours. *PPAR Research*, *2011*, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2011/261584>
- Rivera-Zavala, J. B., Molina-Aguilar, C., Pérez-Mendoza, M., Olguín-Martínez, M., Hernández-Muñoz, R., Báez-Ruiz, G. A., & Díaz-Muñoz, M. (2017). Daytime restricted

- feeding modifies the daily regulation of fatty acid  $\beta$ -oxidation and the lipoprotein profile in rats. *British Journal of Nutrition*, 117(07), 930-941. <https://doi.org/10.1017/S0007114517000800>
- Robertson, M. J., & Jerome, R. (1990). Biology and Clinical Relevance of Human Natural Killer Cells. *The Journal of The American Society of Hematology*, 76, 2421-2438.
- Ruel, L., Bourouis, M., Heitzler, P., Pantesco, V., & Simpson, P. (1993). Drosophila shaggy kinase and rat glycogen synthase kinase-3 have conserved activities and act downstream of Notch. *Nature*, 362(6420), 557-560.
- Russell, J. O., & Monga, S. P. (2017). Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Liver Development, Homeostasis, and Pathobiology. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis*, 9, 1-28. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117>
- Saito, M., Kato, H., & Suda, M. (1980). Circadian rhythm of intestinal disaccharidases of rats fed with adiaburnal periodicity. *The American journal of physiology*, 238(2), G97-G101.
- Schaffner, F., & Popper, H. (1961). Electron microscopic studies of normal and proliferated bile ductules. *The American Journal of Pathology*, 38(4), 1-5.
- Schenkelaars, Q., Fierro-Constain, L., Renard, E., Hill, A. L., & Borchiellini, C. (2015). Insights into Frizzled evolution and new perspectives. *Evolution & Development*, 17(2), 160-169. <https://doi.org/10.1111/ede.12115>
- Schibler, U., & Sassone-Corsi, P. (2002). A web of Circadian Pacemakers. *Cell*, 111(7), 919-922.
- Schöls, L., Mecke, D., & Gebhardt, R. (1990). Reestablishment of the heterogeneous distribution of hepatic glutamine synthetase during regeneration after CCl<sub>4</sub>-intoxication. *Histochemistry*, 94(1), 49-54. <https://doi.org/10.1007/BF00266789>
- Seeling, J. M. (1999). Regulation of B-Catenin Signaling by the B56 Subunit of Protein Phosphatase 2A. *Science*, 283(5410), 2089-2091. <https://doi.org/10.1126/science.283.5410.2089>
- Sell, S. (1990). Is There a Liver Stem Cell? *Cancer Research*, (50), 3811-3815.
- Semënov, M. V., & Snyder, M. (1997). Human Dishevelled Genes Constitute a DHR-Containing Multigene Family. *Genomics*, 42(2), 302-310. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.4713>
- Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R., & Ben-Ze'ev, A. (1999). The cyclin D1 gene is a target of the -catenin/LEF-1 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(10), 5522-5527. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.10.5522>
- Sinturel, F., Gerber, A., Mauvoisin, D., Wang, J., Gatfield, D., Stubblefield, J. J., Green, C. B., Gachon, F., & Schibler, U. (2017). Diurnal Oscillations in Liver Mass and Cell Size Accompany Ribosome Assembly Cycles. *Cell*, 169(4), 651-663.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.015>
- Song, H., Hasson, P., Paroush, Z., & Courey, A. J. (2004). Groucho Oligomerization Is Required for Repression In Vivo. *Molecular and Cellular Biology*, 24(10), 4341-4350. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.10.4341-4350.2004>
- Spindler, S. R. (2001). Calorie restriction enhances the Expression of Key Metabolic Enzymes Associated with Protein Renewal during Aging. *Ann. NY Acad. Sci.*, 928, 296-304.
- Städeli, R., Hoffmans, R., & Basler, K. (2006). Transcription under the Control of Nuclear Arm/ $\beta$ -Catenin. *Current Biology*, 16(10), R378-R385.

- <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.04.019>
- Stamos, J. L., & Weis, W. I. (2013). The B-Catenin Destruction Complex. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(1), a007898-a007898. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007898>
- Steinberg, M. S., & Takeichi, M. (1994). Experimental specification of cell sorting, tissue spreading, and specific spatial patterning by quantitative differences in cadherin expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(1), 206-209. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.1.206>
- Stephan, F. K. (1997). Calories Affect Zeitgeber Properties of the Feeding Entrained Circadian Oscillator. *Physiology & Behavior*, 62(5), 995-1002. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(97\)00204-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(97)00204-7)
- Stephan, F. K., & Zucker, I. (1972). Circadian Rhythms in Drinking Behavior and Locomotor Activity of Rats Are Eliminated by Hypothalamic Lesions. *Proc Nat Acad Sci USA*, 69(6), 1583-1586.
- Stifani, S., Blaumueller, C. M., Redhead, N. J., Hill, R. E., & Artavanis-Tsakonas, S. (1996). Human homologs of a Drosophila Enhancer of Split gene product define a novel family of nuclear proteins. *Nature Genetics*, 2(2), 119-127. <https://doi.org/10.1038/ng0496-417>
- Strecker, G. J., Wuarin, J., & Dudek, F. E. (1997). GABA A -Mediated Local Synaptic Pathways Connect Neurons in the Rat Suprachiasmatic Nucleus. *J Neurophysiol*, 78(4), 2217-2220.
- Sujino, M., Masumoto, K., Yamaguchi, S., van der Horst, G. T. J., Okamura, H., & Inouye, S.-I. T. (2003). Suprachiasmatic Nucleus Grafts Restore Circadian Behavioral Rhythms of Genetically Arrhythmic Mice. *Current Biology*, 13(8), 664-668. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00222-7](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00222-7)
- Takemaru, K., Yamaguchi, S., Lee, Y. S., Zhang, Y., Carthew, R. W., & Moon, R. T. (2003). Chibby, a nuclear B-catenin-associated antagonist of the Wnt/Wingless pathway. *Nature*, 422(6934), 905-909.
- Theise, N. D., Saxena, R., Portmann, B. C., Thung, S. N., Yee, H., Chiriboga, L., Kumar, a, & Crawford, J. M. (1999). The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 30(6), 1425-1433. <https://doi.org/10.1002/hep.510300614>
- Thompson, M. D., & Monga, S. P. S. (2007). WNT/ $\beta$ -catenin signaling in liver health and disease. *Hepatology*, 45(5), 1298-1305. <https://doi.org/10.1002/hep.21651>
- Thorne, C. A., Hanson, A. J., Schneider, J., Tahinci, E., Orton, D., Cselenyi, C. S., Jernigan, K. K., Meyers, K. C., Hang, B. I., Alex, G., Kim, K., Melancon, B., Ghidu, V. P., Sulikowski, G. A., Lafleur, B., Salic, A., Lee, L. A., Iii, D. M. M., & Lee, E. (2010). NIH Public Access. *Nat Chem Biol*, 6(11), 829-836. <https://doi.org/10.1038/nchembio.453>
- Travis, A., Amsterdam, A., Belanger, C., & Grosschedl, R. (1991). LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor alpha enhancer function. *Genes & Development*, 5(5), 880-894. <https://doi.org/10.1101/gad.5.5.880>
- Valenta, T., Hausmann, G., & Basler, K. (2012). The many faces and functions of  $\beta$ -catenin. *The EMBO Journal*, 31(12), 2714-2736. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.150>
- van Amerongen, R., Mikels, A., & Nusse, R. (2008). Alternative Wnt Signaling Is Initiated by Distinct Receptors. *Science Signaling*, 1(35), re9-re9.

- <https://doi.org/10.1126/scisignal.135re9>
- van de Wetering, M., & Clevers, H. (1992). Sequence-specific interaction of the HMG box proteins TCF-1 and SRY occurs within the minor groove of a Watson-Crick double helix. *The EMBO journal*, *11*(8), 3039-3044.
- van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Dooijes, D., & Clevers, H. (1991). Identification and cloning of TCF-1, a T lymphocyte- specific transcription factor containing a sequence-specific HMG box. *The EMBO Journal*, *10*(1), 123-132. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-3271-3\\_17](https://doi.org/10.1007/978-90-481-3271-3_17)
- van Es, J. H., van Gijn, M. E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., Robine, S., Winton, D. J., Radtke, F., & Clevers, H. (2005). Notch/ $\gamma$ -secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature*, *435*(7044), 959-963. <https://doi.org/10.1038/nature03659>
- van Veelen, W., Le, N. H., Helvensteijn, W., Blonden, L., Theeuwes, M., Bakker, E. R. M., Franken, P. F., van Gorp, L., Meijlink, F., van der Valk, M. a, Kuipers, E. J., Fodde, R., & Smits, R. (2011). -catenin tyrosine 654 phosphorylation increases Wnt signalling and intestinal tumorigenesis. *Gut*, *60*(9), 1204-1212. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.233460>
- Vujovic, N., Davidson, A. J., & Menaker, M. (2008). Sympathetic input modulates, but does not determine, phase of peripheral circadian oscillators. *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *295*(1), R355-R360. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00498.2007>
- Wang, X., Foster, M., Al-Dhalimy, M., Lagasse, E., Finegold, M., & Grompe, M. (2003). The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100* Suppl , 11881-11888. <https://doi.org/10.1073/pnas.1734199100>
- Wharton, K. A. J. (2003). Runnin' with the Dvl: Proteins That Associate with Dsh/Dvl and Their Significance to Wnt Signal Transduction. *Developmental Biology*, *253*(1), 1-17. <https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0869>
- Wieschaus, E., Nüsslein-Volhard, C., & Jürgens, G. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cutical in drosophila melanogaster III. Zygotic loci on the X-chromosome and fourth chromosome. *Wilehm Roux Arch Dev Biol*, *193*(5), 296-307.
- Willert, K., Brown, J. D., Danenberg, E., Duncan, A. W., Weissman, I. L., Reya, T., Yates, J. R., & Nusse, R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*, *423*(6938), 448-452. <https://doi.org/10.1038/nature01611>
- Wisse, E., van't Noordende, J. M., van der Meulen, J., & Daems, W. T. (1976). The pit cell: Description of a new type of cell occurring in rat liver sinusoids and peripheral blood. *Cell and Tissue Research*, *173*(4), 423-435. <https://doi.org/10.1007/BF00224305>
- Wood, P. A., Xiaoming, Y., & Hrushesky, W. J. M. (2009). Clock Genes and Cancer. *Integrative Cancer Therapies*, *8*(4), 303-308. <https://doi.org/10.1177/1534735409355292>
- Wood, P. A., Yang, X., Taber, A., Oh, E.-Y., Ansell, C., Ayers, S. E., Al-Assaad, Z., Carnevale, K., Berger, F. G., Pena, M. M. O., & Hrushesky, W. J. M. (2008). Period 2 Mutation Accelerates ApcMin/+ Tumorigenesis. *Molecular Cancer Research*, *6*(11), 1786-1793. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-08-0196>
- Woodgett, J. R. (1990). Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/Factor A. *The EMBO journal*, *9*(8), 2431-2438. <https://doi.org/10.1023/A:1006321324190>

- Wu, C. (1964). Glutamine Synthetase IV . Its Formation in Rat Liver Following Synthetase Partial Hepatectomy and During Repletion adult rats made to divide or to grow rapidly procedures on the enzyme . in rat liver following partial hepatectomy . in activity in the rege. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 106, 402-409.
- Wu, C., & Nusse, R. (2002). Ligand Receptor Interactions in the Wnt Signaling Pathway in *Drosophila*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(44), 41762-41769. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207850200>
- Xing, Y., Takemaru, K.-I., Liu, J., Berndt, J. D., Zheng, J. J., Moon, R. T., & Xu, W. (2008). Crystal Structure of a Full-Length  $\beta$ -Catenin. *Structure*, 16(3), 478-487. <https://doi.org/10.1016/j.str.2007.12.021>
- Xu, C., Chakravarty, K., Kong, X., Tuy, T. T., Arinze, I. J., Bone, F., & Massillon, D. (2007). Several Transcription Factors Are Recruited to the Glucose-6-Phosphatase Gene Promoter in Response to Palmitate in Rat Hepatocytes and H4IIE Cells. *Journal of Nutrition*, 137(3), 554-559. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210229>. PMID
- Xu, L. B., & Liu, C. (2014). Role of liver stem cells in hepatocarcinogenesis. *World Journal of Stem Cells*, 6(5), 579-590. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i5.579>
- Xu, Y., & Nusse, R. (1998). The Frizzled CRD domain is conserved in diverse proteins including several receptor tyrosine kinases. *Current Biology*, 8(12), 405-406.
- Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Blick, G. D., Sakaki, Y., Menaker, M., & Tei, H. (2000). Resetting Central and Peripheral Circadian Oscillators in Transgenic Rats. *Science*, 288(5466), 682-685. <https://doi.org/10.1126/science.288.5466.682>
- Yang, X., Wood, P. A., Ansell, C. M., Ohmori, M., Oh, E.-Y., Xiong, Y., Berger, F. G., Pena, M. M. O., & Hrushesky, W. J. M. (2009). B-Catenin Induces B-TrCP-Mediated PER2 Degradation Altering Circadian Clock Gene Expression in Intestinal Mucosa of ApcMin/+ Mice. *Journal of Biochemistry*, 145(3), 289-297. <https://doi.org/10.1093/jb/mvn167>
- Yang, Y., Lijam, N., Sussman, D. J., & Tsang, M. (1996). Genomic organization of mouse Dishevelled genes. *Gene*, 180(1-2), 121-123. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(96\)00430-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00430-1)
- Yap, A. S., Briehner, W. M., & Gumbiner, B. M. (1997). MOLECULAR AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF CADHERIN-BASED ADHERENS JUNCTIONS. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 13(1), 119-146. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.13.1.119>
- Ye, X., Wang, Y., & Nathans, J. (2010). The Norrin/Frizzled4 signaling pathway in retinal vascular development and disease. *Trends in Molecular Medicine*, 16(9), 417-425. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.07.003>
- Ying, Y., Zhu, H., Liang, Z., Ma, X., & Li, S. (2015). GLP1 protects cardiomyocytes from palmitate-induced apoptosis via Akt/GSK3b/b-catenin pathway. *Journal of Molecular Endocrinology*, 55(3), 245-262. <https://doi.org/10.1530/JME-15-0155>
- Yoo, S.-H., Yamazaki, S., Lowrey, P. L., Shimomura, K., Ko, C. H., Buhr, E. D., Siepk, S. M., Hong, H.-K., Oh, W. J., Yoo, O. J., Menaker, M., & Takahashi, J. S. (2004). PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(15), 5339-5346. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308709101>
- Yu, H.-M. I., Jerchow, B., Sheu, T.-J., Liu, B., Costantini, F., Puzas, J. E., Birchmeier, W., & Hsu, W. (2005). The role of Axin2 in calvarial morphogenesis and craniosynostosis.



- Development*, 132(8), 1995-2005. <https://doi.org/10.1242/dev.01786>
- Zeng, G., Awan, F., Otruba, W., Muller, P., Apte, U., Tan, X., Gandhi, C., Demetris, A. J., & Monga, S. P. S. (2007). Wnt'er in Liver: Expression of Wnt and frizzled genes in mouse. *Hepatology*, 45(1), 195-204. <https://doi.org/10.1002/hep.21473>
- Zeng, L., Fagotto, F., Jho, E. H., Thearle, M., Zhang, T., Hsu, W., Gumbiner, B. M., Costantini, F., Vasicek, T., Perry, W. L. I., Lee, J. J., & Tilghman, S. M. (1997). The mouse Fused Locus Encodes Axin, an Inhibitor of the Wnt Signaling Pathway That Regulates Embryonic Axis Formation. *Molecular Biology of the Cell*, 90(1), 181-192.
- Zhu, G., Wang, Y., Huang, B., Liang, J., Ding, Y., Xu, A., & Wu, W. (2012). A Rac1/PAK1 cascade controls  $\beta$ -catenin activation in colon cancer cells. *Oncogene*, 31(8), 1001-1012. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.294>

## **19. ANEXOS**

### **ANEXO A. CÉLULAS HEPÁTICAS NO PARENQUIMALES**

#### **1. Sinusoides**

Los sinusoides hepáticos son canales vasculares de baja presión en los cuales la sangre venosa se combina con la sangre arterial. Se encuentran revestidos por células endoteliales y están flanqueados por los hepatocitos. El espacio angosto ubicado entre las membranas del endotelio sinusoidal y los cordones de hepatocitos es denominado espacio perisinusoidal o espacio de Disse, llamado así en honor del anatomista alemán Joseph Hugo Vincent Disse (1852-1912) (Haubrich, 2004). El espacio de Disse está estructurado con tejido conectivo (fibras de colágeno) y fibroblastos, a través de él fluye la sangre plasmática, la cual es alcanzada por las microvellosidades de los hepatocitos.

Dentro de los sinusoides se incluye los 4 tipos siguientes de células: 1) células endoteliales, 2) macrófagos residentes, llamados células de Kupffer, 3) linfocitos granulares asociados al hígado, llamados células de PIT y 4) células estelares, también llamadas células de Ito.

#### **1.1 Células endoteliales de los sinusoides hepáticos o células endoteliales sinusoidales (SEC)**

Las SEC son células aplanadas y elongadas con un núcleo pequeño, las cuales forman un revestimiento continuo del sinusoides (Bash, 1999). Constituyen el 70% de las células sinusoidales y el 15-20% del total de las células hepáticas, aunque sólo integran el 2.8% del volumen total del hígado (Bash, 1999). Su arreglo histológico muestra un intercalamiento con poros de de 0.1  $\mu\text{m}$  de diámetro. Al conjunto de dichos poros se les conoce como placas de Sieve (conjunto de entre 10-50 poros). Cuando los poros son un poco más grandes (0.5  $\mu\text{m}$ ), se les conoce como fenestraciones. Las SEC constituyen una barrera de filtración entre las macromoléculas, las células sanguíneas presentes en el lumen del sinusoides y los hepatocitos. Lo cual previene el contacto directo entre ellos y promueve el intercambio de sustancias diversas.

Los poros pequeños, las fenestraciones y los espacios intercelulares, son esenciales en la filtración de la sangre que los circunda. De manera que, pueden regular el intercambio de fluidos entre el sinusoides y el hepatocito. Además, permiten el paso de macromoléculas a la superficie del hepatocito y retienen a los componentes celulares y agregados moleculares

como los quilomicrones dentro del lumen sinusoidal. Las SEC tienen una actividad fagocítica y pinocítica incrementada debido a la presencia de diversos receptores de membrana. Adicionalmente, las SEC realizan funciones de síntesis y secreción de citocinas, componentes de la matriz y sustancias vasoactivas.

## **2. Células de Kupffer**

Las células de Kupffer son macrófagos residentes del hígado, localizados en las paredes de los sinusoides, principalmente en la zona periportal hepática. Estas células, presentan formas variables, su tiempo de vida media es de 12.4 días y son anti CD68+. Las células de Kupffer constituyen aproximadamente un 25% de las células sinusoidales, un 8-12% de las células totales del hígado y sólo un 2.1% del volumen hepático (Bash, 1999).

Las células de Kupffer tienen un rol esencial en la respuesta inmune innata, ya que remueven partículas ( $>1\mu\text{m}$  de diámetro) de los sinusoides hepáticos, debido a que fagocitan patógenos que llegan al hígado a través de la circulación portal o arterial (Kuntz & Kuntz, 2008). Las células de Kupffer, también funcionan como la primera línea de defensa contra las partículas y el material inmunoreactivo que llega al hígado por el tracto gastrointestinal a través de la vena porta.

Adicionalmente, estas células realizan funciones como la pinocitosis, la liberación de proteínas, enzimas y sustancias señalizadoras, así como la eliminación de toxinas, eritrocitos senescentes o dañados, antígenos, complejos antígeno-anticuerpo y purinas (Kuntz & Kuntz, 2008) de la circulación sistémica.

Por lo tanto, un cambio funcional en las células de Kupffer se asocia con una gran variedad de estados patológicos en el hígado.

## **3. Células estelares hepáticas (HS)**

Las HS también han sido llamadas como células de Ito, células perisinusoidales, lipocitos, pericitos o células almacenadoras de grasa.

Las HS constituyen cerca del 3-8% del número total de células hepáticas, pero sólo un 1.4% del volumen del hígado (Kuntz & Kuntz, 2008). Su proporción es de 12-20 HS por cada hepatocito. Estas células miden entre 5-10  $\mu\text{m}$ , su fenotipo es angular o en forma de huso con procesos citoplasmáticos largos y delgados, debido a lo cual toman uno de sus nombres.

Las HS se caracterizan por contener numerosas gotas de grasa y vitamina A (palmitato de retinol) en el citosol, lo que les permite ser visualizadas fácilmente por la emisión de autofluorescencia.

Las HS se localizan en el espacio de Disse, pero presentan cierta heterogeneidad de acuerdo a su distribución en el acino hepático, ya que existe un número mayor de HS en la zona periportal hepática, respecto a la zona pericentral del acino. Además, en la zona periportal hepática el reservorio de vitamina A y lípidos de las HS es mayor (Kuntz & Kuntz, 2008) respecto al de las HS localizadas en la zona pericentral del acino hepático.

En condiciones fisiológicas las HS son descritas como células en estado quiescente, cuya función es la regulación de la homeostasis de vitamina A, del tono microvascular y la regeneración celular. Sin embargo, en el daño hepático las HS se transforman en miofibroblastos, proceso al que se le conoce como activación. Las HS activadas son capaces de sintetizar y secretar diferentes tipos de colágeno (I, III and IV), fibronectina y laminina, lo que las convierte en las productoras y remodeladoras principales de la matriz extracelular en procesos patológicos como la fibrosis hepática.

#### **4. Linfocitos granulares o células de pit**

La población de células asesinas naturales (NK) residentes del hígado, también es llamada como células de pit (Wisse, van't Noordende, van der Meulen, & Daems, 1976), NK hepáticas y linfocitos granulares, este último nombre debido a los gránulos presentes en su citoplasma.

Las células de pit se encuentran adheridas a las paredes del endotelio por medio de pseudópodos, su diámetro promedio es de 7  $\mu\text{m}$ , son CD16+ y su forma es variada. Estas células presentan una proporción 1:10, respecto a las células de Kupffer (Kuntz & Kuntz, 2008).

Debido a que son NK su función es destruir células extrañas, tumorales o necróticas. Tal función citotóxica es espontánea, aunque puede ser incrementada significativamente por diversas citocinas (Robertson & Jerome, 1990) como la interleucina 2 (IL-2). Por lo tanto, las células de pit son consideradas como un tipo de células NK activadas naturalmente.

La posición estratégica de las células de pit en los sinusoides hepáticos las postula como la primera línea de defensa celular contra las células cancerosas metastásicas (Luo et al., 2000). No obstante, su papel en diversas patologías hepáticas no ha sido explorado completamente.

### **5. Células biliares o colangiocitos**

Los colangiocitos son células epiteliales que delimitan los ductos biliares. Estas células integran entre el 3-5% del total de las células del hígado, teniendo como función principal la formación, modificación y transporte de bilis.

Morfológicamente, los colangiocitos son heterogéneos y pueden clasificarse en colangiocitos pequeños (diámetro  $<15\ \mu\text{m}$ ) y en colangiocitos grandes (diámetro  $>15\ \mu\text{m}$ ) (Alpini et al., 1996). Los colangiocitos pequeños son cuboidales, están poco especializados y tienen un gran radio núcleo/citoplasma. Por el contrario, los colangiocitos grandes tienen forma columnar (Schaffner & Popper, 1961), una gran cantidad de organelos y su radio núcleo/citoplasma es pequeño (Benedetti et al., 1996). Además, los colangiocitos presentan cilios, los cuales actúan como químicos y mecanosensores en el lumen del ducto biliar (Masyuk, Masyuk, & LaRusso, 2008). Funcionalmente, los colangiocitos grandes son más susceptibles al daño, que los colangiocitos pequeños (Mancinelli et al., 2010). Sin embargo, estos últimos reponen el epitelio biliar cuando los colangiocitos grandes son dañados.

En el hígado, los colangiocitos son normalmente quiescentes, pero pueden responder al daño o al estrés potenciando su proliferación (Alvaro et al., 2007). Además, se convierten en reactivos y adquieren un fenotipo parecido al neuroendócrino propiciando la secreción de un gran número de péptidos.

En condiciones patológicas, los colangiocitos contribuyen en las enfermedades del tracto biliar como la ductopenia, la displasia o la transformación maligna de los ductos biliares (Lazaridis, Strazzabosco, & LaRusso, 2004).

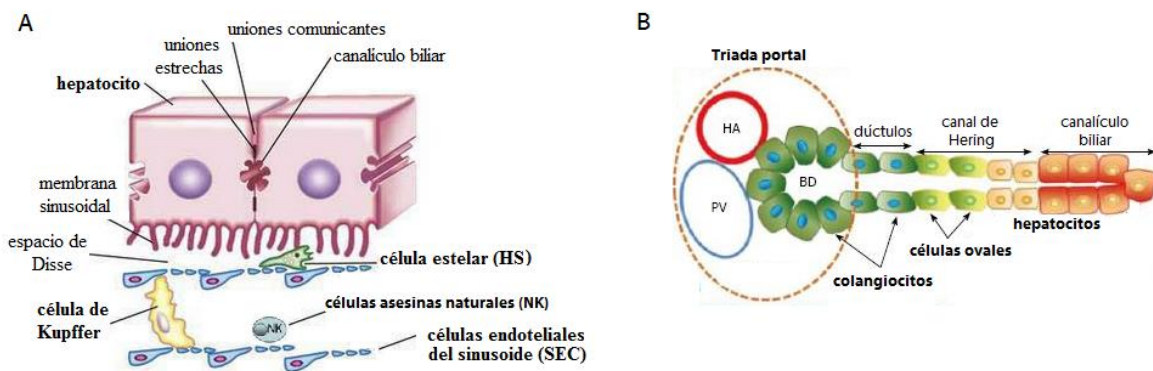
### **6. Células progenitoras hepáticas o células ovals**

Las células madre hepáticas (HSC) (Sell, 1990) o células progenitoras hepáticas adultas (HPC) en humanos (De Vos & Desmet, 1992), son el símil de las células ovals en los roedores (Faber, 1956). Dentro de sus características, se encuentra el presentar un núcleo de forma ovalada, un radio núcleo-citoplasma grande y un tamaño de  $10\ \mu\text{m}$ , aproximadamente.

Además, expresan marcadores de epitelio biliar como la citoqueratina 19 (CK19), así como marcadores de hepatocitos inmaduros y de linajes de hepatocitos como la  $\alpha$ -fetoproteína (AFP) (Wang et al., 2003) y la albúmina, respectivamente. Las HSC se localizan en la zona portal hepática, específicamente en el canal de Hering (Theise et al., 1999), el cual, al igual que el espacio de Disse, la vena central y las células endoteliales son consideradas como los nichos celulares de las HSC (Chen et al., 2017).

La función de las HSC es la homeostasis y la regeneración hepática, posterior a algún tipo de daño químico o patológico sufrido por el hígado. Adicionalmente, bajo ciertas circunstancias, como el tratamiento con carcinógenos (Faber, 1956) éstas células pueden ser inducidas a funcionar como potenciales progenitores hepáticos residentes.

La distribución espacial de algunas células hepáticas parenquimales y no parenquimales se encuentra representada en la Figura 1.



**Figura 1. Localización espacial de las células hepáticas parenquimales y no parenquimales.** (A) Los hepatocitos (células parenquimales) se encuentran unidos y comunicados unos a otros a través de uniones estrechas y uniones comunicantes, respectivamente. La membrana del hepatocito que colinda con los sinusoides hepáticos es llamada membrana sinusoidal o basolateral. Dentro de las células no parenquimales se encuentran las células endoteliales de los sinusoides hepáticos (SEC) y los macrófagos residentes del hígado (células de Kupffer) que se ubican en el lumen del sinusoides, así como las células estelares hepáticas (HS) que se encuentran en el espacio de Disse. (B) Otras células no parenquimales presentes en el hígado son los colangiocitos, los cuales se encuentran recubriendo al conducto biliar (BD) y las células ovales, las cuales se localizan entre los hepatocitos y los colangiocitos en la zona llamada el canal de Hering. Tanto los colangiocitos como las células ovales se localizan cerca de la triada portal hepática (ver siguiente sección). Tomado y modificado de (Feldman, Friedman, & Brandt, 2010) y (Xu & Liu, 2014). HA= arteria hepática, PV= vena portal.

## ANEXO B. COMPONENTES DE LA VÍA WNT/ $\beta$ -CATENINA

### **1. Los ligandos Wnt**

Los ligandos Wnt son una familia de glicoproteínas, las cuales se definieron en base a su secuencia de aminoácidos, más que por sus propiedades funcionales. Actualmente, se conocen 19 ligandos Wnt, siendo el miembro fundador de esta familia el ligando Wnt1. Las glicoproteínas Wnt tienen una longitud promedio de 350 aminoácidos y un peso molecular de entre 39 a 46 kDa (Coudreuse & Korswagen, 2007). Además, entre sus características se encuentran: 1) la presencia de 22 residuos de cisteína en su estructura, lo que les permite un plegamiento adecuado a través de la formación de puentes disulfuro (Mason, Kitajewski, & Varmus, 1992), 2) la presencia de diversos sitios de N-glicosilación (Coudreuse & Korswagen, 2007) (Tabla 2), 3) la inclusión de una señal peptídica para su secreción, 4) la susceptibilidad a ser palmitoilados (modificación postraduccional por adición de ácidos grasos) y por ende un carácter hidrófobo que los hace insolubles. La hidrofobicidad de las proteínas Wnt les permite unirse fácilmente a la membrana celular externa, a la matriz extracelular y a otros dominios membranales como los rafts lipídicos, pero limita su difusión cuando se encuentran como monómeros (Willert et al., 2003). Asimismo, las mutaciones en el residuo aminoácido requerido para su palmitoilación, disminuyen su interacción con los receptores Fz (Cong, Schweizer, & Varmus, 2004).

Los ligandos Wnt son considerados como morfógenos (Neumann & Cohen, 1997) que se secretan de manera autócrina o parácrina para activar vías de señalización a una distancia de 20-30 células de la fuente morfogénica (Neumann & Cohen, 1997).

### **2. Los receptores Frizzled (Fz)**

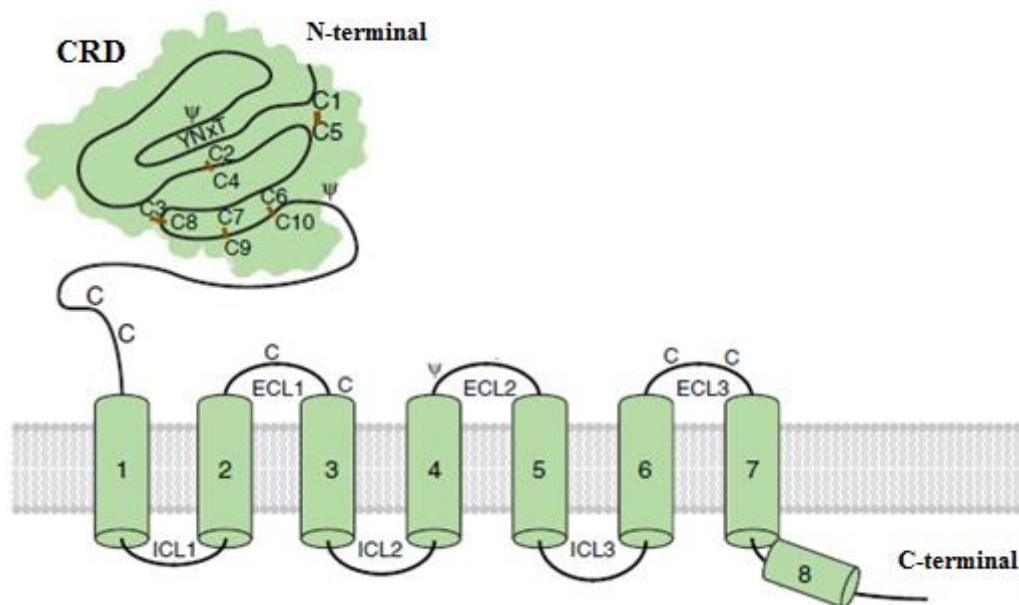
Los receptores Fz son proteínas de 7 pasos transmembranales, cuya estructura es análoga a los receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Una característica de los receptores Fz es la presencia de un dominio rico en cisteína (CRD) en el lado extracelular de la membrana. El CRD se integra por un motivo de 120-125 residuos de aminoácidos, de los cuales 10 son cisteínas conservadas que forman 5 puentes disulfuro entre ellas (Figura 4).

El CRD está conservado a lo largo de esta familia de receptores Fz (Xu & Nusse, 1998) y se ha propuesto como la región principal de unión al ligando.

<b>Proteína Wnt</b>	<b>Longitud (secuencia de aminoácidos)</b>	<b>Peso molecular (kDa)</b>	<b>Residuos de cisteína</b>	<b>Sitios de N-glicosilación</b>
Wnt1	370	41	23	4
Wnt2	360	40	24	1
Wnt2b	389	44	26	1
Wnt3	355	40	24	2
Wnt3a	352	39	25	2
Wnt4	351	39	25	2
Wnt5a	379	42	24	3
Wnt5b	359	40	24	3
Wnt6	364	40	25	2
Wnt7a	349	39	25	3
Wnt7b	349	39	25	3
Wnt8a	34	40	23	1
Wnt8b	350	39	24	2
Wnt9a	365	40	24	1
Wnt9b	359	39	25	1
Wnt10a	417	47	24	2
Wnt10b	389	43	24	2
Wnt11	354	39	26	5
Wnt16	364	41	26	1

**Tabla 1. Características estructurales de las proteínas Wnt.** En el ratón se encuentran 19 miembros de las proteínas Wnt, agrupados en 12 subfamilias. La longitud de las proteínas Wnt, así como su peso molecular varía ligeramente entre ellas. Sin embargo, todos los ligandos Wnt presentan residuos de cisteína y sitios para modificaciones posttraduccionales como la N-glicosilación. Tomado y modificado de (Coudreuse & Korswagen, 2007).





**Figura 1. Estructura del receptor Frizzled (Fz).**

Los receptores Fz se conforman por 7 pasos transmembranales (cilindros verdes del 1-7). En el lado extracelular de la membrana plasmática, se ubica el dominio rico en cisteína (CRD), en el cual 10 residuos de cisteína (C1-C10) invariables, forman 5 puentes disulfuro (líneas rojas dentro del CRD). Ψ, sitios potenciales de N-glicosilación. ECL=asa extracelular. ICL=asa intracelular. Tomado y modificado de (MacDonald & He, 2012).

Los genes *frizzled* fueron identificados inicialmente en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), aunque actualmente se ha reportado que se encuentran a lo largo de todo el reino animal (Schenkelaars et al., 2015), estando ausentes en las levaduras y en las plantas. En el humano y en el murino, existen 10 genes que codifican para los receptores Fz (Fz1-Fz10), los cuales se encuentran exclusivamente en la membrana celular, localizándose en la superficie de células responsivas a Wnt.

Los receptores Fz son activados por múltiples ligandos, entre ellos los más importantes son los ligandos Wnt, por los cuales tienen una gran afinidad ( $K_d$  1-10 nM) (Chi-hwa Wu & Nusse, 2002). No obstante, la proteína Norrin (Ye, Wang, & Nathans, 2010), la cual es codificada por el gene de la enfermedad de Norrie (Berger et al., 1992) y que presenta un motivo de cisteína, también puede actuar como un ligando que se une al receptor Fz y activa la señalización por Wnt.

La unión de los ligandos Wnt a los CDRs, sirve para incrementar la concentración local del ligando en la vecindad del receptor. Sin embargo, la unión del ligando a un segundo sitio del receptor es requerida para propiciar el cambio estructural del GPCR y activar la transducción de la señal. En este sentido, las proteínas heterotriméricas  $G_0$ , son los mayores transductores de Fz a lo largo de las especies (Koval & Katanaev, 2011). Las 10 proteínas Fz de humano, se acoplan a las proteínas  $G_i/o$  (Koval et al., 2011), aunque la unión a proteínas  $G_q$  también ha sido predicha para los receptores Fz4, Fz5 y Fz6.

Adicionalmente a la activación de la vía Wnt canónica, los receptores Fz también son requeridos para las vías Wnt no canónicas, las cuales son independientes de  $\beta$ -catenina (van Amerongen, Mikels, & Nusse, 2008).

La regulación a la baja de los receptores Fz puede llevarse a cabo por endocitosis (Blitzer & Nusse, 2006) o a través de antagonistas naturales de la señalización por Wnt, como son las proteínas parecidas a Frizzled (sFRPs), las cuales se conforman principalmente por CDRs y compiten con Fz por los ligandos Wnt (Kawano, 2003).

### **3. Los correceptores de proteínas parecidas al receptor de las lipoproteínas de baja densidad 5 y 6 (LRP5/6)**

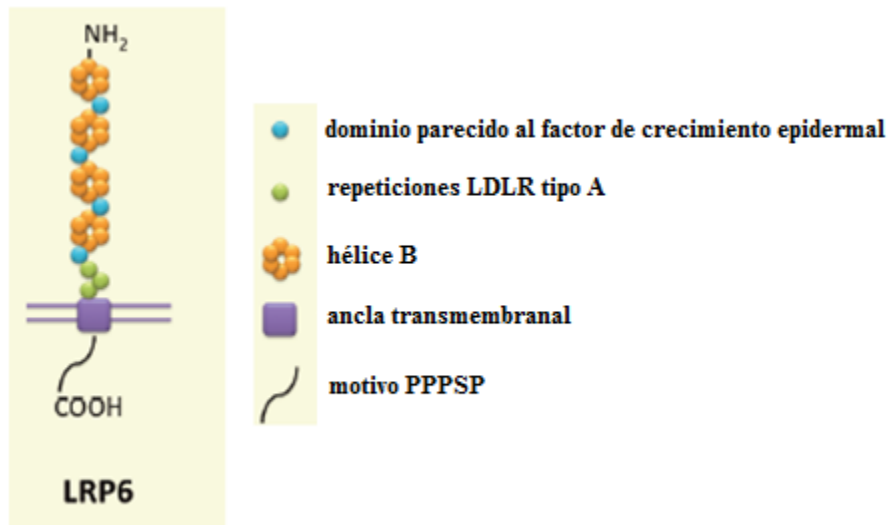
A nivel membranal, la señalización por Wnt también se ve influenciada por los LRP y por el receptor huérfano parecido a tirosina cinasa (Ror). Los LRP5/6 son correceptores para la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, mientras que Ror1/2 son correceptores para las vías Wnt no canónicas (Grumolato et al., 2010).

Los correceptores LRP5 y LRP6 son proteínas de un solo paso transmembranal, miembros únicos de la familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLR).

La parte extracelular de los LRP5/6 tiene más de 1600 aminoácidos, los cuales tienen una similitud del 70% (He et al., 2004), entre ellos. Estos correceptores presentan 3 tipos de dominios diferentes en su parte extracelular: 1) las repeticiones LDLR tipo A, que permiten la unión al ligando; 2) el dominio similar al factor de crecimiento epidermal (EGF) que se relaciona con la liberación de los ligandos del endosoma en un proceso pH-dependiente y 3) el dominio  $\beta$ -hélice tipo YWTD (Figura 5), el cual está relacionado con la disociación del complejo ligando-receptor en un proceso dependiente de pH (Go & Mani, 2012).

Cuando el complejo trimérico formado por el ligando Wnt se une a su receptor Fz y al correceptor LRP5/6, la cola citoplasmática del correceptor LRP se fosforila por las cinasas

caseína quinasa 1 (CK1) y glucógeno sintasa quinasa 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) en diversos motivos Pro-Pro-Ser-Pro (PPPSP) (Niehrs & Shen, 2010). Dicha fosforilación promueve que en la vía Wnt canónica se reclute la proteína de andamiaje Dishevelled (Dvl), la cual inicia el proceso de desestabilización del complejo de destrucción de la  $\beta$ -catenina. De tal manera que la  $\beta$ -catenina se acumula en el citosol y se hace viable para traslocar al núcleo, donde actúa como coactivador transcripcional del factor de células T (TCF) y del factor potenciador linfoide (LEF) (Niehrs & Shen, 2010).



**Figura 2. Estructura del corresponsor de las proteínas parecidas a la lipoproteína de baja densidad 6 (LRP6).**

El lado extracelular del LRP6, miembro de la familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL), presenta los dominios estructurales siguientes: 1) repeticiones LDLR tipo A, que le permiten su unión al ligando; 2) dominio parecido al factor de crecimiento epidermal (EGF), relacionado con la liberación pH-dependiente de los ligandos en el endosoma y 3) cuatro hélices  $\beta$ , relacionadas con la disociación del complejo ligando-receptor. También se aprecia un ancla transmembranal que ayuda a mantener el corresponsor en la membrana celular. Finalmente, en el lado intracelular se evidencia el motivo PPPSP, el cual es fosforilado por diferentes cinasas y que en el caso de la vía Wnt canónica promueve la estabilización de la proteína  $\beta$ -catenina. Tomado y modificado de (Go & Mani, 2012).

## **4. Componentes del complejo de destrucción de la $\beta$ -catenina**

### **4.1 Adenomatous Polyposis Coli (APC)**

La proteína supresora de tumores APC se expresa de manera ubicua en varios tejidos del organismo, especialmente en el sistema nervioso central y el intestino grueso. Dentro de sus funciones más conocidas, se encuentra la regulación negativa de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina.

En los organismos, APC presenta 2 isoformas (APC y APC2), cuya estructura tiene una región central de aproximadamente 1000 residuos de aminoácidos con motivos peptídicos cortos que permiten la unión a las proteínas  $\beta$ -catenina y axina. La unión de APC y  $\beta$ -catenina se da por 7 repeticiones de 20 residuos de aminoácidos, mientras que la unión de APC y axina se da por 2 o 3 repeticiones (dependiendo de la especie y la isoforma) de la secuencia serina-alanina-metionina-prolina (SAMP) (Behrens et al., 1998).

Complementariamente a su función en la destrucción de  $\beta$ -catenina, APC se involucra en otros procesos celulares como la formación del huso mitótico, la segregación de los cromosomas, la adhesión y migración celular, así como la organización del citoesqueleto, debida a los dominios de dimerización (Day & Alber, 2000) y de repetición armadillo (Breitman, Zilberberg, Caspi, & Rosin-Arbesfeld, 2008) en la porción N-terminal de APC.

### **4.2 Axina**

La Axina es una proteína andamio expresada de manera ubicua en embriones (Zeng et al. 1997) y tejidos adultos. Fue descubierta como el producto del gen *Fused* en el ratón, cuya alteración causaba la duplicación del eje corporal de este mamífero. No obstante, en anfibios como *Xenopus laevis*, regula la formación del eje corporal a través de la señalización por Wnt (Zeng et al., 1997).

En los vertebrados existen 2 genes de Axina: Axina y Axina 2/Conductina. En el ratón, ambas isoformas son mecánicamente intercambiables y sólo varían en su patrón de transcripción. Sin embargo, la Axina es expresada más ampliamente, mientras que la Axina 2/Conductina tiene un patrón de expresión más restringido, el cual está parcialmente controlado por la señalización por Wnt (Leung et al., 2002).

Cuando la Axina se une a otros componentes del complejo de destrucción de  $\beta$ -catenina, permite un acercamiento entre éstos, lo que incrementa la concentración efectiva entre las enzimas (quinasas) participantes y el sustrato que integran el complejo. Por lo tanto, la Axina

es un elemento clave para la destrucción de la  $\beta$ -catenina en virtud de su habilidad para promover una fosforilación eficiente de la  $\beta$ -catenina y APC.

#### **4.3 Caseína cinasa (CK)**

Actualmente, dos enzimas serina/treonina cinasas diferentes con actividad catalítica independiente de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) han sido identificadas y llamadas caseína cinasa 1 (CK1) y caseína cinasa 2 (CK2), debido a su capacidad para fosforilan a la proteína caseína *in vitro*. La familia monomérica CK1 está conservada evolutivamente y se expresa de manera ubicua en los organismos eucariontes (Cheong & Virshup, 2011). La CK1 participa en procesos celulares como la señalización por Wnt y el mecanismo molecular de los relojes circadianos, entre otros (Knippschild et al., 2005). Aunque los miembros de la familia CK1 son expresados ubicuamente, la CK citoplasmática, presenta 3 isoformas ( $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ ), las cuales pueden unirse a la Axina. No obstante, la CK1 $\alpha$  es la isoforma principal que fosforila el residuo de serina 45 de la  $\beta$ -catenina para crear un sitio de reconocimiento (priming) para GSK3, lo que conlleva a la degradación de  $\beta$ -catenina. La CK se regula a través de su autofosforilación. Además, el pyrvinium, una droga antihelmíntica aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), es un activador alostérico potente y específico para CK1 $\alpha$  (Thorne et al., 2010). La activación de CK1 inhibe a la vía Wnt canónica, ya que incrementa la fosforilación y la degradación de la  $\beta$ -catenina.

#### **4.4 Glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3)**

La GSK3 fue descrita en los años 80 como una serina/treonina cinasa independiente de AMPC, la cual fosforilaba e inhibía a la enzima limitante de la síntesis de glucógeno, la glucógeno sintasa (Embi, Rylatt, & Cohen, 1980). La GSK3 es una enzima conservada en la evolución, cuyos genes homólogos han sido identificados en diversos organismos eucariotas como la mosca de la fruta (Ruel et al., 1993). En los mamíferos, la GSK3 se expresa de manera ubicua y se presenta en las isoformas GSK3 $\alpha$  y GSK3 $\beta$ , las cuales tienen una homología del 97% entre ellas. Sin embargo, dichas isoformas se diferencian por la presencia de un extremo N-terminal rico en glicina en la estructura de GSK3 $\alpha$  (Woodgett, 1990), en la longitud de sus estructuras primarias (483 aa para la GSK3 $\alpha$  y 433 aa para la GSK3 $\beta$ ), así

como en sus pesos moleculares, 51 y 47 kDa (Woodgett, 1990), respectivamente. Pese a sus diferencias, ambas isoformas parecen funcionar de manera redundante en la destrucción de la  $\beta$ -catenina (Doble et al., 2007), aunque la mayoría de los estudios de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en vertebrados se han centrado en la GSK3 $\beta$ .

La GSK3 se une a una región central en la estructura de la Axina, lo que potencia la fosforilación de la  $\beta$ -catenina (Dajani et al., 2003) para su reconocimiento por el proteosoma. El inhibidor mejor caracterizado de la GSK3 es el cloruro de litio (Klein and Melton 1996), que actúa como un inhibidor no selectivo de esta cinasa y el cual es comúnmente recetado en el tratamiento del trastorno bipolar.

### **5. Proteínas fosfatasas 1 (PP1) y 2A (PP2A)**

La PP1 es la serina/treonina fosfatasa más conservada en los eucariotes, con una expresión ubicua, un peso molecular de aproximadamente 38 kDa y una estructura conformada por 4 subunidades catalíticas que interactúan con una gran variedad de sustratos (Ceulemans & Bollen, 2004). La PP1 defosforila a la Axina en los sitios previamente fosforilados por la CK1. Lo anterior, debilita la asociación de la Axina y la GSK3 (integrantes del complejo de destrucción de la  $\beta$ -catenina), propiciando la estabilización de  $\beta$ -catenina y la regulación a la alta de la señalización por Wnt (Luo et al., 2007a), lo que convierte a la PP1 en un regulador positivo de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina. Por otro lado, la PP2A se integra por 3 subunidades: una subunidad A de andamiaje, una subunidad C catalítica y varias subunidades B regulatorias, estas últimas se encargan del reclutamiento del sustrato y de la localización celular de la proteína. La subunidad C de la PP2A se une a la Axina (Hsu, Zeng, & Costantini, 1999), mientras que 2 subunidades B (B56 $\alpha$  y B56 $\delta$ ) interactúan directamente con APC (Seeling, 1999), regulando negativamente la señalización por Wnt (Hsu et al., 1999).

## 6. Dishevelled (DVL)

La fosfoproteína DVL fue descubierta inicialmente en la mosca de la fruta, como producto del gen *dsh* (Pizzuti et al., 1996). La mutación de *dsh* produce que los pelos del ala y del cuerpo de *Drosophila* tengan un fenotipo desordenado, de aquí el nombre “despeinado” (dishevelled).

DVL está altamente conservada en los metazoarios (Dillman, Minor, & Sternberg, 2013). En los humanos (Semënov & Snyder, 1997) y en el ratón (Y. Yang, Lijam, Sussman, & Tsang, 1996), existen 3 genes homólogos de *dsh*: *Dvl1*, *Dvl2* y *Dvl3*, los cuales tienen un alto grado de similitud entre ellos. Sin embargo, las proteínas DVL varían en su abundancia, siendo DVL2 la más abundante y DVL3 la menos abundante (Lee, Gao, & Wang, 2008) lo cual les permite trabajar de manera cooperativa o independiente (Lee et al., 2008) en la señalización por Wnt.

La estructura de DVL consta de aproximadamente 700 aminoácidos, que conforman los dominios siguientes: 1) un dominio amino terminal Dishevelled y Axina (DIX), 2) un dominio central densidad 95 postsináptica, disco largo y zona ocludens-1 (PDZ), el cual provee un sitio de acoplamiento para las enzimas cinasas, fosfatasa y proteínas adaptadoras, 3) un dominio carboxilo terminal DEP (Dishevelled, Egl-10 y pleckstrina), 4) un dominio Dishevelled (DSV), cuya importancia funcional es aún desconocida (Dillman et al., 2013) y 2 regiones básicas con residuos conservados de serina y treonina, así como una región SH3 (homología *src* 3) que es rica en prolina (Dillman et al., 2013). Los dominios DIX and PDZ son importantes en la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina (Wharton, 2003), ya que inducen la estabilización de la  $\beta$ -catenina citosólica, para que ésta posteriormente trasloque al núcleo celular.

Aunque DVL no tiene actividad enzimática conocida, se regula positiva y negativamente por fosforilación/defosforilación (Gao & Chen, 2010). La función de DVL en la vía Wnt/ $\beta$ -catenina depende del reclutamiento de DVL, una vez que el ligando Wnt se ha unido al receptor Fz. La polimerización de DVL promueve el reclutamiento del complejo Wnt-LRP5/6-Fz para formar señalosomas (Gao & Chen, 2010). Esto resulta en la fosforilación de LRP6 por la GSK3 y CK1. Luego DVL y LRP6 fosforilado reclutan a la Axina en la membrana pasmática, lo que promueve el desensamble del complejo de destrucción de la  $\beta$ -catenina y por ende la activación de la señalización Wnt.

## 7. Familia de proteínas Groucho (Gro)

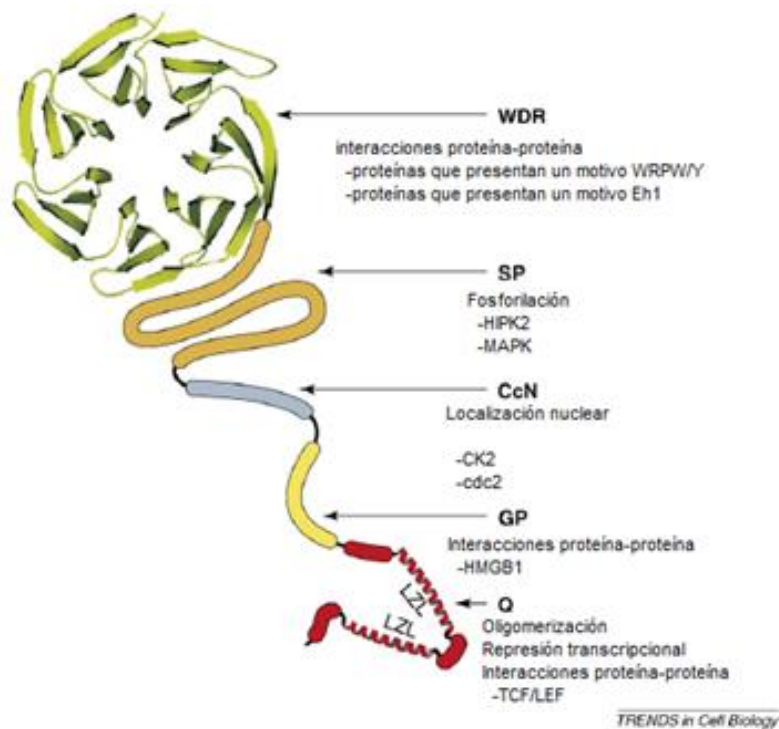
Las nucleoproteínas Gro tienen una alta abundancia y expresión en los organismos. No obstante que han perdido su actividad intrínseca de unión al ácido desoxirribonucleico (ADN), son requeridas para la función adecuada de los represores que se unen al ADN, por lo que actúa como correpresores transcripcionales.

El nombre Groucho proviene del fenotipo que produce la mutación viable de este gen en *Drosophila*, la cual causa cúmulos de pelos sobre los ojos de las moscas adultas (Lindsley & Grell, 1968), que se asociaron con las cejas gruesas del humorista estadounidense Groucho Marx.

En 1992, se identificaron 4 homólogos humanos de *Gro*, a los que se les denominó potenciador de separación parecido a transducina 1-4 (TLE 1-4) (Stifani, Blaumueller, Redhead, Hill, & Artavanis-Tsakonas, 1996), antes de que las funciones moleculares de *Gro* fueran elucidadas.

La estructura de las proteínas Gro/TLE presenta 5 dominios evolutivamente conservados (Figura 3). El primero de ellos es un dominio N-terminal rico en glutamina, llamado dominio Q, el cual se integra por 2 motivos parecidos a cremalleras de leucina (LZL), que permiten la oligomerización de la proteína (Song, Hasson, Paroush, & Courey, 2004) y su interacción con múltiples factores de transcripción. El segundo dominio está poco conservado y es rico en residuos de glicina y prolina, por lo que se le llama dominio GP, éste es importante en mediar la unión de Gro/TLE a las histonas deacetilasas (HDACs) y a la proteína 1 del grupo de alta movilidad de la cromatina (HMGB1) (Dintilhac & Bernués, 2002). El tercer dominio es el CcN, que toma su nombre por presentar putativamente los sitios de fosforilación para la caseína cinasa 2 (CK2) y para el homólogo 2 de la proteína de control de la división celular (*cdc2*) que se encuentran adyacentes a las señales de localización nuclear. El cuarto dominio es rico en serina y prolina, por lo que se llama dominio SP, éste es fosforilado por las cinasas homeodominio de interacción cinasa-2 (HIPK2) (Choi et al., 2005) y la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) (Hasson et al., 2005), lo cual regula negativamente la actividad de represión/transcripción de Groucho. Finalmente, el quinto dominio es el dominio WDR, considerado como la porción más conservada de las proteínas Gro/TLE, en el cual los factores de transcripción que se unen al ADN utilizan una secuencia peptídica corta (WRPW/Y) para unirse a las proteínas Gro/TLE.





**Figura 3. Estructura de las proteínas Gro/TLE.**

La familia de proteínas Gro/TLE se conforma por 5 dominios bien conservados: el dominio N-terminal Q, implicado en la oligomerización de la proteína; el dominio GP, que auxilia en la interacción proteína-proteína; los dominios CcN y SP que presentan sitios putativos de fosforilación para las cinasas CK2, cdc2, HIPK2 y MAPK, respectivamente y el dominio WDR que permite las interacciones proteína-proteína a través del motivo WRPW/Y. LZL=motivos parecidos a cremalleras de leucina, TCF/LEF=factor de células T/factor potenciador linfóide. Tomado y modificado de (Buscarlet & Stifani, 2007).

## **8. Familia factor de células T (TCF) y factor potenciador linfoide (LEF)**

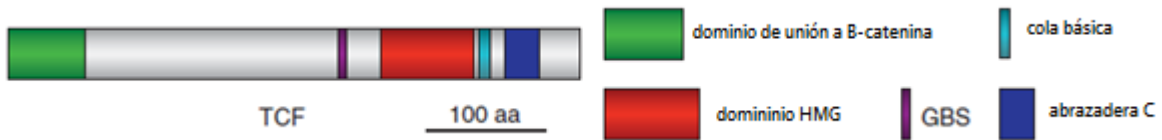
En los vertebrados existen 4 miembros de la familia TCF (TCF 1-4) y un miembro de la familia LEF (LEF-1). Tanto los TCF como el LEF-1 fueron descubiertos en linfocitos T humanos (Travis, Amsterdam, Belanger, & Grosschedl, 1991; van de Wetering, Oosterwegel, Dooijes, & Clevers, 1991), lo cual explica su nombre. Además, ambos comparten un dominio de unión al ADN, llamado caja de grupos de alta movilidad (HMG) (Travis et al., 1991; van de Wetering et al., 1991) y un pequeño motivo de péptidos, nombrado como la cola básica.

La caja HMG tiene una función de unión al ADN que asegura que las proteínas TCF/LEF se unan al ADN en motivos conservados definidos como A/T A/T CAAAG (van de Wetering & Clevers, 1992) en los promotores y potenciadores de sus genes blanco.

A parte del dominio HMG y la cola básica, la estructura de TCF presenta 3 dominios más: un dominio de unión a  $\beta$ -catenina (ubicado en el extremo N-terminal de TCF), la abrazadera C (C clamp) y la secuencia de unión a Groucho (Figura 4). La abrazadera C, es un dominio pequeño, pero altamente conservado que se localiza C-terminal al dominio HMG y que está enriquecido en residuos aminoacídicos básicos, aromáticos y en cisteína. Su nomenclatura procede de su requerimiento absoluto de 4 residuos de cisteína en la unión al ADN (Atcha et al., 2007) y está considerado como un segundo dominio de unión al ADN.

En los vertebrados, la abrazadera C, presenta actividades de unión específica al ADN para una secuencia secundaria rica en GC (Atcha et al., 2007) llamada sitio asistente (“Helper site”). Por otra parte, el dominio de unión a Groucho, contiene un dominio Q, rico en glutamina que se une a la parte central del TCF/LEF y a la parte que contiene el dominio HMG (Daniels & Weis, 2005).

En ausencia de la señalización Wnt/ $\beta$ -catenina, el complejo TCF/LEF recluta correpresores de la cromatina, los cuales son desplazados y/o inactivados cuando la  $\beta$ -catenina trasloca al núcleo y se asocia al extremo amino terminal de TCF para convertirlo en un potente activador transcripcional. Este proceso logra desplazar al correpresor Groucho de su unión a TCF/LEF, permitiendo el reclutamiento de una gran variedad de proteínas como la histona acetilasa proteína de unión a CREB (CBP), Pygopus y el linfoma de células B (Bclp), que producen cambios en la estructura de la cromatina de los genes blanco de Wnt. Por lo que, el complejo TCF/LEF actúa como un coactivador transcripcional en presencia de  $\beta$ -catenina.



**Figura 4. Estructura de los TCF.**

La estructura de la familia TCF presenta 5 dominios bien conservados, los cuales son: 1) el dominio de unión a  $\beta$ -catenina (color verde), el cual se encuentra en el extremo N-terminal de la proteína, 2) la secuencia de unión a Groucho (GBS) (color púrpura), 3) el dominio del grupo de alta movilidad (HMG) (color rojo), 4) una señal de localización nuclear (la cola básica) (color azul cielo) y 5) el dominio abrazadera C (clamp C) (color azul marino). Tomado y modificado de (Cadigan & Waterman, 2012).

ANEXO C. GENES BLANCO DE LA VÍA WNT/ $\beta$ -CATENINA

<b>Gen</b>	<b>Organismo o sistema</b>	<b>Directo</b>	<b>Regulación alta/baja</b>
c-myc	cáncer de colon humano	sí	alta
n-myc	extremidades mesénquimales	-----	alta
Ciclina D	cáncer de colon humano	sí	alta
PPAR $\delta$	cáncer de colon humano	sí	alta
c-jun	cáncer de colon humano	sí	alta
Fra-1	cáncer de colon humano	sí	alta
uPAR	cáncer de colon humano	?	alta
MMP-7	cáncer de colon humano	sí	alta
MMP-26	Humano	-----	-----
MMP2, MMP9	células T	-----	-----
Nr-CAM	cáncer de colon humano	sí	alta
gastrina	cáncer de colon humano	?	alta
CD44	cáncer de colon humano	?	alta
EphB/efrina-B	cáncer de colon humano	?	alta/baja
BMP4	cáncer de colon humano	?	alta
BMP4	Xenopus	?	baja
claudina-1	cáncer de colon humano	sí	alta
survivina	cáncer de colon humano	-----	alta

VEGF	cáncer de colon humano	sí	alta
FGF4	pulpa dental de ratón	sí	alta
FGF9	adenocarcinoma ovárico endometroide	-----	alta
FGF18	cáncer de colon humano	sí	alta
FGF20	Tumores	-----	-----
Hath 1	cáncer de colon humano	-----	baja
Met	cáncer de colon humano	-----	alta
endotelina-1	cáncer de colon humano	-----	alta
proteína de unión a c-myc	cáncer de colon humano	sí	alta
adhesión neural L1	cáncer de colon humano	-----	alta
Id2	cáncer de colon humano	sí	alta
Jagged	cáncer de colon humano	-----	alta
Jagged1	folículo capilar de ratón	-----	alta
Msl1	cáncer de colon humano	-----	alta
Tiam1	cáncer de colon humano	-----	-----
óxido nítrico sintasa 2	células Hepg2	-----	alta
telomerasa	células ES y otras células madre	sí	alta

LBH	cáncer de mama	-----	alta
LGR5/GPR49	Intestino	sí	alta
Sox9	Intestino	-----	alta
Sox9	Mesénquima	-----	baja
Sox17	tumores gastrointestinales	-----	alta
Sox2	retina de xenopus	-----	alta
Runx2	Condrocitos	-----	alta
Gremlin	Fibroblastos	-----	alta
SALL4	-----	-----	-----
ligando RANK	Osteoblastos	-----	baja
osteoprotegerina	Osteoblastos	-----	alta
CCN1/Cyr61	Osteoblastos	-----	alta
proteína parecida a Delta 1	Somitas	-----	-----
FoxN1	Timo	sí	?
nanog	células ES	-----	-----
Oct4	células ES	-----	alta
snail	células ES/EB	-----	alta
fibronectina	células ES/EB	-----	alta
fibronectina	pulmón de ratón	-----	alta
fibronectina	Xenopus	sí	alta

folistatina	células EC, ovario	sí	alta
Islote1	células cardiacas	-----	alta
Siamois	Xenopus	sí	alta
proteína miogénica bHLH	Xenopus	?	alta
engrailed	Drosophila	?	alta
engrailed-2	Xenopus	sí	alta
Xnr3	Xenopus	sí	alta
conexina 43	Xenopus, ratón	sí	alta
conexina 43	cardiomiocitos de rata	?	alta
conexina 30	Xenopus	?	-----
Twin	Xenopus	sí	alta
receptor de ácido retinoico gamma	Xenopus	?	-----
MITF/nacre	pez cebra	sí	alta
Stra6	células de ratón transformadas por Wnt-1	-----	alta
Wrch-1	células de ratón transformadas por Wnt-1	?	alta
ligando 41BB de la familia TNF	células de ratón transformadas por Wnt-1	?	alta

Twist	cáncer mamario inducido por Wnt1	?	alta
estromelina	células de ratón transformadas por Wnt-1	?	alta
WISP	células de ratón transformadas por Wnt-1	sí, pero no a través de TCF	alta
Brachyury (Tbox1)	ratón (Wnt-3A)	sí	alta
Tbx3 (Tbox3)	ratón, humano	sí	alta
proglucagon	Ratón	?	alta
osteocalcina	Ratón	sí	baja
Cdx1	embrión de ratón	-----	-----
Cdx1	ratón (Wnt 3A)	sí	alta
Cdx4	ratón (Wnt 3A)	-----	-----
Cdx4	HSC de pez cebra	-----	alta
ciclooxigenasa 2	ratón (Wnt1)	?	alta
Irx3 y Six3	cerebro de ratón	-----	-----
neurogenina 1	cerebro de ratón	sí	alta
SP5	cerebro de ratón	sí	alta
Neuro D1	cerebro de ratón	sí	alta
Nkx2.2	tubo neural	sí	baja



Gbx2	cresta neural	sí	alta
Ccna 1g	Neurona	-----	alta
IL-8	células endoteliales	-----	-----
periostina	ratón (Wnt-3)	?	baja
Cdc25	células de sarcoma	sí	alta
pitx2	Hipófisis	sí	alta
receptor de EGF	hígado	-----	alta
Eda (relacionado a TNF)	folículo capilar de ratón	-----	alta
queratina	folículo capilar de ratón	sí	alta
movo1	folículo capilar de ratón	sí	alta
P16ink4A	Melanocitos	sí	alta
CTLA-4	Melanomas	sí	alta
mBTEB2	Ratón	Independiente de $\beta$ -catenina	alta
ret	PC12 de rata	?	alta
versican	células musculares	sí	alta
Tnfrsf19	mesodermo de somitas	sí	alta
Ubx	Drosophila	sí	alta o baja
Dpp	Drosophila	sí	baja
shavenbaby	Drosophia	?	baja

nemo	Drosophila	-----	alta
WISP-1, WISP-2, IGF-2, proliferina 2, proliferina 3, Emp, IGF-1, VEGF-C, MDR1, COX-2, IL-6.	preadipocitos 3T3-L1	-----	alta

**Tabla 1. Genes blanco de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina.** Los genes anteriores han sido reconocidos en vertebrados e invertebrados, abarcando toda una gama de funciones abarcando ciclo celular, metabolismo, factores de transcripción y metaloproteasas de matriz, ligandos, enzimas, factores de crecimiento, entre otros. PPAR= receptor de proliferación activado por peroxisomas, FRA-1= antígeno 1 relacionado con Fos, uPAR= receptor de uroquinasa, MMP= metaloproteasa de matriz, Nr-CAM= moléculas de adhesión celular neuronal, ITF-2= factor de transcripción de inmunoglobulina 2, EphB/efrina B= receptor de efrina B, BMP4= proteína morfogénica de hueso 4, VEGF= factor de crecimiento endotelial vascular, FGF= factor de crecimiento de fibroblastos, Id2= inhibidor de la proteína de unión al ADN 2, Msl1= homólogo letal específico de machos 1, Tiam 1= proteína de invasión metástasis de linfomas de células T, LHB= proteína de desarrollo de extremidades y de corazón, LGR5/GPR49= receptor acoplado a proteínas G con repeticiones ricas en leucina, Runx2= factor de transcripción 2 parecido a enano, SALL4= proteína parecida a Spalt 4, RANK= ligando del receptor activador del factor nuclear kB, CCN1/Cyr61= miembro 1 de la familia del inductor angiogénico rico en cisteína 61, FoxN1= proteína N1 con caja punta de flecha, Oct4= factor de transcripción de unión a octámeros 4, Xnr3= proteína de Xenopus parecida a nodal 3, MITF/nacre= factor de transcripción asociado a microftalmia, Stra 6= proteína estimulada por el gen de ácido retinoico 6, Wrch-1= homólogo de Cdc 42 responsivo a Wnt1, WISP= proteína secretada inducida por Wnt1, Cdx= factor de transcripción caudal 1 tipo caja homo, Irx3= proteína con el homeodominio clase Iraqués, Neuro D1=proteína de diferenciación neurogénica 1, Gbx2= proteína homeobox 2 específica de gastrulación y cerebro, Ccna 1g= ciclina A1, IGF= factor de crecimiento insulínico, Emp= proteína eritroblástica de macrófagos, MDR1= proteína de resistencia multidrogas 1, IL-6= interleucina 6, Cdc25= homólogo A del ciclo 25 de la división celular, Pitx2= factor de transcripción 2 apareado parecido a homeodominio, EGF= receptor del factor de crecimiento epidermal, Eda= ectodisplasina. Tomado y modificado de “the Wnt homepage (<http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>)”.

## ANEXO D. RITMOS BIOLÓGICOS

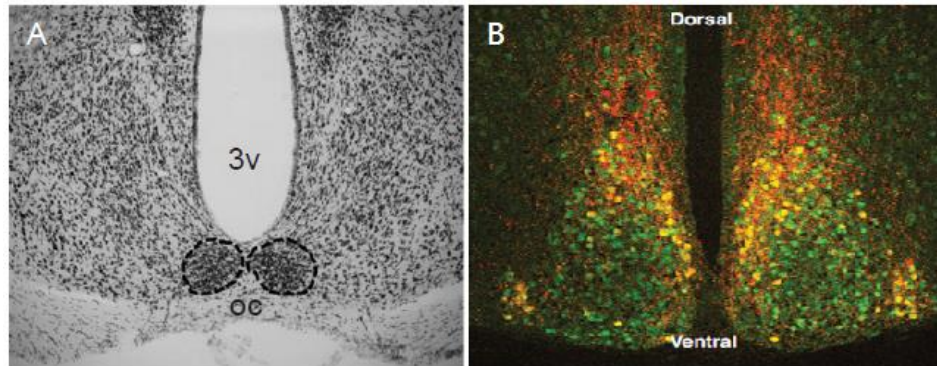
### **1. Localización y estructura del núcleo supraquiasmático (NSQ)**

El NSQ es un núcleo hipotalámico bilateral que se ubica en el hipotálamo anteroventral, a ambos lados del tercer ventrículo y por encima del quiasma óptico, esta última referencia anatómica da origen a su nombre (Figura 1A).

En el ratón, cada uno de los NSQs unilaterales miden menos de 1 mm y están integrados de aproximadamente 10,000 neuronas de somas pequeños (aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ ) y árboles dendríticos simples. En su estructura, el NSQ se subdivide en 2 regiones: el centro (core) y la corteza (shell), que corresponden a la región ventral y a la región dorsal del NSQ, respectivamente (Figura 1B). El centro, limita con el quiasma óptico y recibe proyecciones de la retina. En tanto que, la corteza está parcialmente rodeada del centro y recibe gran cantidad de proyecciones de éste (Leak, Card, & Moore, 1999). Tanto el centro como la corteza se distinguen por su contenido neuroquímico. Ya que, la mayoría de las 1100 neuronas que integran el centro, contienen polipéptido intestinal vasoactivo (VIP), mientras que una minoría de éstas también pueden contener calretinina, neurotensina (NT) y péptido liberador de gastrina (GRP). Respecto a la corteza, sus aproximadamente 2100 neuronas contienen arginina vasopresina (AVP), y sólo un número pequeño de las mismas presentan angiotensina II y met-enkefalina. Además, en muchas neuronas del NSQ, los neuropéptidos anteriores colocalizan con el ácido gamma aminobutírico (GABA) (Moore & Speh, 1993), dando como resultado una mayoría de sinapsis GABAérgicas (Strecker, Wuarin, & Dudek, 1997). No obstante, hay que tomar en cuenta que tanto la anatomía como la neuroquímica del NSQ pueden variar entre especies (Morin et al., 2006).

Una característica de los ritmos biológicos es que pueden ser sincronizados. Por lo tanto, el NSQ requiere como señal sincronizadora principal a la luz (estímulo fótico), la cual es detectada por la retina y transmitida de manera directa al NSQ a través del tracto retinohipotalámico (TRH). El TRH es un conjunto de axones de fotorreceptores especiales llamados células ganglionares (Berson, 2003), las cuales contienen el pigmento melanopsina y proyectan directamente al NSQ, para liberar glutamato y polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP) en los contactos sinápticos con las neuronas del NSQ. Posteriormente, en el NSQ el core y el shell envían eferencias a blancos primarios locales en las áreas mediales del tálamo y del hipotálamo (Leak & Moore, 2001).

Adicionalmente, existe una vía indirecta de información fótica, la cual va de la retina a la hojuela intergeniculada lateral (IGL), para posteriormente proyectar al NSQ por el tracto geniculohipotalámico (TGH) (Berson, 2003).



**Figura 1. Localización anatómica y estructura del NSQ.**

(A) Ubicación del NSQ en los mamíferos (rata), justo por encima del quiasma óptico (oc) y lateral al tercer ventrículo (3v). (B) Estructura del NSQ en 2 regiones bien definidas: la región ventral, llamada centro o “core” (color verde) y la región dorsal llamada corteza o “shell” (color rojo). Tomado y modificado de (Engelberth et al., 2013; Mohawk & Takahashi, 2011).

El NSQ como reloj biológico principal en los mamíferos, se comunica directamente con los osciladores periféricos por vías neurales simpáticas (Vujovic, Davidson, & Menaker, 2008) y por señales hormonales (Balsalobre et al., 2000). Mientras que, su comunicación indirecta la ejerce por la modulación de la temperatura corporal y el comportamiento de la ingesta de alimento (Damiola et al., 2000).

## **2. Diferencias entre el NSQ y los osciladores periféricos**

Existen 2 diferencias importantes entre el NSQ y los osciladores periféricos. La primera es la redundancia en el asa positiva del mecanismo del reloj molecular. Ya que, en ratones mutantes para el gen reloj *Clock*, el parálogo proteína neuronal 2 con dominio PAS (NPAS2) puede sustituir la función de *Clock*, en órganos periféricos del SNC, no así en el NSQ. La segunda diferencia es la latencia en la actividad eléctrica y las oscilaciones circadianas del NSQ, respecto a los osciladores periféricos. Puesto que, los explantes de NSQ oscilan durante semanas e incluso años, mientras que las oscilaciones en explantes de tejidos periféricos decaen rápidamente (Yamazaki et al., 2000) y presentan fases distintas de los genes reloj (como *per2*), las cuales varían de tejido a tejido (Yoo et al., 2004). Pese a sus diferencias,

una de las características más importantes que comparten el NSQ y los osciladores periféricos es su susceptibilidad a las señales sincronizadoras y su respuesta a éstas. Recordemos que para el NSQ la señal sincronizadora principal es la luz, mientras que los osciladores periféricos pueden responder a otras señales externas como el alimento (Damiola et al., 2000).

### 3. Mutaciones en los genes reloj de mamíferos

Alelo	Fenotipo mutante
<i>Bmal1</i> <sup>-/-</sup>	arrítmico
<i>Clock</i> <sup>Δ19/19</sup>	período 4h más largo/arrítmico
<i>Clock</i> <sup>-/-</sup>	período 0.5 h más corto
<i>Per1</i> <sup>brdm1</sup>	período 1 h más corto
<i>Per1</i> <sup>-/-</sup>	período 0.5 h más corto
<i>Per2</i> <sup>brdm1</sup>	período 1.5 h más corto/arrítmico
<i>Per2</i> <sup>ldc</sup>	arrítmico
<i>Per3</i> <sup>-/-</sup>	período 0.5 h más corto
<i>Cry1</i> <sup>-/-</sup>	período 1 h más corto
<i>Cry2</i> <sup>-/-</sup>	período 1 h más largo
<i>Rev-erba</i> <sup>-/-</sup>	período 0.5 h más corto/sincronización fótica alterada
<i>Rorβ</i> <sup>-/-</sup>	período 0.5 h más largo
<i>Rory</i> <sup>-/-</sup>	desconocido

**Tabla 1. Mutaciones en los diferentes genes reloj de los mamíferos.** Las mutaciones de los genes reloj del asa positiva (*Bmal1* y *Clock*), del asa negativa (*Per1*, *2*, *3* y *Cry1*, *2*) y de las asas accesorias (*Rev-erba* y *Rorβ*) del mecanismo del reloj molecular inciden sobre el período de la actividad locomotriz de los roedores medida en condiciones constantes (libre corrimiento o free running). Tomado y modificado de (Ko & Takahashi, 2006).

<b>Gen afectado</b>	<b>Alteración fisiológica</b>
<i>Bmal1</i>	infertilidad, artropatía progresiva, gluconeogénesis y lipogénesis anormales, patrón de sueño alterado
<i>Clock</i>	síndrome metabólico, gluconeogénesis anormal, patrón de sueño alterado, sensibilización anormal del comportamiento a los psicoestimulantes
<i>Per1</i>	apoptosis anormal, desarrollo de cáncer, sensibilización anormal del comportamiento a los psicoestimulantes
<i>Per2</i>	división celular inadecuada, desarrollo de cáncer, sensibilización anormal del comportamiento a los psicoestimulantes, ingesta de alcohol inadecuada, síndrome familiar de fase de sueño avanzada (SFSA)
<i>Per3</i>	asociado con el síndrome de la fase de sueño retrasada (SFSR)
<i>Cry1, Cry2</i>	patrón de sueño alterado
<i>Rora</i>	ataxia cerebelar, metabolismo anormal de hueso
<i>Rorb</i>	dificultades locomotoras, degeneración retinal y ceguera, anomalías reproductivas en los machos durante los primeros 6 meses de edad
<i>Rory</i>	pérdida del desarrollo de los órganos linfoides, homeostasis anormal de los linfocitos
<i>NPAS2</i>	patrón del sueño y memoria alterados

**Tabla 2. Mutaciones en los genes reloj de mamíferos y su efecto en algunos procesos fisiológicos.**

Recopilación de distintas mutaciones en los genes reloj y su influencia directa sobre diversos aspectos de la fisiología de los organismos. Tomado y modificado de (Ko & Takahashi, 2006).

## **20. PUBLICACIONES**



# Synchronization by Daytime Restricted Food Access Modulates the Presence and Subcellular Distribution of $\beta$ -Catenin and Its Phosphorylated Forms in the Rat Liver

Dalia Luz De Ita-Pérez and Mauricio Díaz-Muñoz\*

Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Querétaro, México

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Etienne Challet,  
University of Strasbourg, France

### Reviewed by:

Shigenobu Shibata,  
Waseda University, Japan  
Sabine Colnot,  
INSERM, France

### \*Correspondence:

Mauricio Díaz-Muñoz  
mdiaz@comunidad.unam.mx

### Specialty section:

This article was submitted to  
Neuroendocrine Science,  
a section of the journal  
Frontiers in Endocrinology

**Received:** 30 October 2016

**Accepted:** 16 January 2017

**Published:** 06 February 2017

### Citation:

De Ita-Pérez DL and Díaz-Muñoz M  
(2017) Synchronization by  
Daytime Restricted Food Access  
Modulates the Presence and  
Subcellular Distribution of  
 $\beta$ -Catenin and Its Phosphorylated  
Forms in the Rat Liver.  
Front. Endocrinol. 8:14.  
doi: 10.3389/fendo.2017.00014

$\beta$ -catenin, the principal effector of the Wnt pathway, is also one of the cadherin cell adhesion molecules; therefore, it fulfills signaling and structural roles in most of the tissues and organs. It has been reported that  $\beta$ -catenin in the liver regulates metabolic responses such as gluconeogenesis and histological changes in response to obesity-promoting diets. The function and cellular location of  $\beta$ -catenin is finely modulated by coordinated sequences of phosphorylation–dephosphorylation events. In this article, we evaluated the levels and cellular localization of liver  $\beta$ -catenin variants, more specifically  $\beta$ -catenin phosphorylated in serine 33 (this phosphorylation provides recognizing sites for  $\beta$ -TrCP, which results in ubiquitination and posterior proteasomal degradation of  $\beta$ -catenin) and  $\beta$ -catenin phosphorylated in serine 675 (phosphorylation that enhances signaling and transcriptional activity of  $\beta$ -catenin through recruitment of different transcriptional coactivators).  $\beta$ -catenin phosphorylated in serine 33 in the nucleus shows day–night fluctuations in their expression level in the *Ad Libitum* group. In addition, we used a daytime restricted feeding (DRF) protocol to show that the above effects are sensitive to food access-dependent circadian synchronization. We found through western blot and immunohistochemical analyses that DRF protocol promoted (1) higher total  $\beta$ -catenins levels mainly associated with the plasma membrane, (2) reduced the presence of cytoplasmic  $\beta$ -catenin phosphorylated in serine 33, (3) an increase in nuclear  $\beta$ -catenin phosphorylated in serine 675, (4) differential co-localization of total  $\beta$ -catenins/ $\beta$ -catenin phosphorylated in serine 33 and total  $\beta$ -catenins/ $\beta$ -catenin phosphorylated in serine 675 at different temporal points along day and in fasting and refeeding conditions, and (5) differential liver zonation of  $\beta$ -catenin variants studied along hepatic acinus. In conclusion, the present data comprehensively characterize the effect food synchronization has on the presence, subcellular distribution, and liver zonation of  $\beta$ -catenin variants. These results are relevant to understand the set of metabolic and structural liver adaptations that are associated with the expression of the food entrained oscillator (FEO).

**Keywords:** food entrained oscillator,  $\beta$ -catenin variants, liver, microscopy, phosphorylation



## INTRODUCTION

Daytime restricted feeding (DRF) is an accepted protocol to study the dynamic relationship between the circadian timing system and metabolic networks (1, 2). It usually involves limited access to food (a few hours each day) during a period of 2–3 weeks. A daily increase in locomotor activity before food presentation becomes an evident adaptive response after a few days of DRF conditions; this behavioral display observed is known as food-anticipatory activity (FAA) (3). DRF (2-h food access per day) involves two underlying aspects of daily physiological adjustments: (1) a circadian synchronization that shifts the phases of clock genes and (2) a hypocaloric food intake. Both aspects influence the adaptive response that allows an optimal metabolic handling of nutrients when food availability is restricted to a particular time of day (4, 5). Furthermore, a consequence of DRF is the adoption of a new coordination between the master circadian pacemaker, the hypothalamic suprachiasmatic nucleus (SCN), and peripheral oscillators such as liver, lung, adipose tissue, and heart (6, 7). Key experiments show that a variety of 24-h rhythmic responses under the DRF protocol, including the onset and maintenance of FAA, are elicited even when SCN functions are disrupted [references within Ref. (8)], which support the existence of an SCN-independent circadian timing system known as the food entrained oscillator (FEO) (9). Defining the FEO's anatomical substrate has been elusive, in part because the existence of several FEOs in different organs and tissues (10) and the emergence of an alternative timing system that complements the SCN's pacemaker activity (11, 12).

The liver is one of the organs that show a faster change in 24-h rhythmicity and metabolic responses under the DRF protocol (13). In this context, it has been shown that a 2-h food access during the daytime modifies (1) the circadian phase of BMAL1 and PER1 clock proteins (14, 15), (2) metabolic liver regulation (16), (3) hepatic mitochondrial activity (17), (4) ureagenesis (15), and (5) gluconeogenesis (GNG) (18). In addition to these biochemical adaptations, DRF promotes histological and ultrastructural changes in hepatocytes (19).

Conversely,  $\beta$ -catenin is a polyfunctional protein; it acts as a subunit of the cadherin protein complex, and hence, it regulates cell–cell adhesion properties (20). Also, it functions as a transcriptional factor acting as an effector of the Wnt signaling pathway (21), and it is a metabolic regulator that facilitates gluconeogenic activity in the liver (22). The complex role played by  $\beta$ -catenin is accomplished by the selective actions of phosphorylated  $\beta$ -catenin forms (23). Indeed, two of the best characterized phosphorylated  $\beta$ -catenins are as follows: (1)  $\beta$ -catenin phosphorylated at serine 33 (pSer33  $\beta$ -catenin). This phosphorylation is carried by the serine/threonine kinase glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) (24) after initial phosphorylation by another serine/threonine kinase, casein kinase 1  $\alpha$  (CK1 $\alpha$ ), at residue serine 45. Subsequent phosphorylation by GSK3 $\beta$  at residues T41, S37, and S33 in the N-terminal promotes that  $\beta$ -catenin be recognized by the  $\beta$ -TrCP E3-ligase complex, ubiquitylated, and quickly degraded by the 26 S proteasome (25). Therefore, GSK3 $\beta$ , CK1 $\alpha$ , and scaffold proteins such as adenomatous polyposis coli (APC) and axin are part of the multiprotein complex called the “destruction

complex” of  $\beta$ -catenin, whose function is to regulate cytosolic  $\beta$ -catenin levels. (2)  $\beta$ -catenin phosphorylated at serine 675 (pSer675  $\beta$ -catenin). This phosphorylation is performed either by protein kinase A (PKA), a cAMP-dependent protein kinase (26), or by p21-activated kinase, a serine/threonine protein kinase (27). Phosphorylation at serine 675 enhances  $\beta$ -catenin transcriptional activity by facilitating the interaction between the C-terminal tail of  $\beta$ -catenin with several transcriptional coactivators, including the CREB-binding protein (28).  $\beta$ -catenin is linked to physiology in the metabolic zonation and metabolism of the liver due to its participation in different metabolic pathways. The importance of this functional duality consists in the preservation of liver homeostasis. It has been reported that any disruption of homeostatic balance, like the one produced by a high-fat dietary manipulation in a biological system where  $\beta$ -catenin is absent (a hepatocyte-specific  $\beta$ -catenin transgenic or  $\beta$ -catenin knockout mice), fosters deleterious effects on hepatocyte function and morphology (29). These effects suggest that Wnt signaling in hepatocytes is essential for the development of diet-induced fatty liver and obesity.

Evidences of relationship between  $\beta$ -catenin and clock proteins have come from cancer experimental models both *in vitro* and *in vivo*, where the downregulation of PER1 or PER2 proteins increased  $\beta$ -catenin (30) and some of its target genes such as cyclin D and C-myc. It has been proposed that previous effect is because  $\beta$ -catenin promotes PER1 and PER2 degradation (31). Contrary, the downregulation of  $\beta$ -catenin by siRNA increases the PER2 protein level in human colon cancer cells (31) and in small intestine mucosa of mice with APC mutations (APC<sup>Min/+</sup>). It was also observed that PER2 rhythm was lost concomitant to a reduced protein expression (31). In contrast, BMAL1, a positive regulator of the circadian clock, was demonstrated to be a transcriptional factor of the  $\beta$ -catenin protein and other components of the Wnt pathway (32). As a consequence,  $\beta$ -catenin levels in a BMAL1 null mice (BMAL1<sup>-/-</sup>) were decreased in comparison to wild-type mice (32). In addition, molecular mechanisms of circadian rhythmicity reside on posttranslational modifications (PTMs) of clock proteins (33), mainly phosphorylation. Most known kinases in the circadian machinery are CK1 $\alpha/\epsilon$  and GSK3 $\beta$ , which are part of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway as well. In the context of circadian mechanism, these kinases can determinate clock proteins subcellular localization, stabilization, heterodimerization, and degradation, whereas in the  $\beta$ -catenin context, they are involved mostly in the degradation process. Taken together, all these antecedents strongly suggest that  $\beta$ -catenin could be influenced by the core of the circadian molecular clock. Therefore, the purpose of this study was to explore whether DRF and the associated FEO expression could influence the 24-h rhythmicity and subcellular distribution of  $\beta$ -catenin variants in the rat liver.

The daily profile data in our research showed that DRF promoted (1) an enhanced presence of total  $\beta$ -catenins mainly in the areas adjacent to the plasma membrane, (2) a reduction in pSer33  $\beta$ -catenin levels, and (3) an increase in the nuclear presence of pSer675  $\beta$ -catenin. Our research also demonstrated a dynamic rearrangement in the subcellular localization of  $\beta$ -catenins at different times of the day. Overall, our results indicate that the  $\beta$ -catenin system could be part of the functional

and structural adaptations that take place in the liver during the FEO expression.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals and Housing

Adult male Wistar rats weighing  $200 \pm 20$  g at the beginning of the experiment were kept in groups in transparent acrylic cages (40 cm  $\times$  50 cm  $\times$  20 cm) and acclimated to laboratory conditions: 12:12 h light–dark cycle (lights on 08:00 hours), controlled temperature ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ), and free access to food (5001 rodent diet; LabDiet, St. Louis MO, USA) and water for a few days before starting the experimental procedures. Our study and the experimental protocols were approved by the Universidad Nacional Autónoma de México Institutional Animal Care and Use Committee, and all experiments were conducted in accordance to the recommendations of the Universidad Nacional Autónoma de México Institutional Animal Care and Use Committee. In addition, we took into account the International Ethical Standards reported by Portaluppi et al. (34).

### Experimental Groups

For 3 weeks, rats were randomly assigned to one of the following feeding conditions, which are similar to those reported by Davidson and Stephan (35) and Ángeles-Castellanos et al. (36):

- (1) *Ad libitum* group (AL), with free access to food and water throughout the 24-h period.
- (2) Daytime restricted feeding (DRF) group, which had access to food for only 2 h per day, from 12:00 to 14:00 hours. At the end of feeding conditions 1 and 2, animals were processed at 3-h intervals over a 24-h period starting at 08:00 hours. To discard the possibility that observed effects were due to the daily fasting (22 h)–refeeding (2 h) cycle in the DRF group, two additional feeding control groups were included as follows:
- (3) An acute 22-h fasting group (Fa), where rats were given free access to food for 3 weeks. On the last day of the experiment, food was removed at 14:00 hours, and animals were food deprived for the next 21 h. At the end of this acute fasting (at 11:00 hours), animals were sacrificed.
- (4) An acute 2-h refeeding group (Rf), where rats were left for 22 h in fasting and then refed for 2 h (from 12:00 to 14:00 hours). They were sacrificed at 14:00 hours.

Previous reports of our work group have proved the effectiveness of the DRF protocol by testing different metabolic and physiological adaptations in the rat liver such as phase shift in the daily variations of clock proteins PER1 (37, 38) and BMAL1 (14) and serum corticosterone levels (37, 38). Besides, the appearance of FAA is always associated to DRF protocol.

### Liver Sampling and Subcellular Fractionation

Animals were killed by a guillotine-like device. Livers were dissected, and a 5 g sample was processed immediately at  $4^\circ\text{C}$  in homogenization buffer (225 mM sucrose, 0.3 mM EGTA, 10 mM

Tris-HCl, pH 7.4; 1:10 w/v), using a Potter-Elvehjem Teflon-glass homogenizer (40 rpm for 20 s). Total liver homogenate was centrifuged at 1,500 g for 15 min (Sorvall SS34 centrifuge), and the resulting pellet was isolated using the citric acid method, as reported by Reiners and Busch (39) to collect the nuclear fraction, while the resultant supernatant was decanted and centrifuged again at 10,000 g for 20 min to precipitate the mitochondrial fraction (which was discarded). The resultant supernatant was ultracentrifuged (Beckman 70Ti rotor) at 100,000 g for 70 min to obtain the microsomal fraction (which was removed) from the pellet and the cytosolic fraction from the supernatant (40). All fractions were collected, aliquoted, and stored at  $-70^\circ\text{C}$  until further use.

### Western Blot Analyses

The total homogenate and the cytosolic and nuclear fractions were used to measure the presence of total  $\beta$ -catenins, pSer33  $\beta$ -catenin, and pSer675  $\beta$ -catenin. Total protein was quantified using the Bradford method (41). Equal amounts of protein were mixed with  $2\times$  Laemmli sample buffer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and incubated at  $80^\circ\text{C}$  for 10 min. The proteins were separated with 10% SDS-PAGE under reducing conditions. Subsequently, gels were transferred to nitrocellulose membranes and blocked for 1 h with 5% non-fat milk. After three washouts with 20 mM Tris-Buffered Saline and Tween 20 (TBST) (pH 7.5), membranes were incubated overnight at  $4^\circ\text{C}$  with the following primary antibodies (all of them diluted in TBST): rabbit anti  $\beta$ -catenin antibody (ab 32572) 1:5,000 dilution, rabbit anti  $\beta$ -catenin (phospho S33) antibody (ab 73153) (Abcam, Cambridge, MA, USA) 1:30,000 dilution, and rabbit anti  $\beta$ -catenin (Ser675) antibody (D2F1, Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA) 1:1,000 dilution. The following day, all membranes were washed three times with TBST and then incubated for 2 h with the alkaline phosphatase-conjugated secondary donkey anti-rabbit antibody (sc2083, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), 1:5,000 dilution. Bands were revealed using the alkaline phosphatase conjugate substrate kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).  $\beta$ -tubulin antibody (ab 56676) at 1:1,000 dilution was used as a loading control for homogenate and cytosolic fractions, while lamin B1 antibody (ab184115) (Abcam, Cambridge, MA, USA) at 1:10,000 dilution was used as a marker for the nuclear fraction. Quantification was done by densitometric analysis using Image J Software (42) [National Institutes of Health (NIH), USA].

### Immunofluorescence

Liver tissue was fixed in 10% formalin at  $4^\circ\text{C}$  for 1 week with changes every 2 days. Subsequently, the tissue was embedded in paraffin and sectioned into 7- $\mu\text{m}$  slices. Liver slices were deparaffinized for 2 h at  $60^\circ\text{C}$  in a dry heat oven and then rehydrated in 100% xylol (10 min), 100% ethanol (5 min), 96% ethanol (5 min), 80% ethanol (5 min), and deionized water (10 min). Afterward, slices were bathed in permeabilization buffer (3.9 mM sodium citrate, 0.1% Tween 20) for 8 min and then boiled in EDTA buffer (1 mM EDTA, 0.05% Tween 20, pH 8.0) at  $96^\circ\text{C}$  for 1 h. Slices were blocked with 1% non-fat milk for 1 h, washed three times with TBST buffer, and incubated overnight at  $4^\circ\text{C}$  with the following

antibodies (all diluted in TBST): rabbit anti  $\beta$ -catenin antibody (ab 32572) at 1:100 dilution, rabbit anti  $\beta$ -catenin (phospho S33) antibody (ab 73153) (Abcam, Cambridge, MA, USA) at 1:100 dilution, and rabbit anti  $\beta$ -catenin (Ser675) antibody (D2F1, Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA) at 1:100 dilution.

The next day, slices were washed three times with TBST buffer and then incubated for 2 h with the secondary antibody Alexa Fluor 594 donkey anti-rabbit IgG (Invitrogen Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) at 1:500 dilution. Subsequently, slices were blocked again with 1% non-fat milk for 1 h, washed three more times with TBST, and incubated overnight at 4°C with the second primary antibody, mouse anti-glutamine synthetase (GS) antibody (MAB302, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) at 1:300 dilution. Finally, slices were incubated for 2 h with the second secondary antibody Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG (A21202) or donkey anti-rabbit IgG (A21206) (Invitrogen, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) at 1:300 dilution. Fluorescence was visualized with both epi-fluorescence (Nikon Eclipse E600, Minato, Japan) and confocal microscopy (Zeiss Axiovert 200 LSM 510 Meta-Multiphotonic, Oberkochen, Germany), and it was quantified with Image J software (42) (NIH, USA).

## Data Analysis

The data were grouped according to experimental conditions and times (at least four rats per temporal point) and expressed as the mean  $\pm$  SEM. Results were compared using the one-way and two-way ANOVA test to determine time and treatment effects, respectively. Significant differences were detected with Tukey or Sidak *post hoc* tests ( $p < 0.05$ ). A chronobiological analysis was also carried out using the ChronoFit program (43) with the following parameters: acrophase, mesor, and percentage of rhythmicity. Finally, a Student's *t*-test was used for the feeding condition control groups to identify significant differences between the following groups: acute fasted and refed; DRF and acute fasted (at 11:00 hours); DRF and acute refed (at 14:00 hours). All graphs and statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## RESULTS

The presence of free  $\beta$ -catenin in the cell cytoplasm is usually regulated across its degradation, unless  $\beta$ -catenin avoids the destruction complex. In this case,  $\beta$ -catenin increases in cytoplasm and can translocate into the nucleus. This function can be regulated by phosphorylation of a variety of kinases in the *N*-terminus or *C*-terminus of protein. First, in our experimental protocol, we evaluated  $\beta$ -catenin that is targeted to degradation (pSer33  $\beta$ -catenin) and a  $\beta$ -catenin with an enhanced transcriptional activity (pSer675  $\beta$ -catenin).

### DRF Protocol Decreased the Level of pSer33 $\beta$ -Catenin

The daily patterns of pSer33  $\beta$ -catenin at different subcellular compartments of the liver are represented in **Figure 1**. The AL

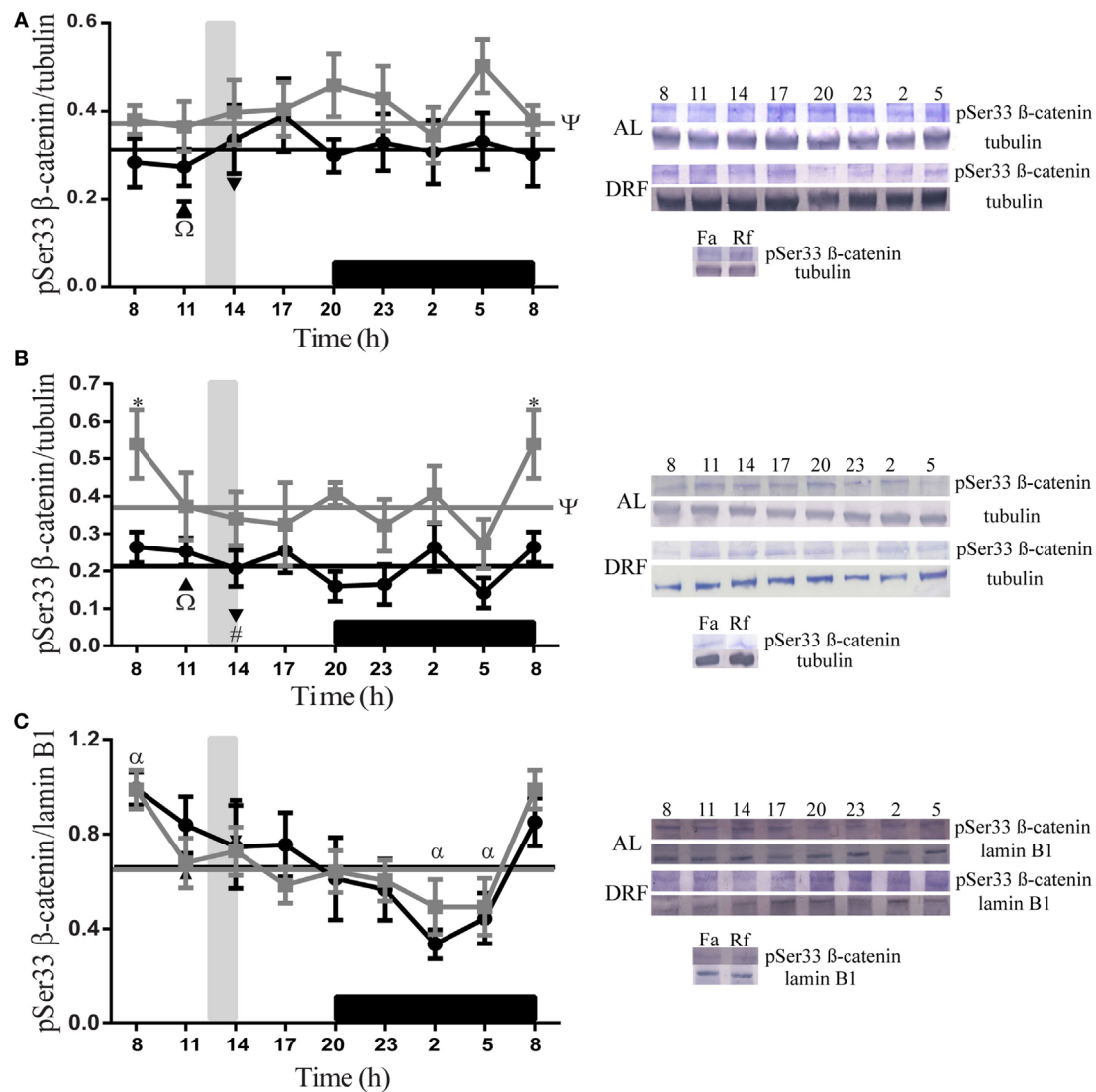
and DRF groups showed a constant presence of protein in the total homogenate and in the cytosolic fraction (**Figures 1A,B**) during the 24-h period. In the cytosolic fraction, the AL group at 08:00 hours presented a significant difference, two-way ANOVA hours of day:  $F(1,48) = 23.85$ ,  $p < 0.0001$ , in comparison to DRF at same temporal point. Nevertheless, the DRF group showed a 16% decrease in the total homogenate and a 42% decrease in the cytosolic fraction. In the nuclear fraction, both groups displayed a gradual decrease of pSer33  $\beta$ -catenin from the beginning of the light phase (08:00 hours) to the middle of dark phase (02:00 hours) (**Figure 1C**). In both groups, the one-way ANOVA showed significant difference. In the AL group:  $F(7,32) = 2.74$ ,  $p = 0.02$ , and in the DRF group:  $F(7,32) = 2.74$ ,  $p = 0.02$ . However, they did not present any rhythmicity when they were evaluated by the chronobiological analysis. The Fa group exhibited a similar expression of pSer33  $\beta$ -catenin to DRF at 11:00 hours in all fractions tested, whereas the Rf group revealed a similar pattern in the total homogenate and in the nuclear fraction, but not in the cytosolic fraction; it showed a 61% reduction in pSer33  $\beta$ -catenin compared to the DRF group (14:00 hours). The Fa group decreased its pSer33  $\beta$ -catenin expression in the total homogenate by 23% with respect to the Rf group. In contrast, the Rf group decreased its pSer33  $\beta$ -catenin expression in the cytosolic fraction by 51% with respect to the Fa group (**Figures 1A–C**).

### DRF Increased the Nuclear Presence of pSer675 $\beta$ -Catenin

The daily patterns of pSer675  $\beta$ -catenin were quantified at different subcellular compartments of the liver in both AL and DRF groups (**Figure 2**). In total homogenate, AL rats showed a gradual decrease in pSer675  $\beta$ -catenin expression throughout the light phase (from 08:00 to 20:00 hours) and a gradual increase in the dark phase (from 20:00 to 08:00 hours) until it reached a peak at 05:00 hours, one-way ANOVA hours of day  $F(7,32) = 5.08$ ,  $p = 0.0006$  (**Figure 2A**). This increment favors a 24-h rhythmic pattern that presented acrophase at 4.5 h (**Table 1**).

In the cytosolic fraction, the presence of pSer675  $\beta$ -catenin was higher in the AL group during the dark phase (**Figure 2B**). In the nuclear fraction, a constant expression of pSer675  $\beta$ -catenin was observed throughout the 24-h period. Regarding the DRF group, a uniform presence of pSer675  $\beta$ -catenin was identified in all fractions tested in the 24-h cycle. It is relevant to mention that, compared to the DRF group, the AL group showed a 21% increase in the expression of pSer675  $\beta$ -catenin in the cytosolic fraction throughout the 24-h period. This daily pattern is proportionately reversed in favor of the DRF group in the nuclear fraction (**Figure 2C**). The Fa and Rf groups showed a similar presence of protein in the total homogenate and in the nuclear fraction when compared to the DRF group (at 11:00 and 14:00 hours). The increase of pSer675  $\beta$ -catenin in the cytosolic fraction of Fa group was greater than the observed in the DRF group at 11:00 hours (52%) and in the Rf group at 14:00 hours (50%).

To discriminate among the multiple forms of  $\beta$ -catenin in our protocol (phosphorylated and non-phosphorylated), we also evaluated the total liver  $\beta$ -catenins.



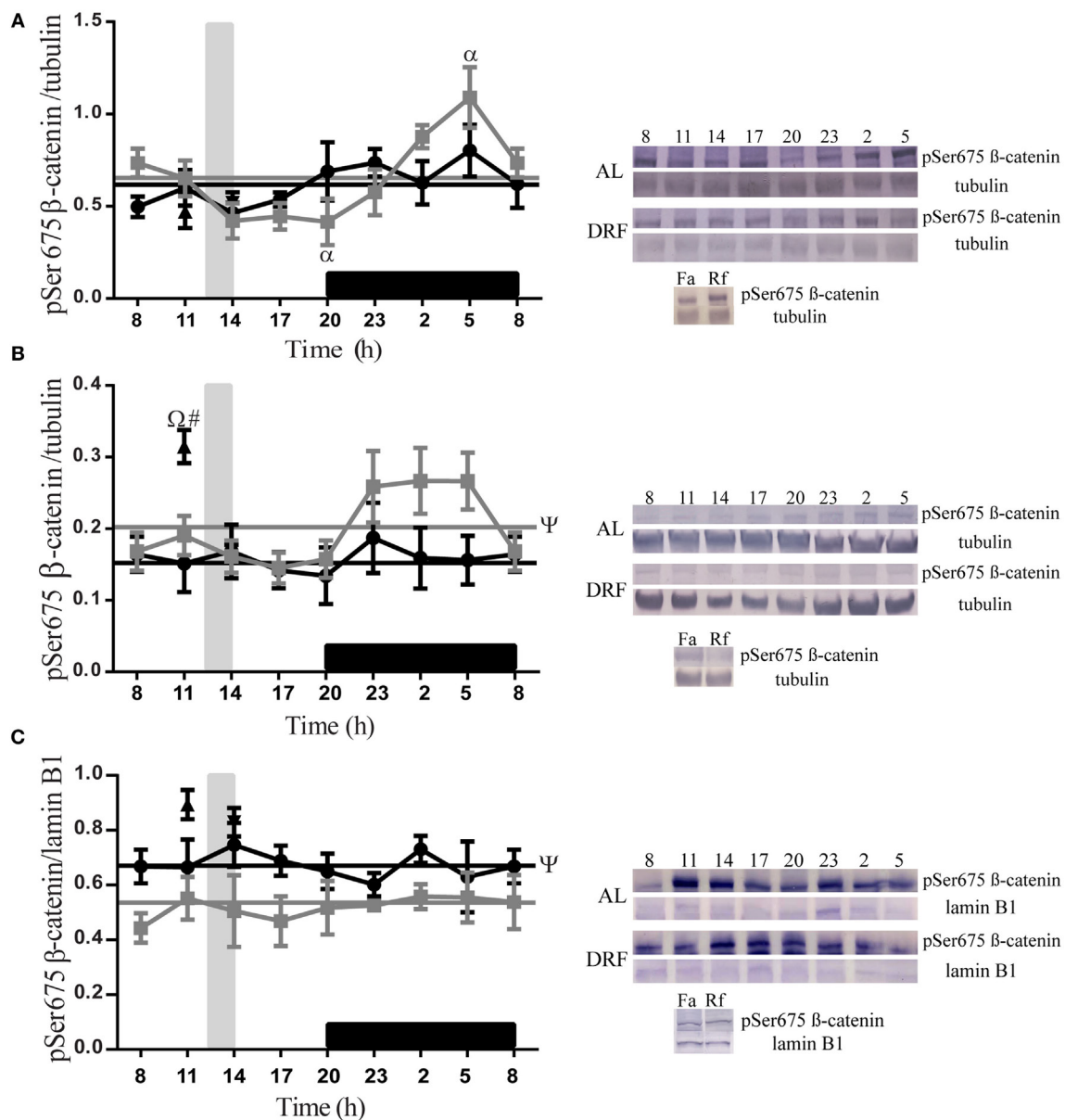
**FIGURE 1 | Daily profile of pSer33  $\beta$ -catenin in the rat liver under the daytime restricted feeding (DRF) protocol.** Semiquantitative western blot analysis of pSer33  $\beta$ -catenin at total homogenate (A), cytosolic fraction (B), and nuclear fraction (C). Each value was normalized using the housekeeping proteins tubulin [for (A,B)] and lamin B1 [for (C)]. A representative western blot for each condition is shown. Gray squares, AL group; black circles, DRF group; triangles, Fa group; inverse triangles, Rf group. Data are represented as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 4-5$  different animals per temporal point). Horizontal lines represent the 24-h cycle average. The vertical gray bar indicates food access (12:00–14:00 hours), and the horizontal black rectangle in the x-axis corresponds to the dark phase. \*Significant difference between AL and DRF groups in the 24-h average (Student's *t*-test,  $p < 0.05$ ). \*Significant difference between AL and DRF groups at the same temporal point (two-way ANOVA followed by Sidak *post hoc* test,  $p < 0.0001$ ).  $\alpha$ Significant difference between points of the same group (one-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test,  $p < 0.05$ ).  $\#$ Significant difference between Fa and Rf groups (Student's *t*-test,  $p < 0.05$ ).  $\Omega$ Significant difference between DRF (11:00 or 14:00 hours) versus Fa and Rf (Student's *t*-test,  $p < 0.05$ ).

## DRF Protocol Increased the Presence of Total $\beta$ -Catenins

Figure 3 shows daily patterns of total  $\beta$ -catenins at different subcellular compartments of rat hepatocytes under AL and DRF conditions. The AL group showed a constant 24-h expression in all fractions tested. DRF rats did not show a 24-h rhythmic pattern. However, DRF protocol promoted significant increases in the 24-h cycle average as follows: 113% of total  $\beta$ -catenins in comparison to the liver homogenate in the AL group (Figure 3A),

39% in the cytosolic fraction (Figure 3B), and 75% in the nuclear fraction (Figure 3C). All three increases were greater in the light phase, when DRF animals had access to food. DRF only displayed temporal differences with the AL group, in the total homogenate at 14:00, 20:00, 02:00, and 05:00 hours; two-way ANOVA hours of day:  $F(1,88) = 69.56$ ,  $p < 0.0001$ . The Fa and Rf groups showed similar total  $\beta$ -catenin levels to the AL group at 11:00 and 14:00 hours in the total homogenate and in the cytosolic fraction (Figures 3A,B). Nevertheless, total  $\beta$ -catenins





**FIGURE 2 | Daily profile of pSer675  $\beta$ -catenin in the rat liver under the daytime restricted feeding (DRF) protocol.** Semiquantitative western blot analysis of pSer675  $\beta$ -catenin in total homogenate (A), cytosolic fraction (B), and nuclear fraction (C). Each value was normalized using the housekeeping proteins tubulin [for (A,B)] and lamin B1 [for (C)]. A representative western blot for each condition is shown. Gray squares, AL group; black circles, DRF group; triangles, Fa group; inverse triangles, Rf group. Data are represented as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 4-5$  animals per temporal point). Horizontal lines represent the 24-h cycle average. The vertical gray bar indicates food access (12:00–14:00 hours), and the horizontal black rectangle in the x-axis corresponds to the dark phase. \*Significant difference between AL and DRF groups in the 24-h average (Student's  $t$ -test,  $p < 0.05$ ).  $\Psi$ Significant difference between points of the same group (one-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test,  $p < 0.05$ ).  $\alpha$ Significant difference between Fa and Rf groups (Student's  $t$ -test,  $p < 0.05$ ).  $\Omega$ Significant difference between DRF (11:00 or 14:00 hours) versus Fa and Rf (Student's  $t$ -test,  $p < 0.05$ ).

levels in the nuclear fraction were similar to those in the DRF group (Figure 3C).

Due to the structural function of  $\beta$ -catenin at adherens junctions (AJ), we evaluated the presence of the  $\beta$ -catenin variants in the plasma membrane through immunohistochemistry at 11:00 hours (before food access for DRF rats), 14:00 hours (after

food access for DRF rats), and 02:00 hours (in the middle of the dark phase) and under Fa and Rf conditions.

Immunohistochemical observations were used to determine how the time of day and feeding conditions influence the subcellular distribution of phosphorylated and total forms of  $\beta$ -catenin within hepatocytes, as well as the correlations between them.

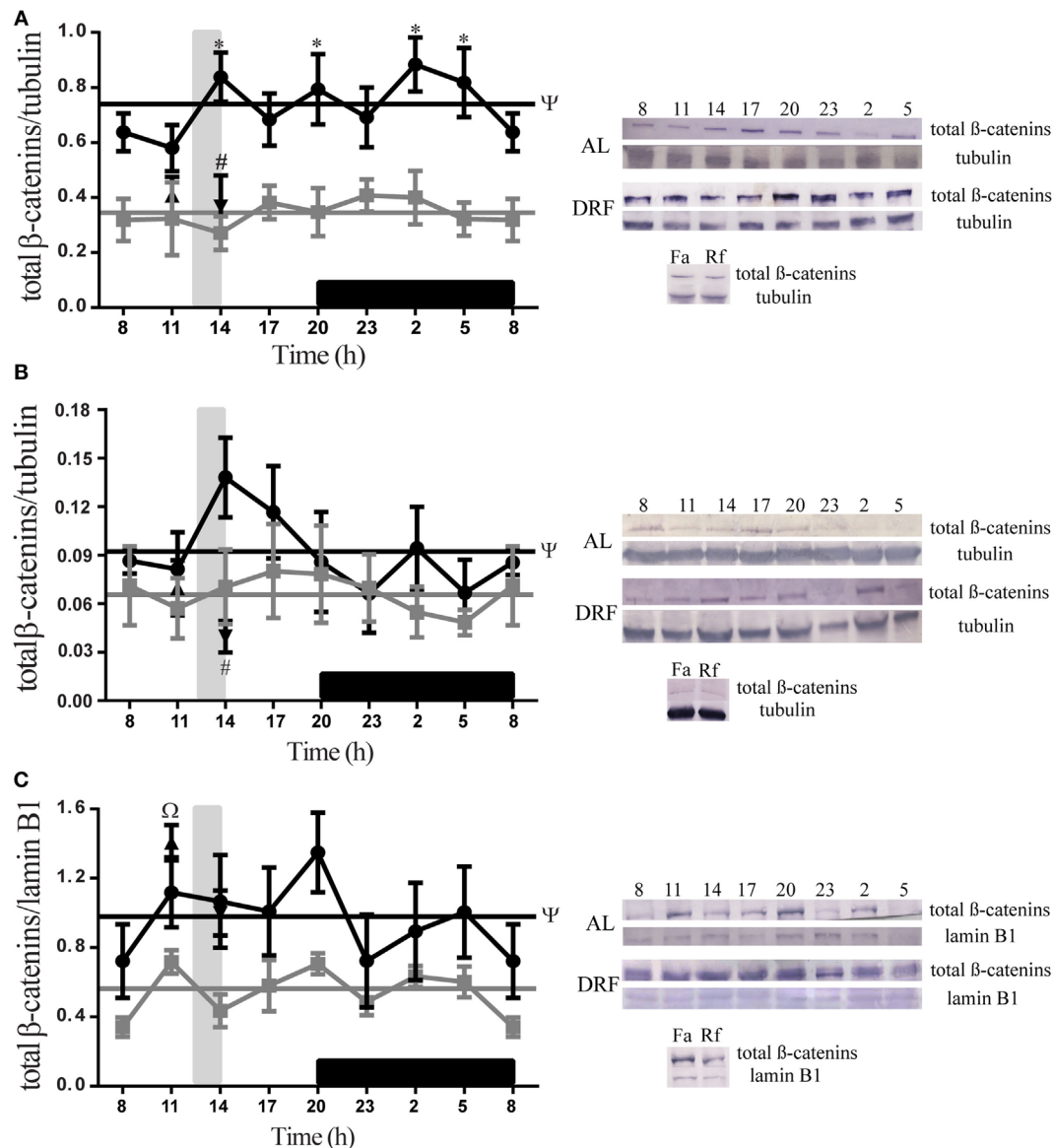
**TABLE 1 | Chronobiological analysis of pSer675  $\beta$ -catenin in total homogenate of *Ad libitum* group.**

	MESOR	Amplitude	Acrophase (hours:minutes)	Rhythmicity (%)
pSer675 $\beta$ -catenin	0.65 $\pm$ 0.24	0.30	04:55	87.43

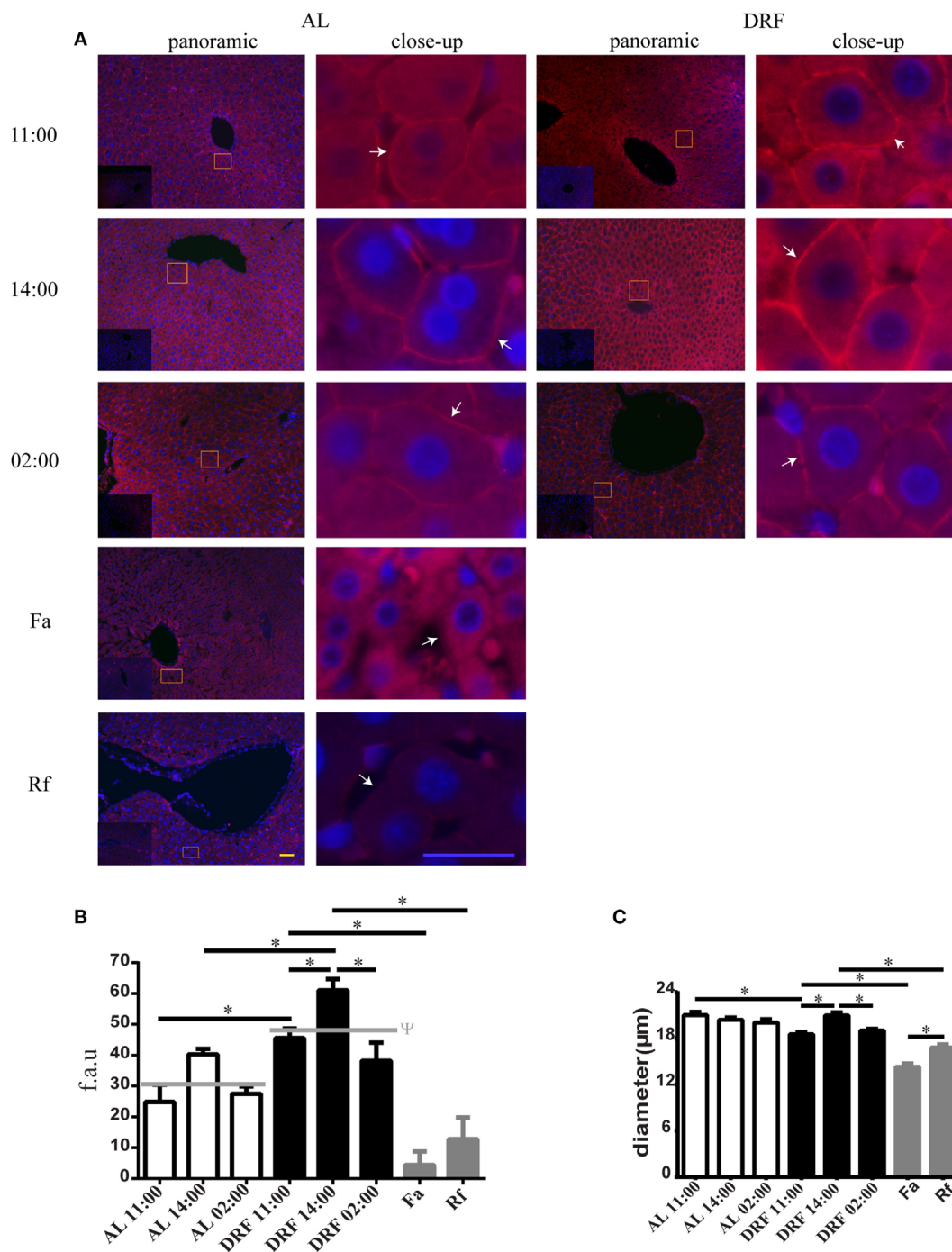
CHRONOS-FIT analysis was performed to evaluate the daily rhythmicity. Amplitude represents the difference between the peak (or trough) and the mean value of a wave (Mesor). Acrophase represents the time at which the peak of a rhythm occurs. The existence of a rhythmic pattern was defined by one-way ANOVA.

## DRF Protocol Augmented Total $\beta$ -Catenins Placed in the Plasma Membrane

The AL group showed the presence of similar total  $\beta$ -catenins in all temporal points mentioned above, whereas the DRF group showed an enhanced expression of total  $\beta$ -catenins at 11:00 and 14:00 hours (Figures 4A,B). In contrast, the Fa and Rf groups showed the lowest expression of total  $\beta$ -catenins in the plasma membrane. To discover whether the expression of total  $\beta$ -catenins in the plasma membrane could be correlated



**FIGURE 3 | Daily profile of total  $\beta$ -catenins presence in the rat liver under the daytime restricted feeding (DRF) protocol.** Semiquantitative western blot analysis of total  $\beta$ -catenins at total homogenate (A), cytosolic fraction (B), and nuclear fraction (C). Each value was normalized using the housekeeping proteins tubulin [for (A,B)] and lamin B1 [for (C)]. A representative western blot for each condition is shown. Gray squares, AL group; black circles, DRF group; triangles, Fa group; inverse triangles, Rf group. Data are represented as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 5-7$  animals per temporal point). Horizontal lines represent the 24-h cycle average. The vertical gray bar indicates food access (12:00–14:00 hours), and the horizontal black rectangle in the x-axis corresponds to the dark phase. \*Significant difference between AL and DRF groups in the 24-h average (Student's *t*-test,  $p < 0.05$ ). \*Significant difference between AL and DRF groups at the same temporal point (two-way ANOVA followed by Sidak *post hoc* test,  $p < 0.0001$ ). #Significant difference between Fa and Rf groups (Student's *t*-test,  $p < 0.05$ ). \*Significant difference between DRF (11:00 or 14:00 hours) versus Fa and Rf (Student's *t*-test,  $p < 0.05$ ).



**FIGURE 4 | Expression of the total  $\beta$ -catenins in the hepatocyte plasma membrane under the daytime restricted feeding (DRF) protocol. (A)** Immunofluorescence signal for total  $\beta$ -catenins in three different temporal points: before food-anticipatory activity (FAA) (11:00 hours), after FAA (14:00 hours), and in the middle of the dark phase (02:00 hours), as well as under Fa and Rf conditions. Both a panoramic (yellow calibration bar = 50  $\mu$ m) and a close-up view (blue calibration bar = 25  $\mu$ m) indicated by an orange square are shown. A negative control (primary antibody omitted) is displayed in the insert of the panoramic panels. Histograms show quantification of **(B)** total  $\beta$ -catenins presence in hepatocyte plasma membrane ( $n = 3$  animals) and **(C)** hepatocyte diameter at same temporal points described above under AL (white bars), DRF (black bars), and Fa and Rf (gray bars) conditions ( $n = 200$ ). Data are represented as the mean  $\pm$  SEM. The horizontal gray line represents the schedules average of each condition. \*Significant difference between AL and DRF groups average (Student's  $t$ -test,  $p < 0.05$ ). \*Significant difference between AL and DRF groups at the same temporal point (Student's  $t$ -test,  $p < 0.05$ ). f.a.u, fluorescence arbitrary units.



with hepatocyte size, we measured hepatocyte diameter under the conditions described in the Section “Materials and Methods” (only hepatocytes with an evident nucleus were considered for the morphometric study). According to the results, hepatocytes had a constant diameter under AL conditions ( $\sim 20.5 \mu\text{m}$ ) (Figure 4C). DRF treatment promoted fluctuations in hepatocyte diameter: 12% decrease at 11:00 hours, a subsequent increase at 14:00 hours similar to the diameters found in the AL group, and finally a 5% decrease at 02:00 hours (Figure 4C). In addition, the Fa group showed a 23% reduction in comparison to the DRF group at 11:00 hours, whereas the Rf group presented only a 12% reduction compared to the DRF group at 14:00 hours (Figure 4C). Hepatocyte diameters in the Fa and Rf groups differed significantly.

### The Light to Dark Transition Changed pSer33 $\beta$ -Catenin from the Cytosol to the Plasma Membrane

At two temporal points of the light phase (11:00 and 14:00 hours), both the AL and the DRF groups showed co-localization of total  $\beta$ -catenins and pSer33  $\beta$ -catenin mainly in the cytosolic compartment of the hepatocytes (Figure S1A in Supplementary Material; Figure 5). Strikingly, the intracellular distribution of both forms of  $\beta$ -catenin changed in the dark phase (02:00 hours) since total  $\beta$ -catenins and pSer33  $\beta$ -catenin were observed presumably next to the plasma membrane (Figure S1A Supplementary

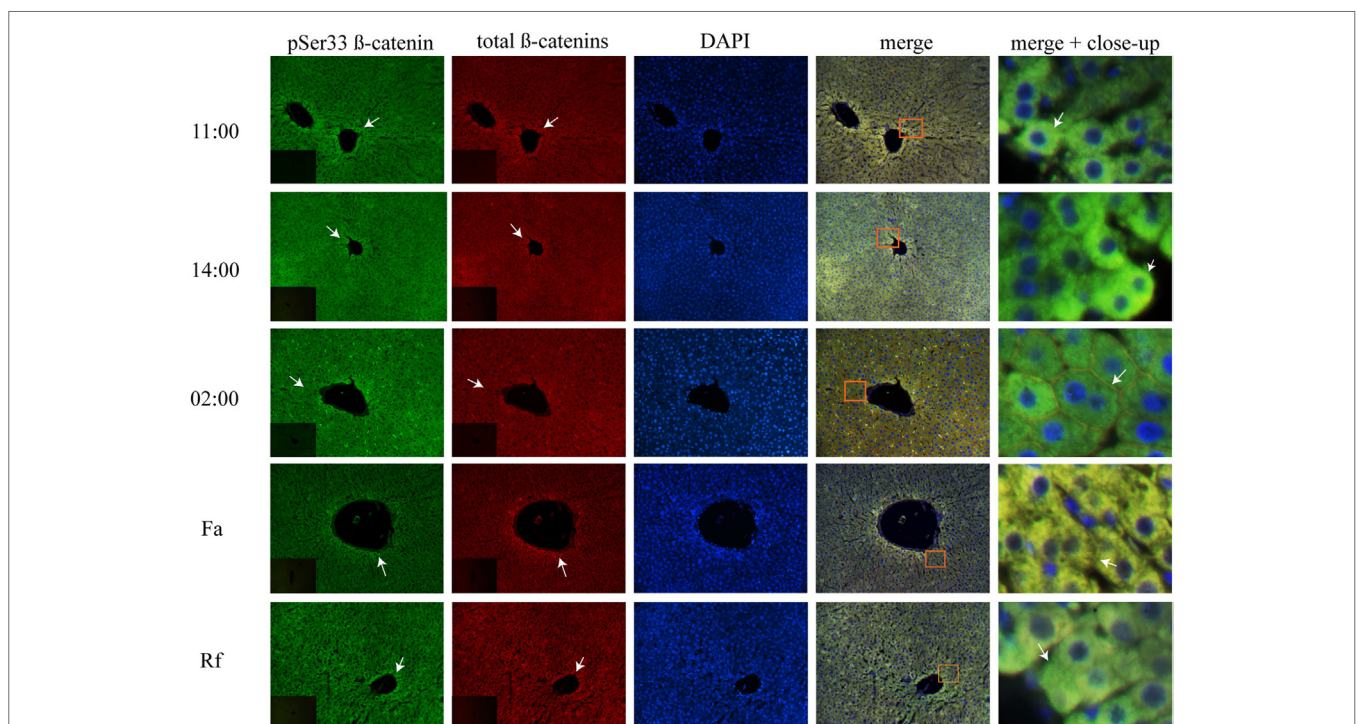
Material; Figure 5). Both total  $\beta$ -catenins and pSer33  $\beta$ -catenin were still co-localized.

### The Acute Fa–Rf Cycle Promoted pSer33 $\beta$ -Catenin Location at the Hepatocyte Plasma Membrane

Unlike the AL and DRF groups, pSer33  $\beta$ -catenin in Fa and Rf groups co-localized slightly with total  $\beta$ -catenins in the hepatocyte cytoplasm (Figure 5). Nevertheless, acute fasting and refeeding favored the location of pSer33  $\beta$ -catenin next to the plasma membrane (Figure 5).

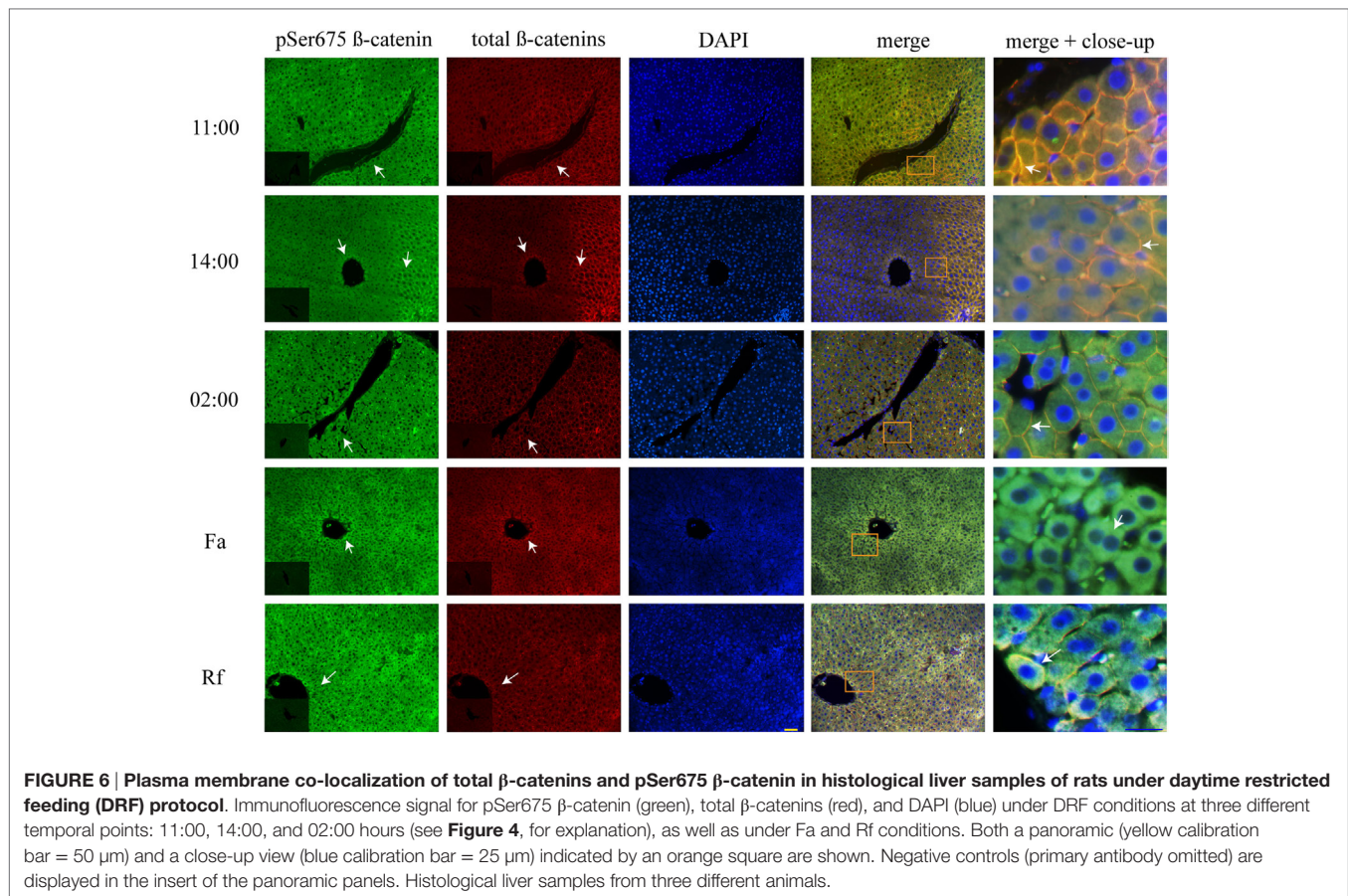
### DRF Reduced pSer675 $\beta$ -Catenin Located in the Plasma Membrane

Double immunohistochemistry of pSer675  $\beta$ -catenin and total  $\beta$ -catenins proteins was performed to learn about pSer675  $\beta$ -catenin's subcellular distribution, response to feeding protocols (DRF and Fa–Rf), and co-localization with total  $\beta$ -catenins. Results revealed plasma membrane distribution under AL (Figure S2 in Supplementary Material) and DRF conditions (Figure 6) at 11:00, 14:00, and 02:00 hours. Co-localization with total  $\beta$ -catenins were observed at these 3 h. However, after DRF rats had access to food (at 14:00 hours), they also exhibited pSer675  $\beta$ -catenin with cytosolic distribution around the vasculature. Although AL and DRF groups exhibited pSer675  $\beta$ -catenin in the plasma membrane (Figure 6), the average DRF values were 43% lower than the average AL values (Figure S2B in Supplementary



**FIGURE 5 | Cytosolic co-localization of pSer33  $\beta$ -catenin and total  $\beta$ -catenins in histological liver samples of rats under daytime restricted feeding (DRF) protocol.** Immunofluorescence signal for the pSer33  $\beta$ -catenin (green), the total  $\beta$ -catenins (red), and the DAPI (blue) in DRF conditions at three different temporal points: 11:00, 14:00, and 02:00 hours (see Figure 4 for explanation), as well as Fa and Rf conditions. Both a panoramic (yellow calibration bar =  $50 \mu\text{m}$ ) and a close-up view (blue calibration bar =  $25 \mu\text{m}$ ) indicated by an orange square are shown. Negative controls (primary antibody omitted) are displayed in the insert of the panoramic panels. Histological liver samples from three different animals.





Material). Conversely, while the Fa group showed a presence of pSer675  $\beta$ -catenin in cytosol, a relocation of this phosphorylated form of  $\beta$ -catenin was observed close to the plasma membrane in the Rf group. Both feeding condition groups expressed co-localization with total  $\beta$ -catenins (**Figure 6**).

### Liver Zonation of $\beta$ -Catenin Variants

The three forms of  $\beta$ -catenin (total  $\beta$ -catenin, pSer33  $\beta$ -catenin, and pSer675  $\beta$ -catenin) displayed distinctive subcellular expressions influenced by the time in the 24-h cycle and the feeding condition. Previous reports have shown that the expression of different forms of  $\beta$ -catenin vary in the pericentral (PC) and periportal (PP) hepatocytes in the hepatic lobule (44, 45). Therefore, to explore a putative enrichment in the presence of  $\beta$ -catenin forms in the PP and PC hepatocyte population, a double immunohistochemistry was performed on all  $\beta$ -catenin proteins, and the GS enzyme, the canonical marker of the PC zone of the hepatic acinus. Results exhibited that total  $\beta$ -catenins and the pSer675  $\beta$ -catenin in all schedules and conditions (11:00, 14:00, and 02:00 hours and Fa and Rf) were located mostly in the cytosol of PC hepatocytes, while from the intermediate to the PP zone of acinus, they were located in the plasma membrane (**Figures 7 and 8**, respectively). On the other hand, the presence of both cytosolic and cell membrane pSer33  $\beta$ -catenin was observed in PC hepatocytes (**Figure 9**); this presence disappears

between the intermediate and PP zones. That was observed in all schedules and conditions proven (11:00, 14:00, and 02:00 hours and Fa and Rf).

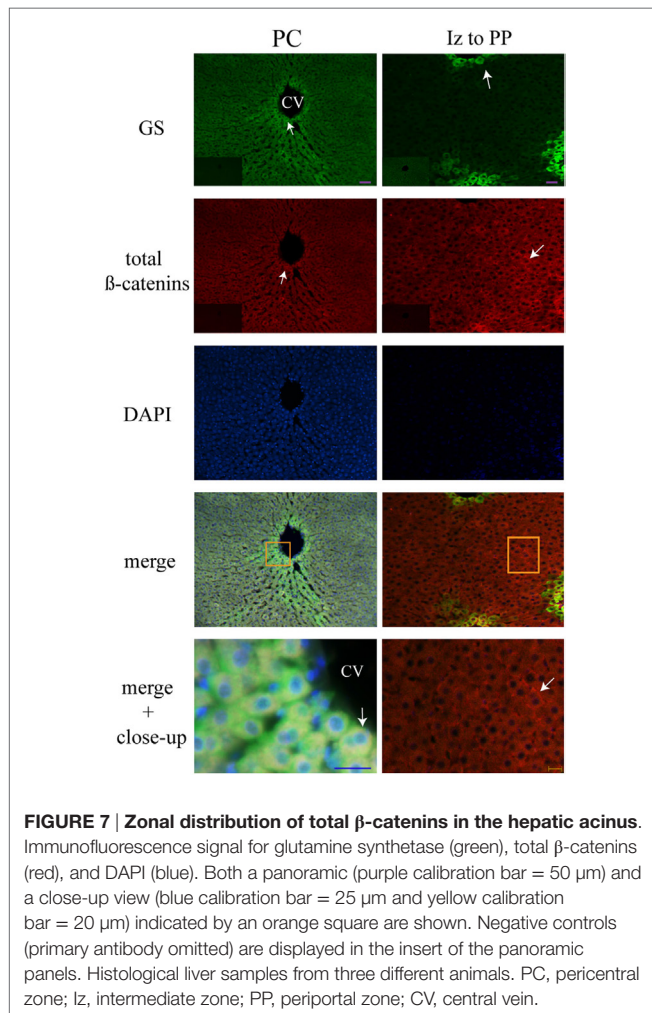
## DISCUSSION

### Cell Biology and $\beta$ -Catenin Signaling

Wnt/ $\beta$ -catenin is a conserved signaling pathway (46) that fulfills important metabolic roles in the adult liver.  $\beta$ -catenin plays a pivotal role that involves cell adhesion (a stable  $\beta$ -catenin pool associated with the cell membrane) and transcriptional activity (a soluble  $\beta$ -catenin cytoplasmic pool) (47). These roles are coordinated by PTMs, mainly phosphorylation (48).

Our results indicated a significant decrease of pSer33  $\beta$ -catenin in the total homogenate and in the cytosol under DRF, which could indicate a lower rate for protein degradation and an opportunity for  $\beta$ -catenin to be translocated into the nucleus to promote transcription of its target genes.

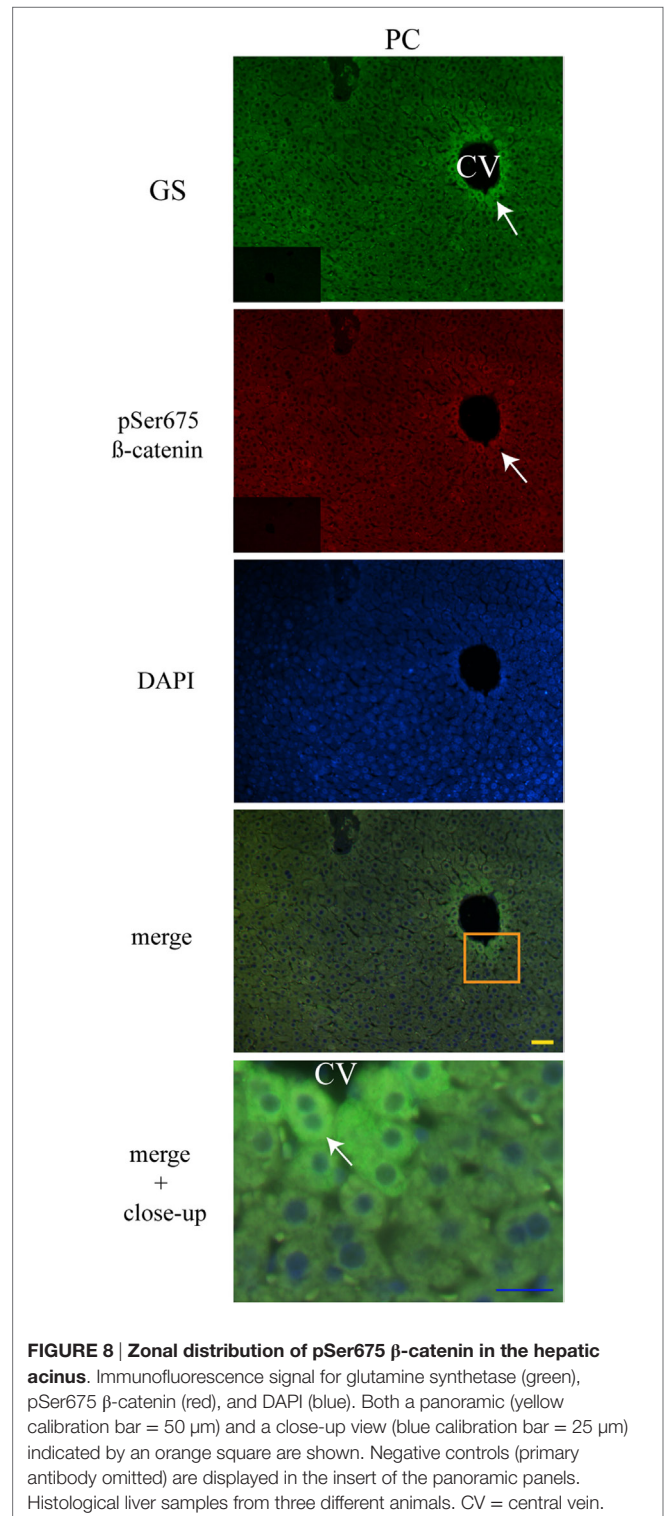
Although the GSK3 $\beta$  phosphorylates  $\beta$ -catenin in the serine 33, this form of  $\beta$ -catenin did not show a rhythmic patron (**Figures 1A,B**). Presumably, this is because multiple and consecutive phosphorylation events are required. First, it is necessary that CK1 $\alpha$  and GSK3 $\beta$  hyperphosphorylate the scaffold proteins of the destruction complex (APC and axin), which increase their affinity for  $\beta$ -catenin. Once the axin-APC- $\beta$ -catenin complex is



formed, CK1 phosphorylates the  $\beta$ -catenin in the serine 45; I $\kappa$ B kinase- $\alpha$  (49) and cyclin D1/Cdk6 (50) can also phosphorylate this site. This priming phosphorylation subsequently promotes that GSK3 $\beta$  phosphorylates threonine 41 and serines 37, and 33 (51), and these residues can be also phosphorylated by PKC (52). In this context, the protein phosphatase 1 acts on axin (53), and in consequence, GSK3 $\beta$  function is impeded. Also, in epithelial cells,  $\beta$ -catenin is constitutive synthesized to form AJ with the E-cadherin (54). Cytosolic presence of newly synthesized  $\beta$ -catenin and release of  $\beta$ -catenin from AJ are regulated by the destruction complex. Thus, we hypothesize that multifactorial equilibrium between phosphorylation and dephosphorylation events by a variety of cellular inputs maintains constant pSer33  $\beta$ -catenin expression levels.

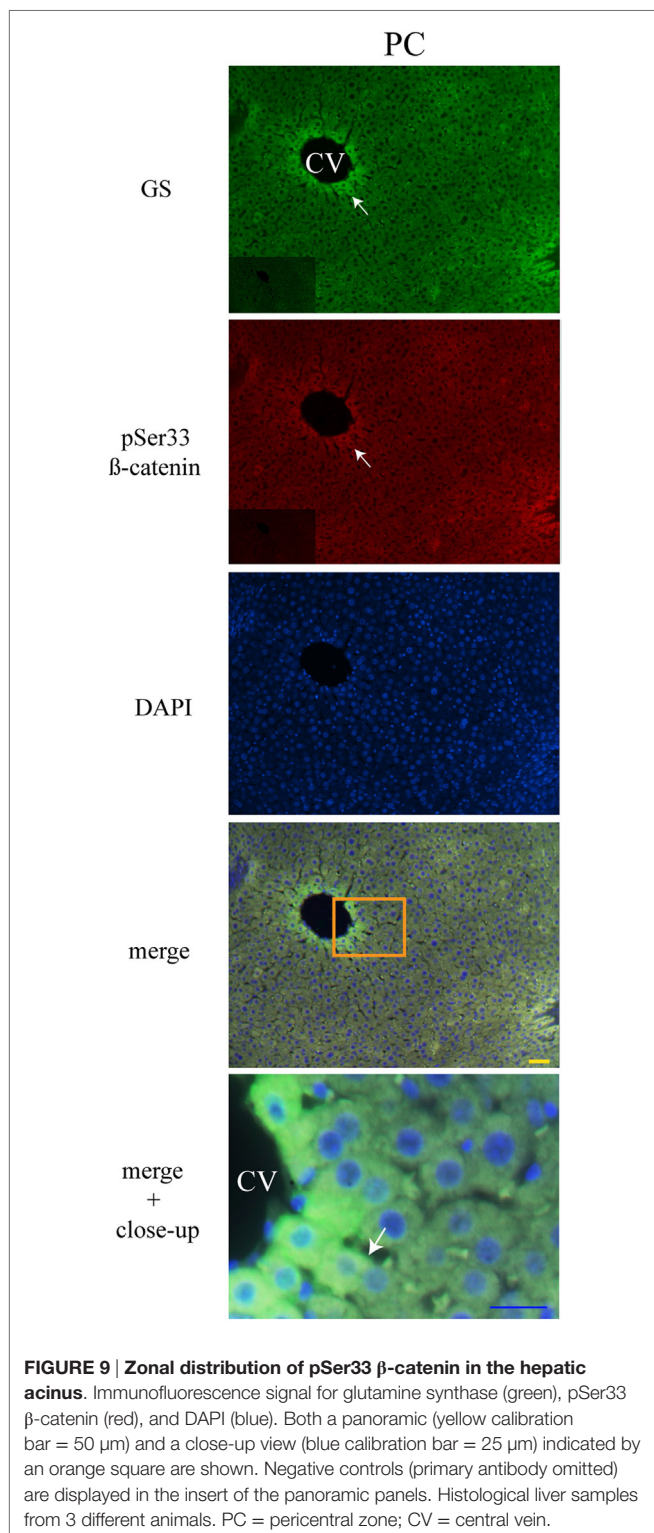
Differences among pSer33  $\beta$ -catenin temporal points in the nucleus (**Figure 1C**) could be explained by the fact that pSer33  $\beta$ -catenin is not transcriptionally active; consequently, it could be periodically exported from the cell nucleus.

Concerning the pSer675  $\beta$ -catenin expression, AL group presented substantial changes in the night, where normally animals eat, and metabolic parameters such as glycemia and insulin are increased (18), a pattern expected for species with



nocturnal feeding habits. In the case of DRF animals, pSer675  $\beta$ -catenin expression was constant in all fractions, but it increased in nucleus (**Figure 2C**). It is known that DRF animals are hypoglycemic and they present high levels of corticosterone and glucagon as well as low levels of insulin (18), three positive regulators of GNG.





**FIGURE 9 | Zonal distribution of pSer33  $\beta$ -catenin in the hepatic acinus.** Immunofluorescence signal for glutamine synthase (green), pSer33  $\beta$ -catenin (red), and DAPI (blue). Both a panoramic (yellow calibration bar = 50  $\mu$ m) and a close-up view (blue calibration bar = 25  $\mu$ m) indicated by an orange square are shown. Negative controls (primary antibody omitted) are displayed in the insert of the panoramic panels. Histological liver samples from 3 different animals. PC = pericentral zone; CV = central vein.

Protein kinase A, which phosphorylates  $\beta$ -catenin at serine 675 (26), is stimulated by glucagon. This condition could be related to the pSer675  $\beta$ -catenin transcriptional activity associated with repeated fasting and the consequent GNG activation. GNG is a physiological adaptation to starvation (short and medium fasting),

stressful conditions, and short-term glycogen-replenishment activity in the liver after food intake (18). It has been confirmed that in the liver of starved animals,  $\beta$ -catenin regulates hepatic glucose metabolism through transcriptional regulation of cyclin D1, which controls the gluconeogenic response in addition to its role in the cell cycle (55, 56). Furthermore,  $\beta$ -catenin regulates the transcription of two of the rate-limiting enzymes in hepatic GNG: glucose-6-phosphatase (G6Pase) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) by interacting with the FoxO1 transcription factor (22).

Indeed, GNG also increases under Fa and Rf conditions. However, when compared to DRF, Fa rats showed a higher presence of pSer675 in the cytosolic fraction (**Figure 2B**), which could be related to a synergic regulation by other signaling pathway elements such as Akt (57), glucagon-like peptide 1 (57), glucagon-like peptide 2 (58), p21 (27), or insulin growth factor 1 (59).

Substantial differences between DRF protocol and an acute 22 h fasting (Fa) are presented in a diversity of metabolic parameters (15, 17–19, 38, 60, 61), supporting the notion that the metabolic state of rats under DRF protocol is unique and distinct from fed and fasted animals. It is proposed under DRF protocol that hepatic physiology acquires a rheostatic state (12, 17) as a result of biochemical and physiological adaptations for a better handling of nutrients.

It has been also reported that the amount of nuclear active dephosphorylated form of  $\beta$ -catenin increases after an overnight fast (22), which could be probably related to the significant incremented expression of total  $\beta$ -catenins in the cytosol and in the cell nucleus under DRF, Fa, and Rf conditions as a response to both acute and repeated fasting (**Figure 3**). DRF shifted the peaks of PEPCK and G6Pase around the time of food access (18), which coincides with the increase of total  $\beta$ -catenins mainly in the light phase (**Figure 3**). DRF also enhanced hepatic PEPCK activity and increased the amount of hepatic G6Pase (18). Therefore, we propose that elevated levels of total  $\beta$ -catenins within the nucleus could exert transcriptional activity, and the increased expression of total  $\beta$ -catenins in the plasma membrane (**Figures 4A,B**) under DRF could be related to cell adhesion properties.  $\beta$ -catenin can bind to type I cadherins, and it plays an essential role in the structural organization of tissues forming the cadherin–catenin complex, which is the base of AJ, to establish and maintain epithelial polarity (62). In hepatocytes, the polarization arrangement is unique and contributes to form the bile canaliculus, the smallest branch of the bile duct that forms a complex interconnected network that spreads along the liver parenchyma, in which tight junctions (TJ) are essential (63). By using a microarray technique, our group detected that, under DRF conditions, both cadherin (AJ) and claudin (TJ) increased by 13.3- and 6.4-folds, respectively, (data not published) after food intake at 14:00 hours; this temporal point is coincident with the maximal expression of total  $\beta$ -catenins in the plasma membrane (**Figure 4B**). At 14:00 hours, hepatocytes showed a larger diameter in comparison to the other schedules and conditions. This fact exhibits a correlation between total  $\beta$ -catenins presence and proteins related to hepatocyte morphology. Díaz-Muñoz et al. (19) demonstrated that DRF

can modify the cross-sectional area of hepatocytes during FAA because at 11:00 hours hepatocytes were about 53% larger than under DRF before (08:00 hours) and after FAA (14:00 hours). In addition, Steinberg and Takeichi (64) postulated that the expression level of adhesion molecules, such as cadherins, influences the strength of adhesion, which provides active adhesion gradients in both vertebrate and insect developing systems. These gradients can determine both morphogenetic movements and specific anatomical configurations (65). Considering that liver weight decreases (~15%) under DRF treatment mainly during the light phase (14), it is possible that the  $\beta$ -catenin–cadherin complex could act as a flexible cell border involved in daily cell size changes: a decrease in hepatocyte diameter after 22 h of fasting (11:00 hours) and an increase in hepatocyte diameter upon replenishing their glycogen after 2 h of food access (14:00 hours) (18) (**Figure 4C**). Indeed, this dynamic cycle of decrease/increase in cell proportion is more noticeable under Fa and Rf conditions (**Figure 4C**).

Regarding the cellular localization of the three different forms of  $\beta$ -catenin, Benhamouche et al. (44) demonstrated both a robust  $\beta$ -catenin expression in the hepatocyte membrane (related to cell adhesion) and a slight cytosolic accumulation of  $\beta$ -catenin in the PC zone of hepatic lobule, while in PP hepatocytes staining in hepatocyte membrane decreased. When they probed the unphosphorylated form of  $\beta$ -catenin (an active form of protein), localization was cytosolic in the both proximal and distal part of PC compartment, whereas its negative regulator APC was expressed in the PP zone. This complementary distribution of  $\beta$ -catenin and APC suggests opposite effects of  $\beta$ -catenin pathway along hepatic acinus.

We observed that pSer33  $\beta$ -catenin is present in the cytosol mainly at 11:00 and 14:00 hours and in the plasma membrane at 02:00 hours, both under DRF (**Figure 5**) and AL (Figure S1 in Supplementary Material) conditions; probably to a daily target for  $\beta$ -catenin degradation that is more evident during the light phase. According to western blot results,  $\beta$ -catenin marked for degradation in the Fa and Rf groups is not as noticeable as the other two groups (**Figure 1B**). Presumably, pSer33  $\beta$ -catenin localization in the plasma membrane is due to a dynamic equilibrium between phosphorylation and dephosphorylation. Unexpectedly, we found pSer675  $\beta$ -catenin close to the plasma membrane (**Figure 6**; Figure S2A in Supplementary Material). Semiquantification of pSer675 at the hepatocyte periphery under AL and DRF conditions demonstrated a decreased average in the DRF group in comparison to the AL group (Figure S2B in Supplementary Material). Apparently, the above result indicate that pSer675  $\beta$ -catenin under DRF could be acting as a reservoir for  $\beta$ -catenin to eventually be translocated to the nucleus. In the Fa group, pSer675  $\beta$ -catenin cytosolic expression (**Figure 6**) correlates with western blot results (**Figure 2B**), probably due to further phosphorylation associated with other signaling pathways.

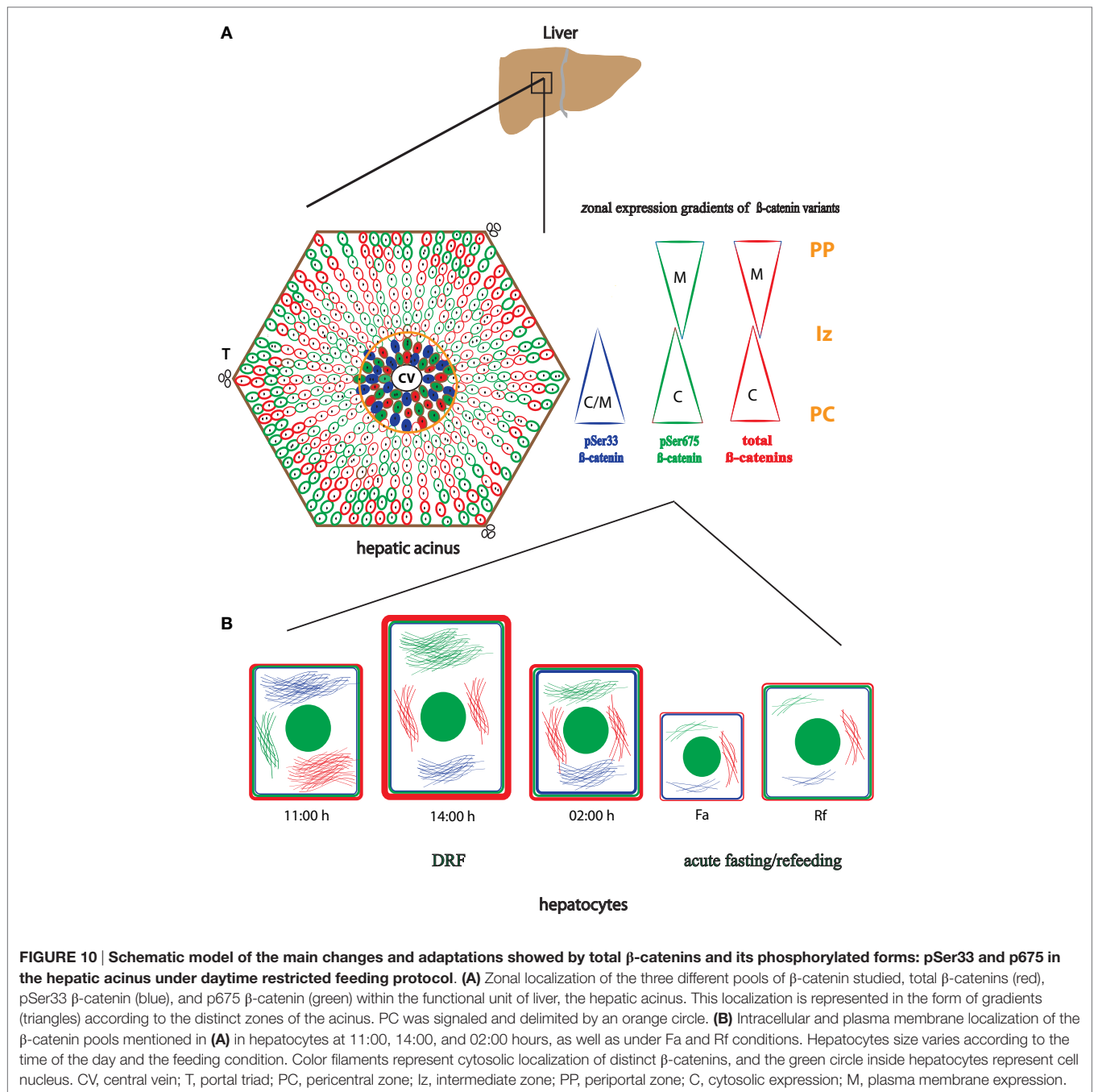
With respect to the localization of  $\beta$ -catenin pools in the hepatic acinus, these showed cytosolic distribution in the PC zone, whereas detection in the plasma membrane was evident from the intermediate to the PP zones (**Figures 6–8**). Benhamouche et al.'s report in 2006 established a key role of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in

liver zonation, which entails a functional and structural cellular heterogeneity. This hepatic zonation suggests an anatomical specialization in  $\beta$ -catenin functions, where in the PC zone,  $\beta$ -catenin that is committed to cell signaling could be accumulated in the cytosol waiting to be shuttled into the nucleus or to be degraded, whereas in the PP zone,  $\beta$ -catenin that plays a structural/reservoir role could be accumulated in the plasma membrane. Recently, the molecular mechanism that controls metabolic liver zonation was determined (66), showing complexity of this phenomena, where the APC protein and the RSPO-LGR4/5-ZNRF3/RNF43 module play essential and complementary roles.

Our results indicate that  $\beta$ -catenin is sensitive to feeding conditions and that both its structural and transcriptional functions are differentially modulated by the DRF protocol. These findings are significant because it would establish  $\beta$ -catenin as an element of the liver metabolic network that is closely related to the circadian molecular clock. To integrate our western blot and immunohistochemical results of the three forms of  $\beta$ -catenin, we elaborated a dynamic model to depict the liver response and adaptation to 2 h of DRF protocol at different times of the day (11:00, 14:00, and 02:00 hours) and feeding conditions (Fa and Rf) (**Figure 10**). In this model, we represented the gradient in the expression of the three different pools of  $\beta$ -catenin studied (total  $\beta$ -catenins, pSer33  $\beta$ -catenin, and pSer675  $\beta$ -catenin), along the hepatic acinus [metabolic zonation from the central vein (CV) to the portal triad (T)] (**Figure 10A**). The intracellular location of each  $\beta$ -catenin within the hepatocyte, besides the hepatocyte morphometry (**Figure 10B**), is shown. The cytoplasmic location of the three  $\beta$ -catenins in the PC hepatocytes can be seen, whereas the presence of total  $\beta$ -catenins and pSer675 in the PP hepatocytes is mostly in the plasma membrane region.

## The $\beta$ -Catenin Protein and FEO Expression

The core of liver circadian clock is based on a molecular mechanism that includes transcriptional/translational loops (67). In this mechanism, we found positive regulators such as the BMAL1 protein and negative regulators such as the PER protein. Both BMAL1 and PER1 show circadian rhythmicity in the liver (68), whose acrophases are modified by the DRF protocol (14). In this sense, experiments with cell cultures of NIH-3T3 cells have shown that overexpressions of BMAL1 increase  $\beta$ -catenin mRNA levels, indicating a direct relationship between them (69). In addition, downregulation of PER2 increases  $\beta$ -catenin in human colon cancer cells (70) and in the breast cancer cell line (MTCL) (30). These data suggest that clock genes in peripheral tissues regulate  $\beta$ -catenin expression. In the liver and other organs, DRF protocol promotes metabolic adaptations and changes in the daily rhythmicity of a various proteins and enzymes from different metabolic pathways (18), hormones (14, 16), receptors (15), calcium dynamics (38), and nuclear receptors (71). Liu et al. (22) demonstrated that  $\beta$ -catenin in the liver acts as a regulator of circulating glucose, GNG and as a modulator of insulin signaling. Moreover, it plays a role in mitochondrial homeostasis and, consequently, in energy balance (72). Many of these metabolic functions show a daily rhythmicity that is affected by the DRF protocol.



In mammals, the suprachiasmatic nuclei (SCN) of the hypothalamus is the main circadian pacemaker (68, 73), which is synchronized by light–dark cycle and organizes the timing of peripheral organs through neural and hormonal pathways (74). The core of circadian system is based on a transcriptional–translational feedback loops of genes and proteins whose oscillating period is near 24 h. Besides light cues, other environmental factors as periodic feeding can entrain circadian rhythms in peripheral oscillators as the liver. In this sense, when food availability is restricted 2–3 h per day (DRF), a new configuration of circadian

system called FEO emerges. The most evident behavior associated to DRF in rodents is the FAA, which persists even when the SCN has been completely ablated (75) and for instance is considered the result of a circadian oscillator different to SCN.

DRF protocol implies both timed restricted feeding and calorie restriction to foster a generalized anticipatory state that optimizes searching, assimilation, and processing of nutrients. In peripheral oscillators, adaptations to restricted feeding paradigm includes a shift in the acrophase of clock genes, hormones, and many proteins (76–78) involved in metabolic pathways near



the time of food accessibility. Under a DRF protocol, we found many interaction points between the molecular circadian clock and the metabolism that are under chronostatic regulation (12). Although the anatomical substrate of the FEO is unknown yet, the liver acts in a coordinated manner with other peripheral oscillators to induce an anticipatory behavior to prepare the animal to search for food.

Due to only a couple hours of food access in the DRF protocol, experimental animals consume lesser quantity of food (~36%) and reduce their body weight (~28%) (data not shown) and nutritional conditions change to be hypocaloric (79) compared to AL group. Calorie restriction involves a reduction in caloric intake (24–60%) from the macronutrients respect to AL animals (80). Animal below hypocaloric conditions did not present malnutrition (81), which had been corroborated in our laboratory by parameters such as albumin, hemoglobin concentration, and mean corpuscular hemoglobin (data not shown). Importance of calorie restriction combined or not with a DRF protocol resides in the resetting of the SCN (82), promoting interaction between the master circadian clock and metabolism. Moreover, the cross-talk between the circadian clock and Wnt signaling relies on two kinases: CK1 and GSK3 $\beta$ . These kinases phosphorylate clock proteins contributing to the fine-tuning regulation of the circadian clock (83), and they downregulate  $\beta$ -catenin activity in the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway (84). The interactions between clock proteins,  $\beta$ -catenin, and different kinases could be a robust switch that coordinates metabolic changes in the liver under the DRF protocol. Further experiments are needed to elucidate if  $\beta$ -catenin, as a structural or as a signaling element, could be acting as an output factor of the hepatic circadian molecular clock.

## Implications of $\beta$ -Catenin in Liver Disease

$\beta$ -catenin is a transcription factor for cell cycle regulators such as cyclin D1 (55) and c-myc (85). Moreover,  $\beta$ -catenin is essential in liver physiology (86). Aberrant  $\beta$ -catenin pathway activation has been associated with various liver pathologies such as defective bile acid metabolism, hepatosteatosis and cholestasis (87), chronic liver disease, hepatic fibrosis, and hepatocellular cancer (HCC) (88). In this sense, it has been reported that HCC cells from animal models and human patients show a constitutive activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling (89). In addition, PER and BMAL1 could influence cell proliferation through Wnt pathway activation (69). It has also been proposed that cancer may be a circadian-related disorder (90) and that DRF decreases tumor size in HCC induced by dimethylnitrosamine (data not shown). All these data strengthen the idea that  $\beta$ -catenin could be considered a key factor in future therapeutic strategies for various liver pathologies.

In conclusion, our results suggest that  $\beta$ -catenin is an essential element in the metabolism and circadian context of liver physiology. Interestingly,  $\beta$ -catenin functions in the liver are zoned, which provides versatility for a good adaptation to metabolic challenges. Further studies are needed to define the mechanistic relationship between these findings and the FEO expression.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

DI-P and MD-M designed the project and wrote the manuscript. DI-P was responsible for the acquisition, analysis of data, and the interpretation of experimental work. Both authors approved the final manuscript for publication and agreed to be accountable for all aspects of the work presented therein.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos, Dr. Olivia Vázquez-Martínez, and Nut. Fernando López Barrera for their technical assistance. We also thank Lic. Jessica González Norris for her careful revision of the English version of this manuscript and MSc Leonor Casanova Rico for her academic support. Dalia Luz De Ita Pérez is a doctoral student from *Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas*, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and she received fellowship number 339099 from CONACYT.

## FUNDING

This work was supported by grant (IN200815) by Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica to MD-M.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2017.00014/full#supplementary-material>.

**FIGURE S1 | Cytosolic co-localization of pSer33  $\beta$ -catenin and total  $\beta$ -catenins in histological liver samples of AL rats.** Immunofluorescence signal for pSer33  $\beta$ -catenin (green), total  $\beta$ -catenins (red), and DAPI (blue) under AL conditions at three different temporal points: 11:00, 14:00, and 02:00 hours (see **Figure 4**, for explanation). Both a panoramic (yellow calibration bar = 50  $\mu$ m) and a close-up view (blue calibration bar = 25  $\mu$ m) indicated by an orange square are shown. Negative controls (primary antibody omitted) are displayed in the insert of the panoramic panels. Histological liver samples from three different animals.

**FIGURE S2 | Plasma membrane co-localization of total  $\beta$ -catenins and pSer675  $\beta$ -catenin in histological liver samples of AL rats. (A)** Immunofluorescence signal for pSer675  $\beta$ -catenin (green), total  $\beta$ -catenins (red), and DAPI (blue) under AL conditions at three different temporal points: 11:00, 14:00, and 02:00 hours (see **Figure 4**, for explanation). Both a panoramic (yellow calibration bar = 50  $\mu$ m) and a close-up view (blue calibration bar = 25  $\mu$ m) indicated by an orange square are shown. Negative controls (primary antibody omitted) are displayed in the insert of the panoramic panels. Histological liver samples from three different animals. **(B)** Histogram showing quantification of plasma membrane presence of pSer675  $\beta$ -catenin in hepatocytes ( $n = 3$  animals) at same temporal points described above under AL (white bars), DRF (black bars), and Fa and Rf (gray bars). Data are represented as the mean  $\pm$  SEM. The horizontal gray lines represent the schedules average of each condition. \*Significant difference between AL and DRF groups average (Student's  $t$ -test,  $p < 0.05$ ). \*Significant difference between AL and DRF groups at the same temporal point (Student's  $t$ -test,  $p < 0.05$ ). f.a.u., fluorescence arbitrary units; nd, not detected.

## REFERENCES

- Challet E, Caldelas I, Graff C, Pévet P. Synchronization of the molecular clockwork by light- and food-related cues in mammals. *Biol Chem* (2003) 384(5):711–9. doi:10.1515/BC.2003.079
- Mendoza J. Circadian clocks: setting time by food. *J Neuroendocrinol* (2007) 19(2):127–37. doi:10.1111/j.1365-2826.2006.01510.x
- Mistlberger RE. Food-anticipatory circadian rhythms: concepts and methods. *Eur J Neurosci* (2009) 30(9):1718–29. doi:10.1111/j.1460-9568.2009.06965.x
- Challet E, Solberg LC, Turek FW. Entrainment in calorie-restricted mice: conflicting zeitgebers and free-running conditions. *Am J Physiol* (1998) 274(6 Pt 2):R1751–61.
- de Vasconcelos AP, Bartol-Munier I, Feillet CA, Gourmelen S, Pévet P, Challet E. Modifications of local cerebral glucose utilization during circadian food-anticipatory activity. *Neuroscience* (2006) 139(2):741–8. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.12.045
- Pezuk P, Mohawk JA, Yoshikawa T, Sellix MT, Menaker M. Circadian organization is governed by extra-SCN pacemakers. *J Biol Rhythms* (2010) 25(6):432–41. doi:10.1177/0748730410385204
- Oosterman JE, Kalsbeek A, la Fleur SE, Belsham DD. Impact of nutrients on circadian rhythmicity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2015) 308(5):R337–50. doi:10.1152/ajpregu.00322.2014
- Hiroshige T, Honma K, Honma S. SCN-independent circadian oscillators in the rat. *Brain Res Bull* (1991) 27(3–4):441–5. doi:10.1016/0361-9230(91)90139-B
- Stephan FK. The ‘other’ circadian system: food as a zeitgeber. *J Biol Rhythms* (2002) 17(4):284–92. doi:10.1177/074873040201700402
- LeSauter J, Hoque N, Weintraub M, Pfaff DW, Silver R. Stomach ghrelin-secreting cells as food-entrainable circadian clocks. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2009) 106(32):13582–7. doi:10.1073/pnas.0906426106
- Carneiro BT, Araujo JF. The food-entrainable oscillator: a network of interconnected brain structures entrained by humoral signals? *Chronobiol Int* (2009) 26(7):1273–89. doi:10.3109/07420520903404480
- Aguilar-Roblero R, Díaz-Muñoz M. Chronostatic adaptations in the liver to restricted feeding: the FEO as an emergent oscillator. *Sleep and Biol Rhythms* (2010) 8(1):9–17. doi:10.1111/j.1479-8425.2009.00415.x
- Schibler U, Ripperger J, Brown SA. Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *J Biol Rhythms* (2003) 18(3):250–60. doi:10.1177/0748730403253381
- Arellanes-Licea Edel C, Báez-Ruiz A, Carranza ME, Arámburo C, Luna M, Díaz-Muñoz M. Daily patterns and adaptation of the ghrelin, growth hormone and insulin-like growth factor-1 system under daytime food synchronization in rats. *J Neuroendocrinol* (2014) 26(5):282–95. doi:10.1111/jne.12145
- Luna-Moreno D, García-Ayala B, Díaz-Muñoz M. Daytime restricted feeding modifies 24 h rhythmicity and subcellular distribution of liver glucocorticoid receptor and the urea cycle in rat liver. *Br J Nutr* (2012) 108(11):2002–13. doi:10.1017/S0007114512000268
- 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 Regul Integr Comp Physiol* (2000) 279(6):R2048–56.
- Báez-Ruiz A, Escobar C, 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(6):G1015–23. doi:10.1152/ajpgi.00488.2004
- 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) 31(7):815–28. doi:10.3109/07420528.2014.908898
- Díaz-Muñoz M, Vázquez-Martínez O, Báez-Ruiz A, Martínez-Cabrera G, Soto-Abraham MV, Avila-Casado MC, et al. Daytime food restriction alters liver glycogen, triacylglycerols, and cell size. A histochemical, morphometric, and ultrastructural study. *Comp Hepatol* (2010) 9:5. doi:10.1186/1476-5926-9-5
- Amin N, Vincan E. The Wnt signaling pathways and cell adhesion. *Front Biosci (Landmark Ed)* (2012) 17:784–804. doi:10.2741/3957
- Peifer M, Berg S, Reynolds AB. A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell* (1994) 76(5):789–91. doi:10.1016/0092-8674(94)90353-0
- Liu H, Fergusson MM, Wu JJ, Rovira II, Liu J, Lu T, et al. Metabolism Wnt signaling regulates hepatic metabolism. *Sci Signal* (2011) 4(158):1–22. doi:10.1126/scisignal.2001249
- Niehrs C. The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2012) 13(12):767–79. doi:10.1038/nrm3470
- Dajani R, Fraser E, Roe SM, Yeo M, Good VM, Thompson V, et al. Structural basis for recruitment of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  to the axin-APC scaffold complex. *EMBO J* (2003) 22(3):494–501. doi:10.1093/emboj/cdg068
- Hart M, Concordet JB, Lassot I, Albert I, del los Santos R, Durand H, et al. The F-box protein B-Trc associates with phosphorylated B-catenin and regulates its activity in the cell. *Curr Biol* (1999) 9:207–10. doi:10.1016/S0960-9822(99)80091-8
- van Veelen W, Le NH, Helvensteijn W, Blondin L, Theeuwes M, Bakker ER, et al. B-catenin tyrosine 654 phosphorylation increases Wnt signalling and intestinal tumorigenesis. *Gut* (2011) 60(9):1204–12. doi:10.1136/gut.2010.233460
- Zhu G, Wang Y, Huang B, Liang J, Ding Y, Xu A, et al. A Rac1/PAK1 cascade controls  $\beta$ -catenin activation in colon cancer cells. *Oncogene* (2012) 31(8):1001–12. doi:10.1038/onc.2011.294
- Taurin S, Sandbo N, Qin Y, Browning D, Dulin NO. Phosphorylation of B-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* (2006) 281(15):9971–6. doi:10.1074/jbc.M508778200
- Behari J, Li H, Liu S, Stefanovic-Racic M, Alonso L, O'Donnell CP, et al. B-catenin links hepatic metabolic zonation with lipid metabolism and diet-induced obesity in mice. *Am J Pathol* (2014) 184(12):3284–98. doi:10.1016/j.ajpath.2014.08.022
- Wood PA, Yang X, Hrushesky WJ. Clock genes and cancer. *Integr Cancer Ther* (2009) 8(4):303–8. doi:10.1177/1534735409355292
- Yang X, Wood PA, Ansell CM, Ohmori M, Oh EY, Xiong Y, et al. B-catenin induces B-Trc-mediated PER2 degradation altering circadian clock gene expression in intestinal mucosa of ApcMin/+ Mice. *J Biochem* (2009) 145(3):289–97. doi:10.1093/jb/mvn167
- Guo B, Chatterjee S, Li L, Kim JM, Lee J, Yeheer VK, et al. The clock gene, brain and muscle Arnt-like 1, regulates adipogenesis via Wnt signaling pathway. *FASEB J* (2012) 26(8):3453–63. doi:10.1096/fj.12-205781
- Mehra A, Baker CL, Loros JJ, Dunlap JC. Post-translational modifications in circadian rhythms. *Trends Biochem Sci* (2009) 34(10):483–90. doi:10.1016/j.tibs.2009.06.006
- Portaluppi F, Smolensky MH, Touitou Y. Ethics and methods for biological rhythm research on animals and human beings. *Chronobiol Int* (2010) 27:1911–29. doi:10.3109/07420528.2010.516381
- Davidson AJ, Stephan FK. Plasma glucagon, glucose, insulin, and motilin in rats anticipating daily meals. *Physiol Behav* (1999) 66(2):309–15. doi:10.1016/S0031-9384(98)00308-4
- Ángeles-Castellanos M, Mendoza J, Diaz-Munoz M, Escobar C. Food entrainment modifies the c-Fos expression pattern in brain stem nuclei of rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2005) 288(3):R678–84. doi:10.1152/ajpregu.00590.2004
- 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(7):1409–29. doi:10.3109/07420520903417003
- Báez-Ruiz A, Cázares-Gómez K, Vázquez-Martínez O, Aguilar-Roblero R, Díaz-Muñoz M. Diurnal and nutritional adjustments of intracellular Ca $^{2+}$  release channels and Ca $^{2+}$  ATPases associated with restricted feeding schedules in the rat liver. *J Circadian Rhythms* (2013) 11(1):8. doi:10.1186/1740-3391-11-8
- Reiners JJ, Busch H. Transcriptional and posttranscriptional modulation of cytoplasmic ribonucleic acids in regenerating liver and Novikoff hepatoma. *Biochemistry* (1980) 19:833–41. doi:10.1021/bi00546a002
- Aguilar-Delfin I, López-Barrera R, Hernández-Muñoz F. Selective enhancement of lipid peroxidation in plasma membrane in two experimental models of liver regeneration: partial hepatectomy and acute CCl $_4$  administration. *Hepatology* (1996) 24(3):657–62. doi:10.1002/hep.510240331

41. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* (1976) 72:248–54. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
42. Abràmoff MD, Magalhaes PJ, Ram SJ. Image processing with Image J. *Biophotonics Int* (2004) 11(7):36–42.
43. Zuther P, Gorberry S, Lemmer B. Chronos-Fit. (2009). Available from: <http://www.ma.uni-heidelberg.de/inst/phar/lehre/chrono.html>
44. Benhamouche S, Decaens T, Godard C, Chambrey R, Rickman DS, Moinard C, et al. Apc tumor suppressor gene is the 'zonation-keeper' of mouse liver. *Dev Cell* (2006) 10(6):759–70. doi:10.1016/j.devcel.2006.03.015
45. Monga SP. Role and regulation of B-catenin signaling during physiological liver growth. *Gene Expr* (2014) 16(2):51–62. doi:10.3727/105221614X13919976902138
46. Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* (1997) 11(24):3286–305. doi:10.1101/gad.11.24.3286
47. Bienz M.  $\beta$ -Catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling. *Curr Biol* (2005) 15(2):R64–7. doi:10.1016/j.cub.2004.12.058
48. Daugherty RL, Gottardi CJ. Phospho-regulation of beta-catenin adhesion and signaling functions. *Physiology (Bethesda)* (2007) 22(14):303–9. doi:10.1152/physiol.00020.2007
49. Provost E, Yamamoto Y, Lizardi I, Stern J, D'Aquila TG, Gaynor RB, et al. Functional correlates of mutations in B-catenin exon 3 phosphorylation sites. *J Biol Chem* (2003) 278(34):31781–9. doi:10.1074/jbc.M304953200
50. Park CS, Lee MS, Oh HJ, Choi KY, Yeo MG, Chun JS, et al. Modulation of  $\beta$ -catenin by cyclin-dependent kinase 6 in Wnt-stimulated cells. *Eur J Cell Biol* (2007) 86(2):111–23. doi:10.1016/j.ejcb.2006.10.004
51. Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, et al. Control of B-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* (2002) 108(6):837–47. doi:10.1016/S0092-8674(02)00685-2
52. Gwak J, Cho M, Gong SJ, Won J, Kim DE, Kim EY, et al. Protein-kinase-C-mediated beta-catenin phosphorylation negatively regulates the Wnt/ beta-catenin pathway. *J Cell Sci* (2006) 119(22):4702–9. doi:10.1242/jcs.03256
53. Luo W, Peterson A, Garcia BA, Coombs G, Kofahl B, Heinrich R, et al. Protein phosphatase 1 regulates assembly and function of the B-catenin degradation complex. *EMBO J* (2007) 26(6):1511–21. doi:10.1038/sj.emboj.7601607
54. Yap AS, Briehner WM, Gumbiner BM. Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol* (1997) 13:119–46. doi:10.1146/annurev.cellbio.13.1.119
55. Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, et al. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1999) 96(10):5522–7. doi:10.1073/pnas.96.10.5522
56. Bhalla K, Liu WJ, Thompson K, Anders L, Devarakonda S, Dewi R, et al. Cyclin D1 represses gluconeogenesis via inhibition of the transcriptional coactivator PGC1 $\alpha$ . *Diabetes* (2014) 63(10):3266–78. doi:10.2337/db13-1283
57. Ying Y, Zhu H, Liang X, Ma X, Li S. GLP1 protects cardiomyocytes from palmitate-induced apoptosis via Akt/GSK3 $\beta$ /b-catenin pathway. *J Mol Endocrinol* (2015) 55(3):245–62. doi:10.1530/JME-15-0155
58. Dubé PE, Rowland KJ, Brubaker PL. Glucagon-like peptide-2 activates  $\beta$ -catenin signaling in the mouse intestinal crypt: role of insulin-like growth factor-I. *Endocrinology* (2008) 149(11):291–301. doi:10.1210/en.2007-0561
59. Desbois-Mouthon C, Cadoret A, Blivet-Van Eggelpoel MJ, Cherqui G, Perret C, Capeau J. Insulin and IGF-1 stimulate the B-catenin pathway through two signalling cascades involving GSK-3 B inhibition and Ras activation. *Oncogene* (2001) 20(2):252–9. doi:10.1038/sj.onc.1204064
60. Aceves C, Escobar C, Rojas-Huidobro R, Vázquez-Martínez O, Martínez-Merlos T, Aguilar-Roblero R, et al. Liver 5'-deiodinase activity is modified in rats under restricted feeding schedules: evidence for post-translational regulation. *J Endocrinol* (2003) 179(1):91–6. doi:10.1677/joe.0.1790091
61. 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(4):632–43. doi:10.1016/j.cbpa.2006.02.039
62. Gumbiner BM. Regulation of cadherin adhesive activity. *J Cell Biol* (2000) 148(3):399–404. doi:10.1083/jcb.148.3.399
63. Slim CL, Lázaro-Diéguez F, Bijlard M, Toussaint MJ, de Bruin A, Du Q, et al. Par1b induces asymmetric inheritance of plasma membrane domains via LGN-dependent mitotic spindle orientation in proliferating hepatocytes. *PLoS Biol* (2013) 11(12):e1001739. doi:10.1371/journal.pbio.1001739
64. Steinberg MS, Takeichi M. Experimental specification of cell sorting, tissue spreading, and specific spatial patterning by quantitative differences in cadherin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1994) 91(1):206–9. doi:10.1073/pnas.91.1.206
65. Nardi JB, Kafatos FC. Polarity and gradients in lepidopteran wing epidermis. *J Embryol Exp Morphol* (1976) 36(3):469–87.
66. Planas-Paz L, Orsini V, Boulter L, Calabrese D, Pikiolek M, Nigsch F, et al. The RSPO-LGR4/5-ZNRF3/RNF43 module controls liver zonation and size. *Nat Cell Biol* (2016) 18(5):467–79. doi:10.1038/ncb3337
67. Lowrey PL, Takahashi JS. Genetics of circadian rhythms in mammalian model organisms. *Adv Genet* (2011) 74:175–230. doi:10.1016/B978-0-12-387690-4.00006-4
68. Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* (2002) 418(6901):935–41. doi:10.1038/nature00965
69. Lin F, Chen Y, Li X, Zhao Q, Tan Z. Over-expression of circadian clock gene Bmal1 affects proliferation and the canonical Wnt pathway in NIH-3T3 cells. *Cell Biochem Funct* (2013) 31(2):166–72. doi:10.1002/cbf.2871
70. Wood PA, Yang X, Taber A, Oh EY, Ansell C, Ayers SE, et al. Period 2 mutation accelerates ApcMin/+ tumorigenesis. *Mol Cancer Res* (2008) 6(11):1786–93. doi:10.1158/1541-7786.MCR-08-0196
71. Rivera-Zavala JB, Báez-Ruiz A, Díaz-Muñoz M. Changes in the 24h rhythmicity of liver PPARs and peroxisomal markers when feeding is restricted to two daytime hours. *PPAR Res* (2011) 2011:261584. doi:10.1155/2011/261584
72. Lehwald N, Tao G, Jang KY, Papandreou I, Liu B, Liu B, et al.  $\beta$ -catenin regulates hepatic mitochondrial function and energy balance in mice. *Gastroenterology* (2012) 143(3):754–64. doi:10.1053/j.gastro.2012.05.048
73. Moore RY, Eichler VB. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res* (1972) 42(1):201–6. doi:10.1016/0006-8993(72)90054-6
74. Albrecht U. Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. *Neuron* (2012) 74(2):246–60. doi:10.1016/j.neuron.2012.04.006
75. Phillips JL, Mikulka PJ. The effects of restricted food access upon locomotor activity in rats with suprachiasmatic nucleus lesions. *Physiol Behav* (1979) 23(2):257–62. doi:10.1016/0031-9384(79)90364-0
76. Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, Schibler U. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev* (2000) 14(23):2950–61. doi:10.1101/gad.183500
77. Wakamatsu H, Yoshinobu Y, Aida R, Moriya T, Akiyama M, Shibata S. Restricted-feeding-induced anticipatory activity rhythm is associated with a phase-shift of the expression of mPer1 and mPer2 mRNA in the cerebral cortex and hippocampus but not in the suprachiasmatic nucleus of mice. *Eur J Neurosci* (2001) 13(6):1190–6. doi:10.1046/j.0953-816X.2001.01483.x
78. Hara R, Wan K, Wakamatsu H, Aida R, Moriya T, Akiyama M, et al. Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells* (2001) 6(3):269–78. doi:10.1046/j.1365-2443.2001.00419.x
79. Challet E. Interactions between light, mealtime and calorie restriction to control daily timing in mammals. *J Comp Physiol B* (2010) 180(5):631–44. doi:10.1007/s00360-010-0451-4
80. Masoro EJ, Shimokawa I, Higami Y, McMahan CA, Yu BP. Temporal pattern of food intake not a factor in the retardation of aging processes by dietary restriction. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* (1995) 50A(1):B48–53. doi:10.1093/gerona/50A.1.B48
81. Froy O. The relationship between nutrition and circadian rhythms in mammals. *Front Neuroendocrinol* (2007) 28(2–3):61–71. doi:10.1016/j.yfrne.2007.03.001
82. Mendoza J, Drevet K, Pévet P, Challet E. Daily meal timing is not necessary for resetting the main circadian clock by calorie restriction. *J Neuroendocrinol* (2008) 20(2):251–60. doi:10.1111/j.1365-2826.2007.01636.x
83. Gallego M, Virshup DM. Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2007) 8(2):139–48. doi:10.1038/nrm2106
84. Stamos JL, Weis WI. The B-catenin destruction complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol* (2013) 5(1):1–16. doi:10.1101/cshperspect.a007898
85. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* (1998) 281(5382):1509–12. doi:10.1126/science.281.5382.1509



86. Thompson MD, Monga SP. WNT/B-catenin signaling in liver health and disease. *Hepatology* (2007) 45(5):1298–305. doi:10.1002/hep.21651
87. Behari J, Yeh TH, Krauland L, Otruba W, Ciepły B, Hauth B, et al. Liver-specific B-catenin knockout mice exhibit defective bile acid and cholesterol homeostasis and increased susceptibility to diet-induced steatohepatitis. *Am J Pathol* (2010) 176(2):744–53. doi:10.2353/ajpath.2010.090667
88. Boyault S, Rickman DS, De Reyniès A, Balabaud C, Rebouissou S, Jeannot E, et al. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology* (2007) 45(1):42–52. doi:10.1002/hep.21467
89. Okabe H, Kinoshita H, Imai K, Nakagawa S, Higashi T, Arima K, et al. Diverse basis of B-catenin activation in human hepatocellular carcinoma: implications in biology and prognosis. *PLoS One* (2016) 11(4):e0152695. doi:10.1371/journal.pone.0152695
90. Rana S, Mahmood S. Circadian rhythm and its role in malignancy. *J Circadian Rhythms* (2010) 8(1):1–13. doi:10.1186/1740-3391-8-3

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 De Ita-Pérez and Díaz-Muñoz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## ORIGINAL RESEARCH

## Effect of daytime-restricted feeding in the daily variations of liver metabolism and blood transport of serotonin in rat

Marlen Valdés-Fuentes<sup>1</sup>, Gabriela Vera-Rivera<sup>2</sup>, Dalia De Ita-Pérez<sup>3</sup>, Isabel Méndez<sup>3</sup>, María Isabel Miranda<sup>2</sup> & Mauricio Díaz-Muñoz<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Qro., México

<sup>2</sup> Department of Behavioral and Cognitive Neurobiology, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Querétaro, Qro., México

<sup>3</sup> Department of Cellular and Molecular Neurobiology, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Querétaro, Qro., México

### Keywords

Blood, daytime-restricted feeding, food entrained oscillator, tryptophan, tryptophan hydroxylase 1.

### Correspondence

Mauricio Díaz-Muñoz, Department of Cellular and Molecular Neurobiology, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Campus UNAM-Juriquilla, Blvd. Juriquilla 3001, CP. 76230 Querétaro, Qro., México.  
Tel/Fax: +525556234035  
E-mail: mdiaz@comunidad.unam.mx

### Funding Information

The project was supported by grants IN-202412 form PAPIIT, UNAM and 12-511 from CONACyT. We thank Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM and Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado PAEP-UNAM, for support. We thank Dr. Dorothy Pless for critically editing the manuscript, Dra. Olivia Vázquez-Martínez, Raúl Calderón Aguilera, E. Nydia Hernández Ríos, Lic. Lourdes Lara Ayala, Sandra Hernández García, Nut. Fernando López-Barrera and MVZ Martín García for their technical assistant.

Received: 13 March 2015; Revised: 27 March 2015; Accepted: 30 March 2015

doi: 10.14814/phy2.12389

**Physiol Rep, 3 (5), 2015, e12389, doi: 10.14814/phy2.12389**

### Abstract

The biogenic amine serotonin is a signaling molecule in the gastrointestinal tract, platelets, and nervous tissue. In nervous system, serotonin and its metabolites are under the control of the circadian timing system, but it is not known if daily variations of serotonin exist in the liver. To explore this possibility, we tested if the rhythmic pattern of serotonin metabolism was regulated by daytime restricted feeding (DRF) which is a protocol associated to the expression of the food entrained oscillator (FEO). The DRF involved food access for 2 h each day for 3 weeks. Control groups included food ad libitum (AL) as well as acute fasting and refeeding. Serotonin-related metabolites were measured by high pressure liquid chromatography, the anabolic and catabolic enzymes were evaluated by western blot, qPCR, and immunohistochemistry to generate 24-h profiles. The results showed in the AL group, liver serotonin, tryptophan hydroxylase-1 activity, and protein abundance as well as serotonin in plasma and serum were rhythmic and coordinated. The DRF protocol disrupted this coordinated response and damped the rhythmic profile of these parameters. We demonstrated the daily synthesis and the degradation of serotonin as well as its transport in blood. This rhythm could influence the physiological role played by serotonin in peripheral organs. DRF caused an uncoordinated response in the liver and blood serotonin rhythm. This modification could be a part of the physiology of the FEO

## Introduction

Serotonin or 5-hydroxytryptamine (5-HT) is a monoamine synthesized in the neurons of the central nervous system, as well as in the enterochromaffin cells (ECs) of the gastrointestinal (GI) tract (Mawe and Hoffman 2013). It regulates a variety of physiologic states and behaviors such as pain, appetite, mood, learning, sleep, vascular tone, GI motility and apoptosis, intestinal cell proliferation, and platelet aggregation (Berger *et al.* 2009; Bertrand and Bertrand 2010). 5-HT is synthesized from the essential amino acid L-tryptophan (L-Trp). The rate limiting enzyme, tryptophan hydroxylase (or L-aromatic amino acid decarboxylase, tryptophan hydroxylase [TPH] EC 1.14.16.4.) converts L-Trp to 5-hydroxytryptophan (5-HTP), which is then converted to 5-HT. TPH exists in two isoforms, TPH-1 found in the pineal gland and peripheral organs (Sakowski *et al.* 2006), and TPH-2 selectively expressed in brain (Walther *et al.* 2003). About 95% of 5-HT in the body is found in the GI tract, mostly within the ECs, and the remaining 5% is in the brain and different tissues (Lesurtel *et al.* 2008). Platelets are the major sites for 5-HT storage, and the 5-HT released following platelet aggregation is the source of 5-HT available for blood vessels (Ni *et al.* 2008). 5-HT in tissues is rapidly metabolized, mainly by monoamine oxidase (MAO) (EC 1.4.3.4.). There are two types of MAO enzymes, and MAO-A is the one that preferentially oxidizes 5-HT (Bach *et al.* 1988). In the liver, 5-HT regulates several key aspects of liver function, such as hepatic blood flow, innervation, wound healing, and liver regeneration (Ruddell *et al.* 2008; Kawasaki *et al.* 2010).

In mammals, circadian rhythms are generated by the major endogenous pacemaker localized in the suprachiasmatic nucleus (SCN), at the anterior hypothalamus (Challet 2007). It is now accepted that alternative clocks are located in many peripheral organs and tissues, such as the liver. The resultant timing system can be entrained by environmental factors including photonic and non-photonic stimuli (Vollmers *et al.* 2009). Daytime restricted feeding (DRF) is an experimental protocol used to study the physiological and metabolic adaptations of circadian rhythmicity when mealtime becomes a predominant timing cue (Stephan 2002). DRF usually involves food intake for 2–4 h in the middle of the light period. After few days, the animals show behavioral arousal before meal time known as anticipatory activity (Mistlberger 2009). In addition, the 24-h variations of a great variety of metabolic and endocrine parameters change their phase, amplitude, or even the type of rhythmicity. Overall, DRF orchestrates a physiological response that has been considered by some authors as rheostatic (Aguilar-Roblero and Díaz-Muñoz 2009). Underlying the DRF protocol is

also the expression of an alternative circadian oscillator, independent of the SCN, whose anatomic location is so far unknown. This putative oscillator is known as the food entrained oscillator (FEO) (Mendoza 2007).

The aim of this study was to gain more about the daily fluctuations of serotonin metabolism in the liver when food access is ad libitum (AL) or restricted. The results showed that 5-HT is generated within the liver, and that its synthesis is regulated differently during FEO expression.

## Materials and Methods

### Animals

Adult male Wistar rats weighing  $200 \pm 20$  g were maintained in constant conditions of 12 h:12 h light-dark cycles (lights on at 8 h) and constant temperature ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Rats were kept in groups of four in transparent acrylic cages ( $40 \times 50 \times 20$  cm) with free access to water and Purina Chow except during DRF, acute fasting (Fa), or acute fasting-refeeding (Fa-Re) conditions. All experimental procedures were approved by the Bioethics Committee of the Institute of Neurobiology, Universidad Nacional Autónoma de México, and confirmed with international ethical standards (Portaluppi *et al.* 2010).

### Experimental design

The experimental protocol had four groups: (1) Rats fed AL; (2) rats under DRF schedule with mealtime only from 1200 to 1400 h for 3 weeks; (3) rats fasted for 21 h, and (4) rats that were fasted 22 h and refed for 2 h (from 1200 to 1400 h). Rats were sacrificed by decapitation at 0800, 1100, 1400, 1700, 2000, 2300, 0200, and 0500 h. The controls of feeding condition, Fa and Fa-Re, were sacrificed at 1100 h and 1400 h, respectively. Immediately after sacrifice, livers were homogenized or frozen in dry ice and kept at  $-80^\circ\text{C}$  until analysis. Two samples of blood were collected. Immediately after decapitation, for serum, blood was collected in Vacutainer<sup>®</sup> (Becton Dickinson, Mexico City, Mexico) tubes and centrifuged at 2500g for 5 min. For plasma, blood was collected in BD Vacutainer<sup>®</sup> (Becton Dickinson) tubes with K<sub>2</sub> Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and centrifuged at 1500g for 10 min.

### Subcellular fractionation

A sample of 2 g of the liver was homogenized in 15 mL of buffer (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 225 mmol/L sucrose, 0.2% Bovine serum albumin, 0.3 mol/L Ethylene glycol tetraacetic acid). Briefly, the homogenate was cen-

trifuged at 1500g for 15 min, and the supernatant was centrifuged at 10,000g for 15 min to sediment the mitochondrial fraction, which was resuspended. The second supernatant was centrifuged at 100,000g for 1 h for the microsomal and cytosolic fractions. All centrifugations were performed at 4°C, and aliquots were kept at -80°C.

### qPCR amplifications

TPH-1 gene expression was evaluated by isolating total RNA from liver tissue (20–30 mg) using the SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI). The amount and quality of RNA were estimated spectrophotometrically at 260 and 280 nm, and a constant amount of RNA (2 µg) was reverse transcribed using SuperScript™ III Reverse Transcriptase, Oligo(dT)<sub>12–18</sub> Primer, RNase-OUT™ recombinant ribonuclease inhibitor, and dNTP Set polymerase chain reaction (PCR) Grade (Invitrogen, Carlsbad, CA). Amplification was performed in triplicate in the CFX96™ real-time PCR detection system (Bio-Rad, Hercules, CA). Primers used for quantitative PCR (qPCR) amplifications were synthesized by Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO), and the corresponding sequences are shown in Table 1. Amplifications were carried out with Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) in a 10 µL final reaction volume containing cDNA (1/20) and 0.5 µmol/L of each of the primer pairs in SYBR Green Master Mix, according to the following protocol: activation of Taq DNA polymerase and DNA denaturation at 95°C for 10 min, followed by 40 amplification cycles consisting of 10 sec at 95°C, 30 sec at 60°C, and 30 sec at 72°C. The PCR data were analyzed by the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method, and cycle thresholds normalized to the housekeeping gene Rps18 were used to calculate the mRNA levels of TPH-1.

### Western-blot analysis

Proteins from the liver homogenate and hepatic fractions were separated by 15% sodium dodecyl sulfate polyacryl-

amide gel electrophoresis (SDS-PAGE) under reducing conditions, transferred to nitrocellulose membranes, and blocked for 1 h in Tris-Buffered Saline and Tween 20 (TBST) buffer (20 mmol/L Tris, pH 7.5, 500 mmol/L NaCl, 0.5% Tween 20) with 5% non-fat milk. Anti-TPH1 (ab52954, Abcam, Cambridge, U.K.) (1/3500 in TBST) or anti-MAOa (sc-20156, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA) (1/1000 in TBST) was added as primary antibody and incubated overnight at 4°C. As loading controls for liver homogenates, membranes were incubated with mouse anti-tubulin antibody (ab 56676 Abcam, UK) diluted 1/1000, for mitochondrial fractions was used as control protein of mitochondrial origin, rabbit anti-VDAC1/Porin antibody (ab15895; Abcam, UK) diluted 1/1000. After washing, membranes were incubated with the appropriate secondary antibodies conjugated to alkaline phosphatase (sc2315, Santa Cruz Biotechnology, Inc.)/5000. Bands were revealed using the AP conjugate substrate kit (Bio-Rad, CA). Densitometric analysis was performed using the Image Lab Software (v 3.0, Bio-Rad, CA).

### Immunohistochemistry

Liver tissue was fixed for 1 week in 10% formalin at 4°C, with formalin changes every 2 days. After fixation, the tissue was embedded in paraffin and sectioned into 7 µm slices. Samples were deparaffinized for 2 h at 60°C in a dry-heat oven. After that, sections were rehydrated in the solvent series: Xylo 100% (10 min), ethanol 100% (5 min), ethanol 96% (5 min), ethanol 80% (5 min), and deionized water (10 min), with a subsequent bath in permeabilization buffer (4 mmol/L sodium citrate, 0.1% Tween 20) for 8 min. Antigen retrieval was performed in EDTA buffer (1 mmol/L EDTA, 0.05% Tween 20, pH 8) in a water bath at 90°C for 1 h, followed by blocking with 1% non-fat milk for 1 h. The sections were washed 3 × 5 min with 0.05% TBST and then incubated overnight at 4°C with the primary antibody against TPH-1 (ab52954, Abcam, UK) diluted 1:50. The next day, sec-

**Table 1.** *Rattus norvegicus* oligonucleotide sequences used in qRT-PCR experiments.

Genes	GenBank		Primer sequence	Size (bp)	Ta (°C)
Tryptophan hydroxylase 1 (Tph1)	NM_001100634.2	Sense	GCTGAACA AACTCTACCCAAC	86	60
		Antisense	CTTCCCGATAGCCACAGTATT		
Tryptophan hydroxylase 2 (Tph2)	NM_173839.2	Sense	GGGTTACTTTCCTCCATCGGA	85	60
		Antisense	AAGCAGGTTGTCTTCGGGTC		
Monoamine oxidase A (MAO-A)	D00688	Sense	GCCAGGAACGGAAATTTGTA	231	62
		Antisense	TCTCAGGTGGAAGCTCTGGT		
Ribosomal protein S18 (Rps18)	BC126072.1	Sense	TTCAGCACATCCTGCGAGTA	136	62
		Antisense	TTGGTGAGGTCAATGTCTGC		

tions were washed  $3 \times 5$  min with 0.05% TBST and incubated for 2 h with the secondary antibody (Alexa Fluor<sup>®</sup> 594 goat anti-rabbit IgG, Invitrogen) diluted 1:400. The staining was visualized using a confocal microscope Zeiss Axiovert 200 LSM 510 Meta-Multiphoton and captured by software LSM 510 Meta by Zeiss (Mexico city, Mexico).

### Tryptophan hydroxylase activity

TPH activity was measured in liver homogenates using a radioactive isotope assay (Barbosa et al. 2008) with the following reaction medium: Hepes (50 nmol/L, pH 7), catalase (100  $\mu$ g/mL), tryptophan (50  $\mu$ mol/L), dithiothreitol (5 mmol/L), Fe (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (10  $\mu$ mol/L), 6-methyl-5-6-7-8-tetrahydropterine dihydrochloride (6-MPH4) (500  $\mu$ mol/L), and 1  $\mu$ L of [<sup>3</sup>H] tryptophan (1  $\mu$ mL). The sample was incubated at 37°C for 10 min. The reaction was stopped by adding a suspension of activated charcoal (7.5% in 1 mol/L HCl), and 200  $\mu$ L of the supernatant was transferred to scintillation tubes; scintillation fluid was added, and radioactivity was evaluated with a Beckman  $\beta$  counter.

### Measurement of 5-HT, 5-HTP, and L-Trp by HPLC

5-HT and 5-HTP concentrations within the liver, platelet-free plasma, and platelet-rich plasma were assayed by high pressure liquid chromatography (HPLC). Liver samples were homogenized 1/5 (w/v) in 0.1 mol/L HClO<sub>4</sub> containing 0.2 mmol/L EDTA, filtered with a centrifuge tube filter (Spin-X, Costar<sup>®</sup>, Corning, NY). The HPLC system consisted of a delivery pump (Solvent Delivery System PM-80; Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN), a simple injector (BASi Liquid Chromatography CC-SE, 20  $\mu$ L loop; Bioanalytical Systems), a C18 reverse phase column (BASi ODS C18, 100  $\times$  3 mm, 3  $\mu$ m particle size; Bioanalytical Systems), and an electrochemical detector (Bioanalytical Systems) with a carbon electrode; the potential was adjusted to +600 mV versus the reference electrode (Ag/AgCl). The mobile phase contained 0.1 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05 mol/L Citric acid, 0.17 mmol/L EDTA, 1 mmol/L KCl, and 2% methanol (v/v), pH 4.5. The flow rate was 0.6 mL per min at a pressure of 2400 psi. All chromatograms were recorded and analyzed using the ChromGraph Report software 2.3 (Bioanalytical Systems). Tryptophan was measured in homogenates using HPLC (Dionex, Ultimate 3000, Thermo Scientific, Chromeleon 6.8 software integrator for data analysis, Waltham, MA) with fluorescence detection (excitation and emission 337 and 442 nm, respectively) after o-phthaldehyde (OPA) derivatization. The sample homogenates (25  $\mu$ L) were mixed with 25  $\mu$ L

of OPA in a tube, and after 2 min they were injected onto a Synchronis C18 column (250  $\times$  4.6 mm, Particle size 5  $\mu$ m, Thermo Scientific) at 20°C. We used a mobile phase of 0.1 mol/L potassium acetate adjusted to pH 5.5 with glacial acetic acid and a gradient with 25% methanol, 75% mobile phase, flow rate 2.5 mL/min.

The concentrations were determined from peak areas using external standards of L-Trp, 5-HTP, and, 5-HT (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO).

The protein concentrations are expressed as nmol/ $\mu$ g protein and pmol/ $\mu$ g protein in liver homogenates and nmol/mL for blood determinations.

### Platelet count

Platelets in the blood samples were quantified by a standard clinical procedure using an automated cell counter.

### Statistical analysis

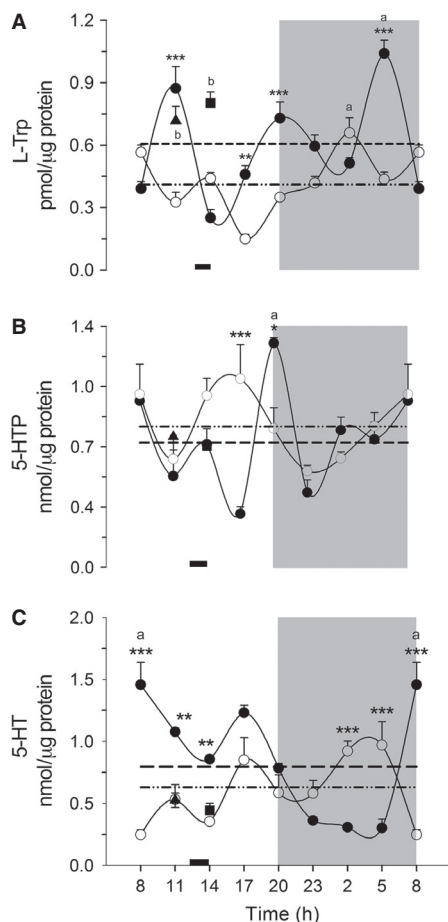
Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM. The statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (v 5.0; San Diego, CA). Normality distribution and equal variances were determined by the Kolmogorov–Smirnov and Levene tests. Different time points were compared using one-way analysis of variance (ANOVA), and groups were compared using a two-way ANOVA test followed in both cases by a post hoc Bonferroni test. All pairwise multiple comparisons were performed by the student's *t*-test. Differences among groups were considered statistically significant at  $P \leq 0.05$ . Rhythm analyses were performed by COSANA software (v 3.1 developed by AA Benedito-Silva, GMDRB, ICB/USP, Sao Paulo, Brazil).

## Results

### Daily variations of liver L-Trp, 5-HTP, and 5-HT in rats under daytime-restricted feeding

The precursor for serotonin is L-Trp. In Figure 1A, it can be seen that hepatic L-Trp in the AL group showed a pattern of three peaks (1100, 2000 and 0500 h) with valleys at 1400 and 0800 h. DRF promoted a drastic change in the rhythmic pattern, showing a clear valley at 1700 h and higher levels of L-Trp during the last part of the dark period. There were significant differences between the two groups at 1100, 1700, 2000, and 0500 h, corresponding to the points of highest concentration in the AL group (two-way ANOVA  $P < 0.05$ ,  $F_{(7, 42)} = 18.33$ ). Another difference associated with the DRF protocol was a significant reduction (~50%) in the average levels of L-Trp in the 24-h period. The cosinor program indicated a 47% adjustment in the AL group





**Figure 1.** Analysis of the daily variation of L-Trp (A), 5-HTP (B) and 5-HT (C) in rat liver measured by HPLC. Each point represents the mean ± SEM. Access to food for the DRF group is represented by the black bar (1200–1400 h). AL (●), DRF (○), Fa (▲), Fa-Re (■), mesor AL (—) DRF (---), (a) one-way ANOVA, post hoc Bonferroni test. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , two-way ANOVA, post hoc Bonferroni test. (b) Student's  $t$ -test  $P < 0.05$ .  $n = 4$ . 5-HTP, 5-hydroxytryptophan; 5-HT, 5-hydroxytryptamine; HPLC, high pressure liquid chromatography; DRF, daytime restricted feeding; ANOVA, analysis of variance.

with a period of 8 h, whereas the DRF group showed an adjustment of 56% with a period of 24 h (Table 2). Control groups of feeding condition (Fa and Fa-Re) showed L-Trp levels more similar to those of AL rats, that is, significantly higher than the corresponding levels in DRF rats, both before food access (~115% at 1100 h) and after feeding (~82% at 1400 h) (Student's  $t$ -test  $P = 0079$  and  $0.0096$ ;  $P < 0.05$ ).

5-HTP is an intermediate in the conversion of L-Trp to 5-HT. Figure 1B displays the daily variations of liver 5-HTP. The group AL showed a pattern with two clear peaks, at 0800 and 2000. The peak at 0800, at the beginning of the light period, is reached by gradual changes that occur over 1800 h (from 2300 to 1700 h); in contrast, the peak at 2000 h, at the beginning of the dark period, is sudden and limited to a single time point. The DRF protocol changed some aspects of the rhythmic pattern of 5-HTP: it also showed two peaks, one at the beginning of the light period (0800 h) and similar to the one shown by AL rats; however, the second peak was observed at 1700 h, different from the AL group. Another difference was that in the case of the DRF rats, the two peaks were shallower, since both showed incremental changes in the 5-HTP levels. As a consequence, the pattern in the AL rats was better adjusted, by the cosinor program, to a 12-h period but with low rhythmicity (~21%), whereas the temporal variations of 5-HT in DRF rats was also adjusted to a 12-h period but with higher rhythmicity (~50%) (Table 2). Significant differences between the two treatments were detected at 1700 and 2000 h, with no significant change in the 24-h average value in either group (two-way ANOVA  $P < 0.05$ ;  $F_{(7, 42)} = 7.232$ ). 5-HT levels were sensitive neither to Fa nor to the subsequent refeeding condition.

Daily variations of liver 5-HT in DRF rats are shown in Figure 1C. The AL group showed a well-defined cycle with minimum 5-HT concentrations during the dark period, and significantly higher levels during the light period (one-way ANOVA  $P < 0.05$ ,  $F_{(7, 24)} = 33.97$ , post hoc

**Table 2.** Chronobiological analysis of liver and blood samples.

	L-Trp liver		5-HTP liver		5-HT liver		Enzymatic activity TPH		MAO-A mRNA		5-HT serum		5-HT plasma		Count of platelets	
	AL	DRF	AL	DRF	AL	DRF	AL	DRF	AL	DRF	AL	DRF	AL	DRF	AL	DRF
Period	8	24	12	12	24	12	24	24	24	24	24	24	24	24	8	24
Amplitude	0.24	0.14	0.19	0.19	0.45	0.21	12	8.87	1.35	0.65	97	92	6	5	317	197
Mesor	0.60	0.41	0.73	0.82	0.80	0.63	22	17.5	4.2	1.3	19	176	13	13.5	1269	1404
% rhythm	47.2	55.7	21	50	58	35	50	75	43	54	85	75	60	44	66	48

L-TRP, L-tryptophan; 5-HTP, 5-hydroxytryptophan; 5-HT, serotonin; TPH, tryptophan hydroxylase; MAO-A, monoamine oxidase isoform A; DRF, daytime restricted feeding.

Bonferroni's test). A clear peak was observed at 0800 h, during the transition from dark to light periods. This pattern was drastically altered by the DRF protocol, since concentrations of 5-HT were lower in the light period and higher during the dark period. Significant differences between the two treatments occurred at 0800, 1100, 1400, 0200, and 0500 h (two-way ANOVA  $P < 0.05$ :  $F_{(7, 24)} = 18$ ; post hoc Bonferroni's test). The 24-h rhythm of the AL group was better fitted to a sinusoidal pattern (~50% with a 24-h period) than the rhythm shown by the DRF group (~36% with a 12-h period) (Table 2). A non-significant tendency for the 24-h-average value to be reduced in the DRF group was observed. Fa and Fa-Re groups showed values more similar to the DRF group.

One important aspect of this analysis is that the concentration of the precursor amino acid was lower than the concentrations of 5-HTP and 5-HT, suggesting that this amino acid is rate-limiting the 5-HT metabolism.

### Daily variations of liver TPH in rats under DRF

Figure 2 depicts the daily profile of biochemical parameters of TPH-1, the rate-limiting enzyme for serotonin synthesis. Figure 2A shows the 24-h variation of the hepatic TPH-1 mRNA. The AL group showed a bimodal pattern with peaks during the light period (at 1400 h) and during the dark period (at 2300 h). The DRF protocol promoted a lack of rhythmicity in the profile for TPH-1 mRNA. It was noteworthy that Fa increased the TPH-1 mRNA significantly; this effect was reversed by the 2-h food access. TPH-2 mRNA did not show amplification in liver samples (data not shown).

Figure 2B shows the daily variations of TPH activity in liver homogenates, as measured by a coupled enzymatic assay. The 24-h profile in the AL group indicated a clear rhythm with a peak at the transition between dark and light periods (0800 h). There was a significant drop during the dark period (one-way ANOVA  $P < 0.05$ ,  $F_{(7, 22)} = 30.69$ , Bonferroni's post hoc test). The profile of the DRF group was similar, with one notable exception: the 0800 h peak was not observed; thus, TPH activity was significantly lower in the rats under DRF. Another significant reduction was detected at 1400 h (two-sample Kolmogorov–Smirnov test,  $P < 0.05$ ). In general, the DRF group also had higher values during the light period (Kruskal–Wallis test = 25.11,  $P = 0.0007$ ,  $P < 0.05$ ). Both groups were adjusted to a 24-h rhythm, with a rhythmicity of 50% for the AL group and 75% for the DRF group (Table 2). Control groups of feeding conditions showed significantly lower values than the AL and DRF groups.

The daily variations of the TPH-1 protein were evaluated in the liver cytosolic fraction by western blot assay

(Fig. 2C). Anti-TPH-1 antibody detected a defined band with the expecting molecular weight (~50 kDa). Similar to the TPH activity, AL rats showed a well-defined rhythm for the amount of liver TPH-1 protein, with an elevation from 0800 to 1100 h, and significantly lower levels at other times (from 1400 to 0500 h). DRF rats did not show a rhythmic pattern for cytosolic TPH-1, and it was present at considerably lower levels than in the AL group during the first part of the light phase (from 0800 to 1400 h) (two-sample Kolmogorov–Smirnov test,  $P < 0.05$ ). The TPH-1 signal in the acute Fa and Fa-Re rats showed levels similar to those for the DRF group, and significantly lower than those for the AL rats. Immunohistochemical staining for the TPH-1 protein in liver showed lower intensity in the DRF than in the AL condition, confirming the results observed in Western-blot assay (WB) and enzymatic activity assays (Fig. 2E and F).

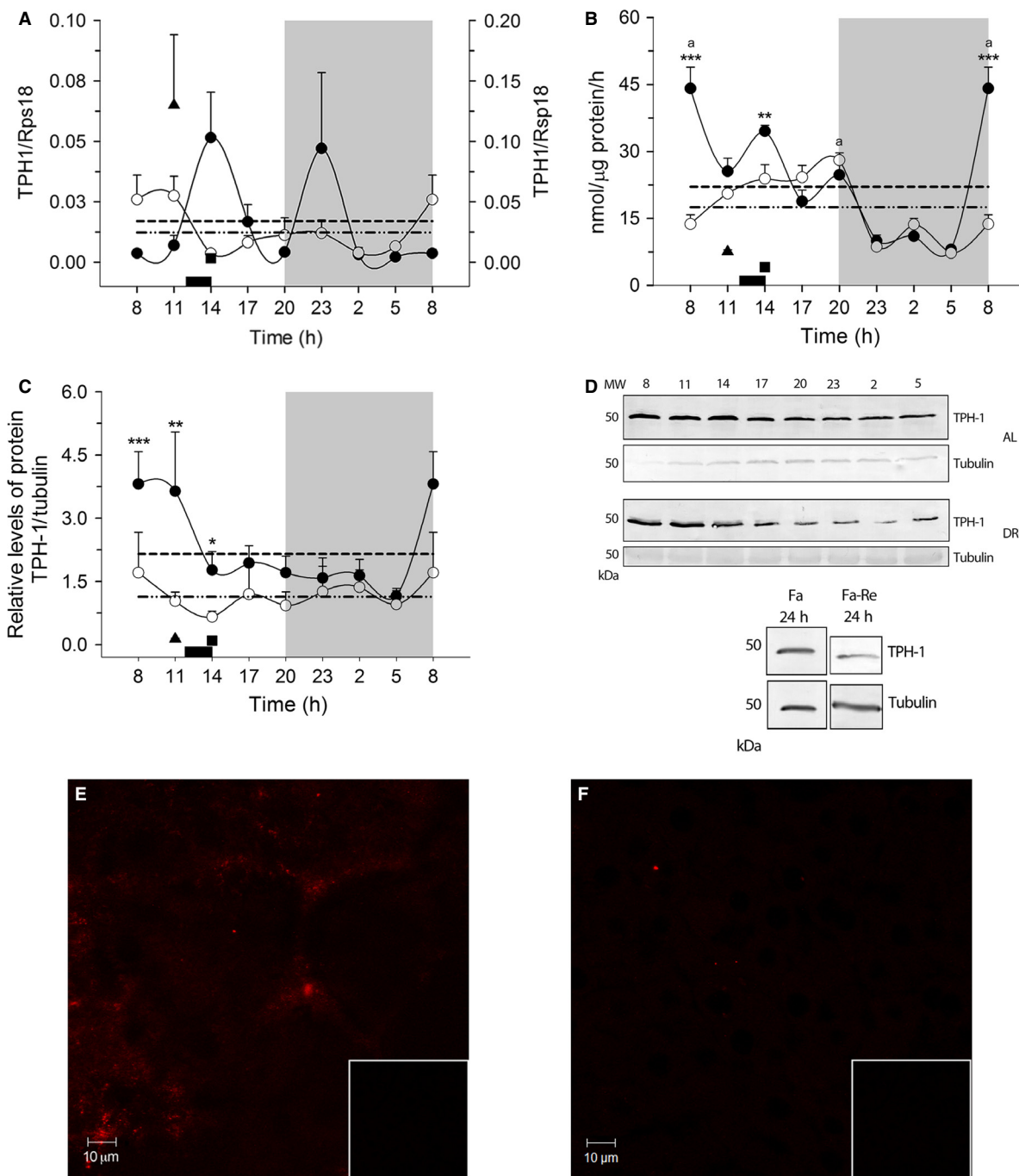
### Daily variations of MAO-A in rats under DRF

Figure 3 shows the 24-h mRNA and protein profiles of the main catabolizing enzyme for serotonin in the liver, mitochondrial MAO-A. The AL rats showed a bimodal rhythm in the expression of MAO-A mRNA (Fig. 3A). Two peaks were detected, one during the light period (at 1400–1700 h) and the second throughout the entire dark period (from 2300 to 0500 h). In contrast, in the DRF group the rhythmicity was lost. No significant differences were detected. In the same way, the mRNA for MAO-A in the control groups of feeding conditions did not show any change, and were similar to the AL and DRF groups.

The daily profile of MAO-A protein assayed by western blot of the liver mitochondrial fraction is shown in Figure 3B. The AL group showed a well-defined rhythm with a peak at 0800 h and a plateau with lower values from 1100 to 0500 h. The pattern in the DRF rats was very different: the relative abundance of MAO-A protein was significantly lower over the entire 24-h period, and a single peak at the beginning of the dark period was detected (2000–2300 h). Both groups were significantly different at 0800, 1400, 0200, and 0500 h (Kolmogorov–Smirnov two-samples  $P < 0.05$ ). Cosinor analysis indicated similar rhythmicity in both groups: 43% in AL rats and 54% in DRF rats. Acute Fa and Fa-Re showed similar levels of MAO-A protein, which were intermediate between the AL and the DRF group (Mann–Whitney test  $P = 0.0379$ ).

### Circulating 5-HT: differences between plasma and serum measurements

Blood samples analyzed for plasma were pre-treated with EDTA. As shown in Figure 4A, the levels of plasma 5-HT were very similar in the AL and DRF rats. Both showed a

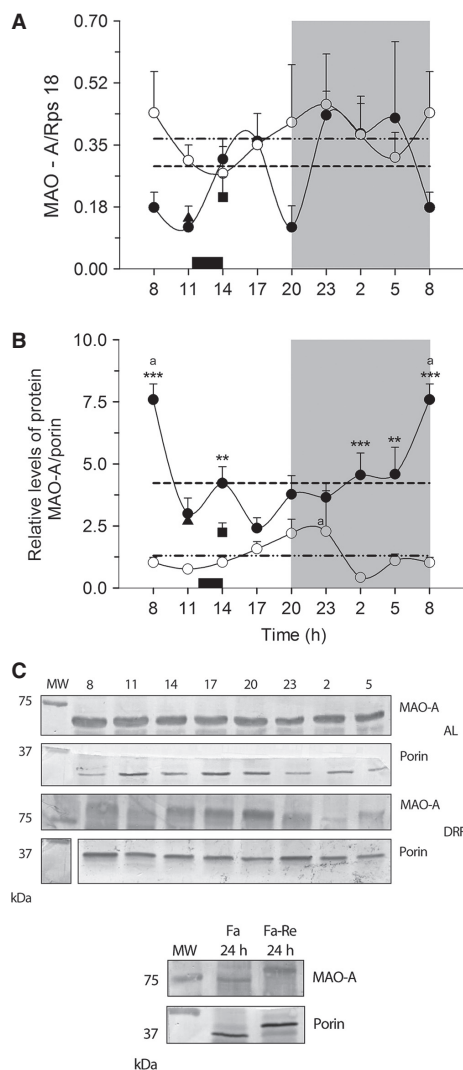


**Figure 2.** Daily variation in TPH mRNA expression (A) scale at right for Fa value, enzymatic activity (B) protein (C and D), and immunohistochemistry (E and F) in liver. Each point represents the mean ± SEM. Access to food for the DRF group is represented by the black bar (1200–1400 h). AL (●), DRF (○), Fa (▲), Fa-Re (■), mesor AL(—) DRF (---), (a) one-way ANOVA, post hoc Bonferroni test and Kruskal–Wallis test. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , two-sample Kolmogorov–Smirnov test. (b) Mann–Whitney  $P < 0.05$ .  $n = 4$ . In E and F, the box at the lower right shows the negative control. TPH, tryptophan hydroxylase; DRF, daytime restricted feeding; ANOVA, analysis of variance.

marked rhythm with higher 5-HT during the light period (one-way ANOVA  $P < 0.0001$ ,  $F_{(7, 23)} = 11.66$  and  $P < 0.0001$ ,  $F_{(7, 22)} = 8.072$ , post hoc Bonferroni ‘s test)

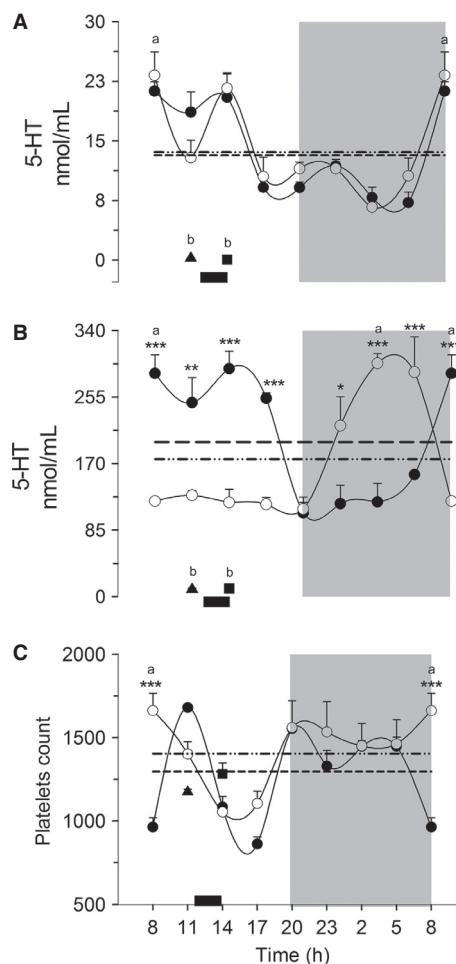
and a rhythmicity of 60% in AL group and 44% in the DRF group (Table 2). In contrast, Fa and Fa-Re showed notably lower values of 5-HT (student’s  $t$ -test  $P = 0.028$ ).





**Figure 3.** MAO-A in the rat liver. (A) Levels of MAO-A mRNA expression and (B) protein in mitochondria (C) Blot representative sample of representative abundance of MAO-A protein in the different conditions. Each point represents the mean  $\pm$  SEM. Access to food for the DRF group is represented by the black bar (1200–1400 h) AL (●), DRF (○), Fa (▲), Fa-Re (■), mesor AL(—) DRF (---), (a) Kruskal–Wallis test.  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ , Kolmogorov–Smirnov two-samples test. (b) Mann–Whitney  $P < 0.05$ .  $n = 4$ . MAO, monoamine oxidase; DRF, daytime restricted feeding.

This profile was strikingly different in serum (Fig. 4B). In the AL group, serum and plasma levels of 5-HT showed similar patterns; in contrast, the DRF protocol promoted an inverse profile with higher values during the dark period and lower values during the light period (one-way ANOVA  $P < 0.05$ ,  $F_{(7, 24)} = 14.56$  and  $F_{(2, 22)} = 11.07$ , Bonferroni's post hoc test). Both groups were significantly different at seven time points (two-way ANOVA



**Figure 4.** Concentration of 5-HT in blood. Plasma (A), serum (B), and number of platelets (C). Each point represents the mean  $\pm$  SEM. Access to food for the DRF group is represented by the black bar (1200–1400 h) AL (●), DRF (○), Fa (▲), Fa-Re (■), mesor AL(—) DRF (---), (a) one-way ANOVA, post hoc Bonferroni test.  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ , two-way ANOVA, post hoc Bonferroni test. (b) Student's  $t$ -test  $P < 0.05$ .  $n = 4$ . 5-HT, 5-hydroxytryptamine; DRF, daytime restricted feeding; ANOVA, analysis of variance.

$P < 0.05$ ,  $F_{(7, 24)} = 21.26$ , Bonferroni's post hoc test). The concentration of 5-HT in serum was 10 times higher than in plasma. Both groups had high rhythmicity based on the cosinor analysis: 85% and 75% for AL and DRF groups, respectively. In the plasma fraction, a marked reduction in the 5-HT values in the control groups of feeding conditions (student's  $t$ -test  $P = 0.028$ ) was also observed.

To determine if the difference between the 5-HT plasma and serum profiles was associated with changes in the platelet count, the daily profile of these cells was evaluated (Fig. 4C). Except for one time point (0800 h, with higher values of 5-HT in the DRF rats), the profile of both

treatments was very similar (one-way ANOVA  $P < 0.05$ ,  $F_{(7, 20)} = 14.60$  and  $F_{(7, 20)} = 4.065$ , post hoc Bonferroni test). The AL group showed a cycle with 66% of rhythmicity (8-h period), whereas the DRF group had ~48% rhythmicity (24-h period) (Table 2). No differences were observed with the control groups of feeding conditions.

## Discussion

This study provides the first data concerning the daily variations in the presence and activity of key elements of serotonin-related metabolites and serotonin-metabolizing enzymes in the rat liver. Most of the parameters studied showed clear fluctuations over the 24-h period in AL conditions. By other hand, these rhythms were significantly damped under the DRF protocol. Besides the rhythmic profile within the liver, 5-HT also showed daily fluctuations in its blood transportation. This parameter was deeply modified by the DRF protocol involving important adaptations in the platelets capacity to handle serotonin.

### Restricted food intake reduced the concentration of liver tryptophan and serotonin

The liver gives feeding cues, participates in digestive process, and is a peripheral integrator of the nutrient availability of the organism (Langhans 1996). L-Trp needs to be supplied within the diet (Cansev and Wurtman 2007). L-Trp is also a crossroad metabolite: in the liver, it can be incorporated into proteins, be transformed in the kynurenine pathway, responsible for almost 90% of tryptophan catabolism (Sainio *et al.* 1996), and act as the precursor for the synthesis of 5-HT. More recently, it was reported that L-Trp acts as precursor of 5-methoxyindole metabolites that control cyclooxygenase expression, inflammation, and tumorigenesis (Wu *et al.* 2014). Figure 1 shows that the hepatic levels of L-Trp were ~1000-fold lower than those of 5-HTP and 5-HT. Low levels of liver L-Trp are suggestive that the compartmentalization and availability of this amino acid could be a regulatory factor, in addition to the activity of its metabolizing enzymes. At some time points, DRF promoted a marked reduction in L-Trp and 5-HT that was not observed in 5-HTP.

Physiological roles of 5-HTP in the brain have not been reported, but in the gut, it contributes to the development of intestinal microvilli (Nakamura *et al.* 2008). In addition, some antioxidant properties have been associated with 5-HTP. It is evident that DRF induces a new steady state in the liver L-Trp – 5-HT system as shown by the cellular uptake and exit events, as well as the enzymatic transformation within the hepatocytes. The new

metabolic status of L-Trp and 5-HT in the liver under the DRF protocol can also be deduced from the different response that these metabolites showed in the control groups of feeding conditions: whereas the L-Trp levels after the Fa and Fa-Re were similar to the AL rats, the levels of 5-HT in these two groups resembled those of the rats under DRF (Fig. 1).

### DRF is associated with reduced protein and activity of liver TPH-1

In normal circumstances, the concentration of L-Trp is considerably lower than the  $K_m$  of TPH; hence, the enzyme is never saturated with the substrate (Tyce 1990). The isoform present in the liver is exclusively type 1; TPH-2 was not found by PCR experiments (Fig. 2A, Table 1). Although TPH-1 can be regulated by phosphorylation (Huang *et al.* 2008), our results showed parallelism between the amount of the protein and its activity in AL and DRF groups (Fig. 2B and C). Thus, the data suggest that the daily variation of TPH-1 activity in the AL group and the reduced activity observed in the first half of the light period in the DRF group reflect the amount of TPH-1 protein. However, the levels of TPH-1 do not seem to correlate with transcriptional activity since the corresponding mRNA did not show these same patterns (Fig. 2A). Therefore, the variations of TPH-1 must be related to post-transcriptional regulatory events, such as changes of the enzyme stability or degradation (Huang *et al.* 2008).

### Circulating serotonin: role played by the platelets

A remarkable finding of this study was the change in the daily levels of blood 5-HT promoted by the DRF protocol (Fig. 4A and B). Whereas the daily pattern of free 5-HT in plasma samples (outside of platelets) in AL and DRF groups was similar (Fig. 4A), an anti-phase rhythm was observed in the DRF group when the 5-HT content within the platelets was quantified (Fig. 4B). Indeed, the levels of 5-HT in serum were much higher than those measured in plasma. The daily pattern of serum 5-HT in our AL group was similar to that reported by Sanchez *et al.* (2008). Since the amount of platelets was similar in control and experimental conditions (Fig. 4C), the mechanism underlying the modification in 5-HT rhythmicity in the DRF group must involve a profound change in 5-HT uptake and release by the platelets. Regarding this point, it has been reported that 5-HT transporter in the platelet's plasma membrane is the principal control point from 5-HT uptake from the blood plasma (Mercado and Kilic

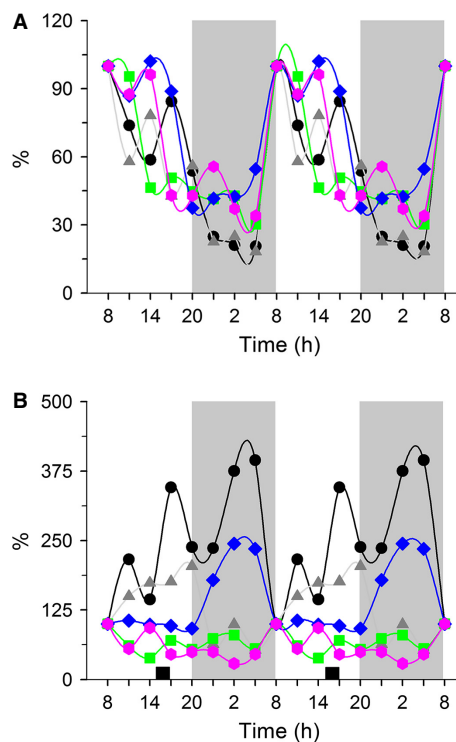
2010). This point is not further addressed in this study, but it is highly probable that molecular events related to the transfer of 5-HT from ECs to platelets, as well as the systemic release of 5-HT from the platelets to other tissues is influenced by the metabolic and physiological adaptations associated with the DRF protocol/expression of the FEO.

### 5-HT is synthesized within the liver

The presence of TPH-1 mRNA and the corresponding protein and enzymatic activity indicate that hepatic tissue has the capacity to generate 5-HT locally. The expression of TPH-1 mRNA in fasting liver was higher than in the group with food restriction. This fact was not reflected in the amount of the protein, suggesting changes in the mRNA translation or in protein stability. It has been reported that in brain, phosphorylation of TPH-1 can increase its stability (Nexon et al. 2011). Data from our laboratory show a coincidence between the temporal pattern of circulating glucocorticoids and TPH-1 expression during the DRF protocol, suggesting a potential control of TPH-1 synthesis in the liver by corticosterone (Luna-Moreno et al. 2012). The lower value of TPH activity in the DRF group also coincided with a lower amount of the enzyme protein, suggesting that the effect associated with the DRF protocol is mainly to stabilize the TPH-1 protein. Another important aspect for the enzymatic activity is the substrate. The concentration of L-Trp depends on the ingested food, which is 30% lower in the DRF group than in the AL animals. TPH activity also depends on BH<sub>4</sub>, which acts as co-substrate; however, the mechanism for maintaining the cytosolic level of BH<sub>4</sub> is not well understood (Nakamura and Hasegawa 2009).

In the liver, the expression of MAO-A mRNA in the DRF group is higher than in the AL group (Fig. 3A). Some evidence has shown that steroid and non-steroid hormones are involved in up-regulate MAO gene expression, such as androgen and glucocorticoid in neuronal cell models (Shih et al. 2011); hence, DRF could promote an elevation of MAO-A transcription by increasing the glucocorticoid-associated signaling (Shih et al. 2011; Luna-Moreno et al. 2012). Interestingly, the DRF protocol significantly reduced the amount of mitochondrial monoamine oxidase isoform A (MOA-A) protein, as detected in western-blot experiments. This result again indicates a differential effect of DRF/FEO expression on the transcriptional activity and the stability of the mature protein.

Therefore, our results indicate that the liver is able to transform L-Trp to 5-HT, an action that is under circadian regulation. Besides, this rhythmic pattern is influenced by the DRF protocol and potentially by the FEO expression. It has been reported that hepatic tissue also



**Figure 5.** Parameters of serotonin metabolism and transportation. (A) AL and (B) DRF group. Each point represents the average percentage of the value at the first time point, for each parameter analyzed. (●) 5-HT in liver, (▲) Enzymatic activity of TPH-1, (■) Relative level of TPH-1 protein, as well as (◆) 5-HT in serum and (●) 5-HT in plasma. DRF, daytime restricted feeding; 5-HT, 5-hydroxytryptamine; TPH, tryptophan hydroxylase.

has the ability to synthesize melatonin (Sanchez-Hidalgo et al. 2009), a signaling factor derived from 5-HT.

To make evident the coordinated rhythms of 5-HT in liver, serum and plasma as well as the levels and activity of TPH-1, a graphic was made with all the points normalized at values corresponding at 0800 h (the peaks or acrophases of each parameter) (Fig. 5). The high synchronization of the five temporal profiles with a peak at 0800 h and higher values during the light period. Remarkably, the coordination of these 24 h-rhythms is lost by the DRF protocol. It remains to be determined if this disruption is or not associated to the expression of the FEO as well as to a possible modification in the liver physiology.

### 5-HT in the liver and food circadian synchronization

Organisms have developed mechanisms for survival under the adverse conditions of changing environments; these adaptations are manifested via circadian fluctuations

(~24-h) in the concentration and activity of a number of metabolites and signaling molecules (Kirsz and Zieba 2012). It is well-documented that the liver and other peripheral organs act as circadian oscillators in coordination with the master circadian pacemaker, the hypothalamic SCN (Damiola et al. 2000). Synchronization of the peripheral circadian oscillators is also sensitive to nonphotic stimuli such as changes in food availability and temperature (Yoo et al. 2004). The protocol used in this study, feeding restricted to daytime hours, is widely accepted to promote the expression of the FEO (Mistlberger 1994, 2009; Damiola et al. 2000). Liver is one of the organs whose metabolic performance is modified more rapidly in response to the DRF protocol/FEO expression (Diaz-Muñoz et al. 2000; Baez-Ruiz et al. 2005; Vollmers et al. 2009).

Previous reports had shown that 5-HT and melatonin had clear 24-h rhythmicity in the pineal gland (Huang et al. 2008). However, this study is the first to explore the daily rhythm of 5-HT, its related metabolites and metabolizing enzymes, as well as its blood transportation (within and outside of platelets). In addition, it was clearly shown that the DRF protocol and the concomitant FEO expression affected the rhythmic variation of these parameters. From the perspective of biological rhythms, our data make two main contributions:

- 1 A coordinated variation of several parameters related to 5-HT metabolism and transportation was detected in AL conditions. Most of them were highly rhythmic over a 24-h period (Table 2). Indeed, low levels of liver metabolites, enzymatic activities, and circulating 5-HT were observed during the dark period followed by an evident peak at 0800 h, at the beginning of the light period (Fig. 5A).
- 2 The coordinated pattern of 5-HT-related parameters was disrupted by the DRF (Fig. 5B), suggesting a possible adaptation by the liver metabolism and blood transportation of 5-HT promoted by FEO expression. As the peak at 0800 h observed in the AL group was absent, most of the parameters studied showed lower values in the DRF group, especially during the light period.

Our data show that 5-HT is generated within the liver, and its production is controlled over the 24-h period. This data could have implications in the capacity of hepatic tissue to be regenerated since 5-HT has been shown to facilitate the recovery of the hepatic tissue after surgical hepatectomy (Papadimas et al. 2006). In addition, the DRF condition significantly modifies the way in which 5-HT is produced in the liver as well as how it is transported within the circulating platelets. It is very probable that these adaptations in 5-HT metabolism and handling could be associated with the physiology of the

FEO, but additional experiments are needed to support this notion. In a more general perspective, the daily control of 5-HT synthesis in the liver and blood transport opens the possibility of temporal regulation of 5-HT in other peripheral functions such as gut motility and immune modulation, bone differentiation/proliferation, and mammary gland and pancreas cell homeostasis (Amireault et al. 2013).

## Acknowledgments

The project was supported by grants IN-202412 from PAPIIT, UNAM and 12-511 from CONACyT. We thank Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado PAEP-UNAM, for support. We thank Dorothy Pless for critically editing the manuscript, Olivia Vázquez-Martínez, Raúl Calderón Aguilera, E. Nydia Hernández Ríos, Lic. Lourdes Lara Ayala, Sandra Hernández García, Fernando López-Barrera and MVZ Martín García for their technical assistant.

## Conflict of Interest

All authors declare no conflict of interest regarding any of the material discussed in the manuscript.

## References

- Aguilar-Roblero, R., and M. Díaz-Muñoz. 2009. Chronostatic adaptations in the liver to restricted feeding: the FEO as an emergent oscillator. *Sleep Biol. Rhythms* 8:9–17.
- Amireault, P., D. Sibon, and F. Cote. 2013. Life without peripheral serotonin: insights from tryptophan hydroxylase 1 knockout mice reveal the existence of paracrine/autocrine serotonergic networks. *ACS Chem. Neurosci.* 4:64–71.
- Bach, A. W., N. C. Lan, D. L. Johnson, C. W. Abell, M. E. Bembenek, S. W. Kwan, et al. 1988. cDNA cloning of human liver monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85:4934–4938.
- Baez-Ruiz, A., C. Escobar, R. Aguilar-Roblero, O. Vazquez-Martinez, and M. Diaz-Munoz. 2005. Metabolic adaptations of liver mitochondria during restricted feeding schedules. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 289:G1015–G1023.
- Barbosa, R., J. H. Scialfa, I. M. Terra, J. Cipolla-Neto, V. Simonneaux, and S. C. Afeche. 2008. Tryptophan hydroxylase is modulated by L-type calcium channels in the rat pineal gland. *Life Sci.* 82:529–535.
- Berger, M., J. A. Gray, and B. L. Roth. 2009. The expanded biology of serotonin. *Annu. Rev. Med.* 60:355–366.
- Bertrand, P. P., and R. L. Bertrand. 2010. Serotonin release and uptake in the gastrointestinal tract. *Auton. Neurosci.* 153:47–57.



- Cansev, M., and R. J. Wurtman. 2007. Aromatic amino acids in the brain. Pp. 59–97 in A. Lajtha, S. S. Oja, A. Schousboe, and P. Saransaari, eds. *Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology. Amino acids and peptides in the nervous system*. 3rd ed. Springer, New York, NY.
- Challet, E. 2007. Minireview: entrainment of the suprachiasmatic clockwork in diurnal and nocturnal mammals. *Endocrinology* 148:5648–5655.
- Damiola, F., N. Le Minh, N. Preitner, B. Kornmann, F. Fleury-Olela, and U. Schibler. 2000. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* 14:2950–2961.
- Diaz-Muñoz, M., O. Vazquez-Martinez, R. Aguilar-Roblero, and C. Escobar. 2000. Anticipatory changes in liver metabolism and entrainment of insulin, glucagon, and corticosterone in food-restricted rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279:R2048–R2056.
- Huang, Z., T. Liu, A. Chatteraj, S. Ahmed, M. M. Wang, J. Deng, et al. 2008. Posttranslational regulation of TPH1 is responsible for the nightly surge of 5-HT output in the rat pineal gland. *J. Pineal Res.* 45:506–514.
- Kawasaki, T., S. Murata, K. Takahashi, R. Nozaki, Y. Ohshiro, N. Ikeda, et al. 2010. Activation of human liver sinusoidal endothelial cell by human platelets induces hepatocyte proliferation. *J. Hepatol.* 53:648–654.
- Kirsch, K., and D. A. Zieba. 2012. A review on the effect of the photoperiod and melatonin on interactions between ghrelin and serotonin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 179:248–253.
- Langhans, W. 1996. Role of the liver in the metabolic control of eating: what we know—and what we do not know. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 20:145–153.
- Lesurtel, M., C. Soll, R. Graf, and P. A. Clavien. 2008. Role of serotonin in the hepato-gastrointestinal tract: an old molecule for new perspectives. *Cell. Mol. Life Sci.* 65:940–952.
- Luna-Moreno, D., B. Garcia-Ayala, and M. Diaz-Munoz. 2012. Daytime restricted feeding modifies 24 h rhythmicity and subcellular distribution of liver glucocorticoid receptor and the urea cycle in rat liver. *Br. J. Nutr.* 108:2002–2013.
- Mawe, G. M., and J. M. Hoffman. 2013. Serotonin signalling in the gut—functions, dysfunctions and therapeutic targets. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10:473–486.
- Mendoza, J. 2007. Circadian clocks: setting time by food. *J. Neuroendocrinol.* 19:127–137.
- Mercado, C. P., and F. Kilic. 2010. Molecular mechanisms of SERT in platelets: regulation of plasma serotonin levels. *Mol. Interv.* 10:231–241.
- Mistlberger, R. E. 1994. Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 18:171–195.
- Mistlberger, R. E. 2009. Food-anticipatory circadian rhythms: concepts and methods. *Eur. J. Neurosci.* 30:1718–1729.
- Nakamura, K., and H. Hasegawa. 2009. Production and peripheral roles of 5-HTP, a precursor of serotonin. *Int. J. Tryptophan Res.* 2:37–43.
- Nakamura, K., T. Sato, A. Ohashi, H. Tsurui, and H. Hasegawa. 2008. Role of a serotonin precursor in development of gut microvilli. *Am. J. Pathol.* 172:333–344.
- Nexon, L., D. Sage, P. Pevet, and S. Raison. 2011. Glucocorticoid-mediated nycthemeral and photoperiodic regulation of tph2 expression. *Eur. J. Neurosci.* 33:1308–1317.
- Ni, W., T. J. Geddes, J. R. Priestley, T. Szasz, D. M. Kuhn, and S. W. Watts. 2008. The existence of a local 5-hydroxytryptaminergic system in peripheral arteries. *Br. J. Pharmacol.* 154:663–674.
- Papadimas, G. K., K. N. Tzirogiannis, G. I. Panoutsopoulos, M. D. Demonakou, S. D. Skaltsas, R. I. Hereti, et al. 2006. Effect of serotonin receptor 2 blockage on liver regeneration after partial hepatectomy in the rat liver. *Liver Int.* 26:352–361.
- Portaluppi, F., M. H. Smolensky, and Y. Touitou. 2010. Ethics and methods for biological rhythm research on animals and human beings. *Chronobiol. Int.* 27:1911–1929.
- Ruddell, R. G., D. A. Mann, and G. A. Ramm. 2008. The function of serotonin within the liver. *J. Hepatol.* 48:666–675.
- Sainio, E. L., K. Pulkki, and S. N. Young. 1996. L-tryptophan: biochemical, nutritional and pharmacological aspects. *Amino Acids* 10:21–47.
- Sakowski, S. A., T. J. Geddes, D. M. Thomas, E. Levi, J. S. Hatfield, and D. M. Kuhn. 2006. Differential tissue distribution of tryptophan hydroxylase isoforms 1 and 2 as revealed with monospecific antibodies. *Brain Res.* 1085:11–18.
- Sanchez, S., C. Sanchez, S. D. Paredes, J. Cubero, A. B. Rodriguez, and C. Barriga. 2008. Circadian variations of serotonin in plasma and different brain regions of rats. *Mol. Cell. Biochem.* 317:105–111.
- Sanchez-Hidalgo, M., C. A. De La Lastra, M. P. Carrascosa-Salmoral, M. C. Naranjo, A. Gomez-Corvera, B. Caballero, et al. 2009. Age-related changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues. *Exp. Gerontol.* 44:328–334.
- Shih, J. C., J. B. Wu, and K. Chen. 2011. Transcriptional regulation and multiple functions of MAO genes. *J. Neural. Transm.* 118:979–986.
- Stephan, F. K. 2002. The “other” circadian system: food as a Zeitgeber. *J. Biol. Rhythms* 17:284–292.
- Tyce, G. M. 1990. Origin and metabolism of serotonin. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 16(Suppl. 3):S1–S7.
- Vollmers, C., S. Gill, L. Ditacchio, S. R. Pulivarthy, H. D. Le, and S. Panda. 2009. Time of feeding and the intrinsic circadian clock drive rhythms in hepatic gene expression. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106:21453–21458.

- Walther, D. J., J. U. Peter, S. Bashammakh, H. Hortnagl, M. Voits, H. Fink, et al. 2003. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science* 299:76.
- Wu, K. K., H. H. Cheng, and T. C. Chang. 2014. 5-methoxyindole metabolites of L-tryptophan: control of COX-2 expression, inflammation and tumorigenesis. *J. Biomed. Sci.* 21:17.
- Yoo, S.-H., S. Yamazaki, P. L. Lowrey, K. Shimomura, C. H. Ko, E. D. Buhr, et al. 2004. PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101:5339–5346.

## 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 Dáz-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]

**ABSTRACT:** Experimental findings and clinical observations have strengthened the association between physio-pathologic aspects of several diseases, as well as aging process, with the occurrence and control of circadian rhythms. The circadian system is composed by a principal pacemaker in the suprachiasmatic nucleus (SCN) which is in coordination with a number of peripheral circadian oscillators. Many pathological entities such as metabolic syndrome, cancer and cardiovascular events are strongly connected with a disruptive condition of the circadian cycle. Inadequate circadian physiology can be elicited by genetic defects (mutations in clock genes or circadian control genes) or physiological deficiencies (desynchronization between SCN and peripheral oscillators). In this review, we focus on the most recent experimental findings regarding molecular defects in the molecular circadian clock and the altered coordination in the circadian system that are related with clinical conditions such as metabolic diseases, cancer predisposition and physiological deficiencies associated to jet-lag and shiftwork schedules. Implications in the aging process will be also reviewed.

**Key words:** molecular clock, circadian physiology, peripheral oscillator, uncoupling, jet-lag, metabolic diseases

An appropriate physiological performance involves the integration of metabolic networks that can measure and adapt to the progression of time. The functional unit formed in this way constitutes a timing system with the ability to anticipate environmental fluctuations, allowing physiological activities to adjust in a timely manner to endogenous and ecological demands. Biological rhythmicity is pervasive in all types of cells and organisms. Depending on the period of oscillation, the rhythms are classified as ultradian (less than 24 h, e.g., ionic fluxes in membranes), infradian (more than 24 h, e.g., tidal and annual events), and circadian (approximately 24 h) [1]. The best characterized rhythms and the ones that will be discussed in this review are the circadian rhythms.

Circadian rhythms are endogenous fluctuations that are commanded by a pacemaker entity which is synchronized by environmental cues to allow daily fluctuations in biochemical, physiological, and behavioral

activities. Although circadian rhythmicity is present in all phyla, the different molecular mechanisms are used to measure time in blue-green cyanobacteria, sordariomycetes such as *Neurospora crassa*, invertebrates such as *Drosophila melanogaster*, and mammals [2]. In particular, the timing system in mammals is formed by a set of coordinated peripheral oscillators under the control of one principal pacemaker located in the ventral hypothalamus and known as the suprachiasmatic nucleus (SCN). The SCN is formed by approximately 15,000 neurons and a high proportion of glial cells. It is entrained by photic stimuli of the daily light-dark cycle. However, other synchronizers different from light (non-photoc) can also entrain the circadian timing system. Among these synchronizers are the feeding time, access to exercise devices, and social interactions.

The underlying cellular mechanism used by the timing system to estimate the intervals of ~24 h is called the molecular clock. In each cell with the ability to

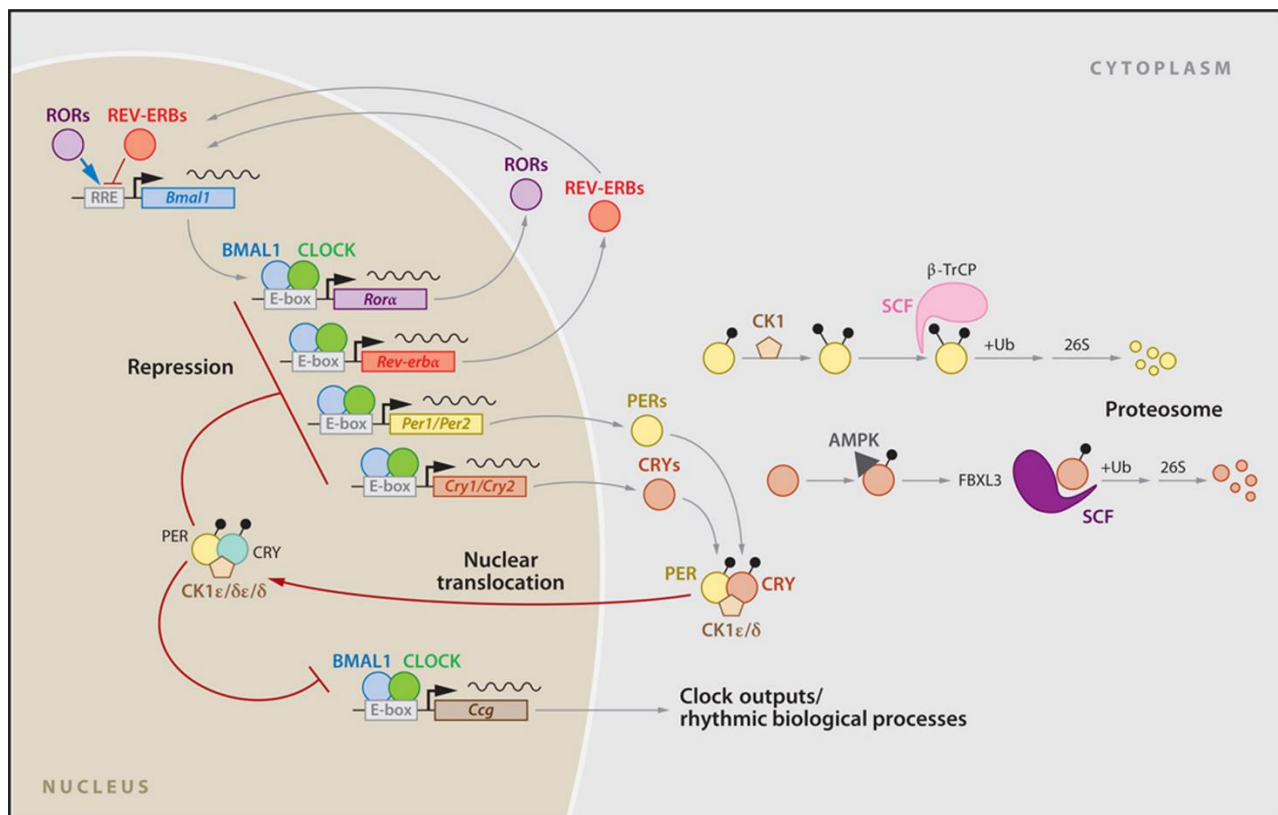
\*Correspondence should be addressed to: Dr. Mauricio Dáz-Muñoz, Departamento de Neurobiología Celular & Molecular, Campus UNAM-Juriquilla, Querétaro 76230, QRO, MÉXICO. Email: [rigel8@yahoo.com](mailto:rigel8@yahoo.com)

compute the passing of time, this complex is formed by a set of interconnected loops of transcriptional and translational activities, and will be reviewed in more detail in a subsequent section of this review.

Harmonious communication between the SCN and the rest of the peripheral oscillators is necessary to assure healthy physiology. This interconnection is accomplished by bidirectional signals of a neural and humoral nature, and it underlies what is called a “coupled state” [3]. Indeed, as discussed below, uncoupling between the principal and the secondary circadian oscillators is frequently the source of pathologies that range from the jet-lag symptoms associated with trans-meridian trips to the biochemical alterations accompanying obesity, diabetes, and the metabolic syndrome.

It is well documented that circadian rhythms become functional during ontogeny, and clock-genes reach diurnal rhythmicity during different post-embryonic developmental periods [4]. At the same time, circadian physiology becomes disturbed during aging. For example, it has been reported that old organisms show changes in their circadian rhythms such as reduction in amplitude, earlier presentation of the phase, shortening of the natural free-running period (*tau*), and an impaired ability to adapt to abrupt phase shifts (jet travel or night work). This topic will be also treated in this review.

This review highlights advances in understanding the molecular and physiological coupling between circadian and metabolic networks, and its relevance to pathological processes and aging.



**Figure 1. Molecular mechanism of the circadian clock in mammals.** Different feedback loops induces both the transcription and the repression of the clock genes. Positive feedback loop is integrated by CLOCK and BMAL1, while the negative feedback loop is integrated by PER1/PER2 and CRY1/CRY2. Regulation of the clock proteins is given by post-translational mechanisms as phosphorylation by the kinases casein kinase 1  $\epsilon/\delta$  (CK1  $\epsilon/\delta$ ), Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase (AMPK) and by SCF (Skp1-Cullin-F-box protein) E3 ubiquitin ligase complexes involving  $\beta$ -TrCP and FBXL3. Ub (ubiquitination), 26S (26S proteasome complex), RRE (retinoic response element), RORs (retinoic orphan receptors), Ccg (clock controlled genes). Taken from [8].

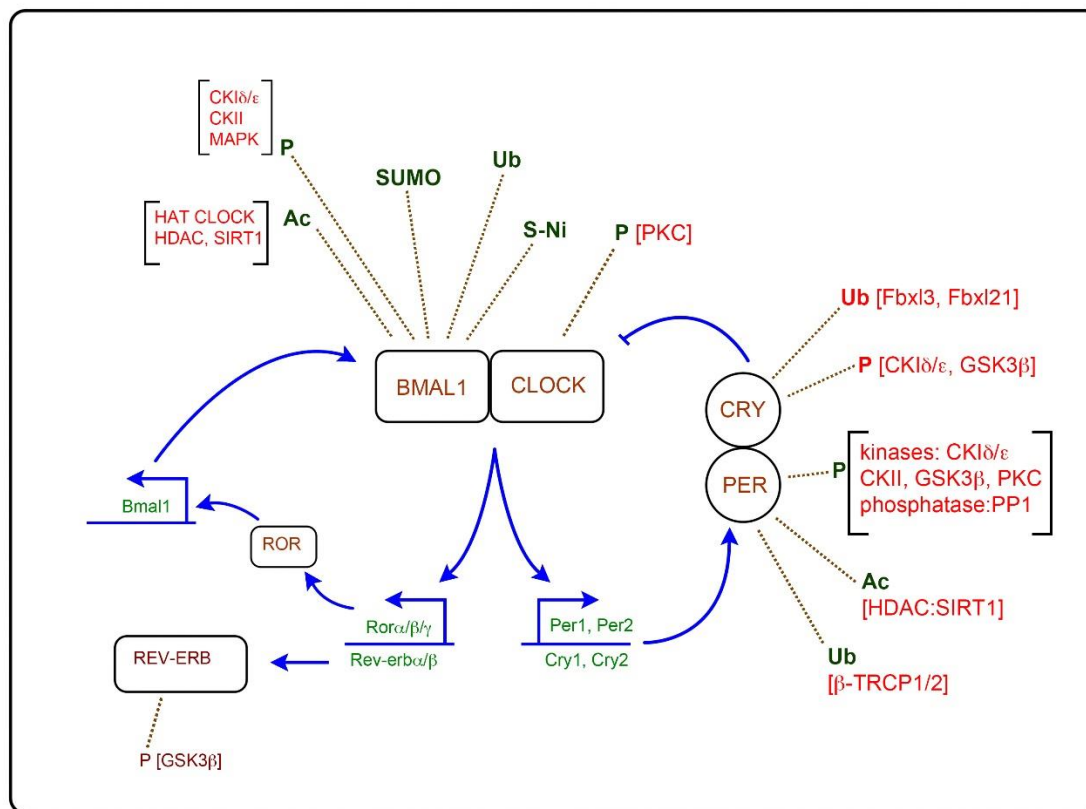


## Molecular clock

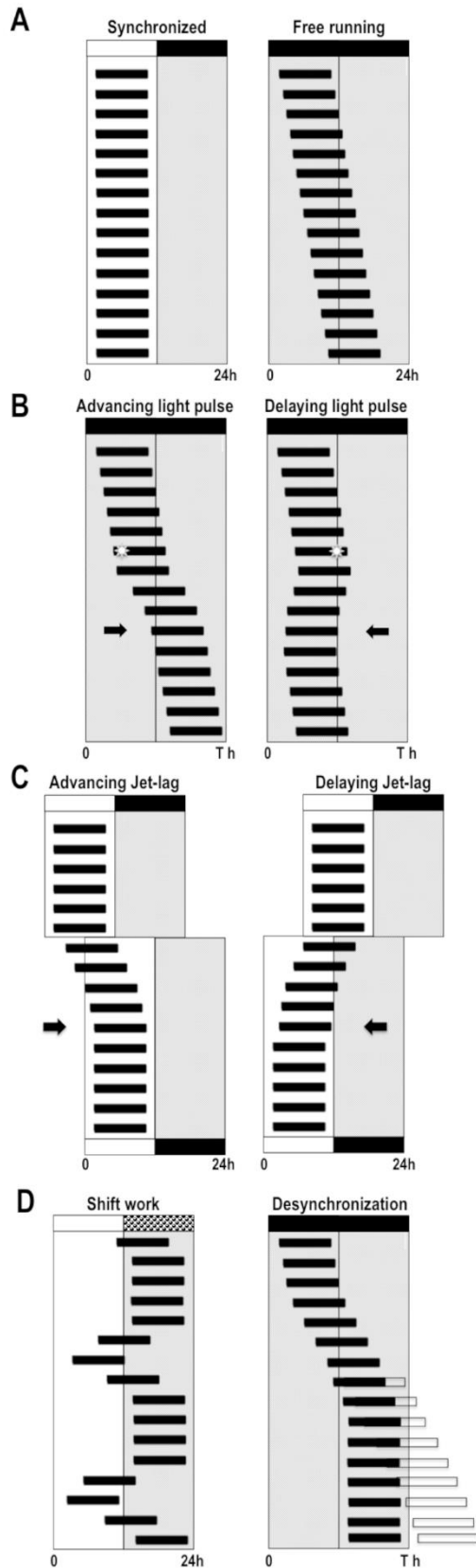
### Function

Biological rhythms represent a basic feature of life, occurring as periodic oscillations at different levels of organization from genes to systems. As a consequence, most physiological and biochemical functions are periodic. This periodicity is given by the rotational movement of the Earth approximately every 24 h, resulting in the day/night cycle. For that reason, these rhythms are denominated circadian (from the Latin *circa*, meaning "around" or "approximately", and *diem* or *dies*, meaning "day"). Circadian physiology establishes an internal temporal order to optimize biological functions during specific phases of the day. For example, in diurnal animals the day is considered the activity phase and the animal's physiology is mainly catabolic to obtain energy, while at night it is largely anabolic. In mammals, the

circadian timing is established by a clock located in the hypothalamic SCN which, by means of humoral and neural signals, synchronizes the rhythmicity of the subordinated oscillators throughout the organism. These peripheral oscillators regulate local physiological and behavioral rhythms, which are reflected – for example - in defined times of hormone secretion during the day. A set of specialized genes, known as clock genes, is the substrate of the molecular mechanisms of the circadian clock [5] (Figure 1). Clock genes exert their function across a network of interacting transcriptional-translational feedback loops that are phylogenetically conserved from microorganisms to vertebrates [6]. Therefore, the timing system seems to be constituted by a hierarchical, multi-oscillatory entity that confers precise phase control and stability on the daily activities of each cell, tissue, and organ [7].



**Figure 2. Post-translational regulation of clock proteins.** Fine-tuning regulation of clock proteins is involved by a variety of post-translational modifications as phosphorylation (P), ubiquitination (Ub), acetylation (Ac), SUMOylation (SUMO) and S-nitrosylation (S-Ni). GSK3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3  $\beta$ ),  $\beta$ -TRCP1/2 ( $\beta$ -transducin repeat containing protein 1/2), HDAC (histone deacetylases), HAT (histone acetyltransferases), SIRT1 (sirtuin 1), CK1 $\delta/\epsilon$  (casein kinase 1 $\delta/\epsilon$ ), CKII (casein kinase II), PKC (protein kinase C), PP1 (protein phosphatase I), MAPK (mitogen activated protein kinase), Fbxl (F-box and leucine-rich repeat protein). Taken from [11].



**Figure 3. Schematic actograms of a behavioral rhythm in a diurnal organism under different lighting conditions, and their effects in the expression of the locomotor activity rhythm.** The black blocks represent the bouts of locomotor activity; the clear and the shaded areas represent the light or dark conditions, respectively. Actograms representing a synchronized rhythm (A, left panel) under a 12 h light and 12 h dark (L:D) cycle and under constant dark condition (A, right panel), situation in which the endogenous circadian period is evident. The administration of light pulses at early and late subjective night, produce phase delays and advances of the activity rhythm, respectively (B). Typically, the phase advances require several cycles of transients before reaching the new steady state. Abrupt changes in the phase of the L:D cycle or social timing cues, produce a transitory desynchronization of the activity rhythm, as occurs in the jet lag or the shift work, requiring several cycles to acquire the new steady state (C and D). Under particular conditions, as continuous advancing jet-lag situation, produce a disassociation of the behavioral rhythm in two components one entrained to the L:D cycle and the second in relative coordination (D, right panel).

## Components

The core of the molecular clock consists of a set of “clock genes” that are grouped in 3 different feedback loops (Figure 1): 1) a positive feedback loop composed of the constitutive gene *clock* and the gene *baml1* whose translational products heterodimerize in the cell nucleus and can then recognize specialized promoter regions known as the E-box of other clock genes such as *per1*, *per2*, *cry1*, *cry2*, *rev-erba*, and *rora*, facilitating their transcription (most of the genes under circadian regulation contain promoters with E-boxes); 2) a negative feedback loop formed by *per1/per2* and *cry1/cry2*, whose corresponding proteins form an heterodimer upon a phosphorylation by casein kinase 1 epsilon/delta (CK1 $\epsilon/\delta$ ). The heterodimer enters the nucleus to inhibit its own transcription, as well as transcription of the other clock genes; 3) an accessory feedback loop of proteins encoded by *rev-erba* and *rora*, which enter nucleus where they act on the retinoic response elements (RRE), either as a transcriptional inhibitor (REV-ERB $\alpha$ ) or activator (ROR $\alpha$ ) of BMAL1 transcription [8].

Expression of clock proteins from the positive loop is in antiphase in relation to that of proteins from the negative loop. All of them are subject to fine regulatory processes, individually and as a group. In the end, a coordinated, harmonic function emerges to ensure the correct function of the circadian physiology.

## Regulation

Clock proteins are transcription factors with a limited half-life that allows their daily oscillation. Their syntheses is the result of transcriptional and translational activities, whereas their degradation is performed by the proteasomal machinery. Besides the temporal aspect, clock proteins also have distinct spatial distributions and their transit into and exit from the nuclear compartment are important features.

Clock proteins are regulated at different levels to orchestrate the processes of dimerization, nuclear import/export, activity, covalent modifications, and proteolytic degradation. Two sets of modulatory processes are particularly important for the proper function of the clock proteins: post-transcriptional modifications (PTMs) and epigenetic events.

PTMs confer complexity and fine-tune the metabolic control of the molecular circadian clock, allowing precise regulation of the whole physiological processes. In this context, the subcellular localization and stability of clock proteins depend on PTMs, primarily phosphorylation, acetylation, ubiquitination, sumoylation and s-nitrosylation (Figure 2). For example, depending on the extent of phosphorylation by CK1  $\epsilon/\delta$ , PER proteins can

be ubiquitinated and degraded by the proteasome [9; 10], or they can be subjected to subcellular relocation [9] between the nuclear and the cytoplasmic compartments. Another kinase involved in the clock machinery is the glycogen synthase kinase-3 (GSK-3), which can phosphorylate PERs and CRYs [11], promoting their entry into the nucleus, and their retention in that organelle.

Epigenetic events related to the control of the molecular clock are diverse. Ten years ago, it was shown that chromatin remodeling is crucial in regulating the expression of the major clock components, as well as in regulating the clock-controlled genes (ccgs) [12]. Genes encoding circadian clock proteins are regulated by epigenetic mechanisms, such as histone phosphorylation, acetylation, and methylation, which have been shown to follow circadian rhythmicity [13]. For example, light pulses are able to modify chromatin remodeling by promoting a rapid phosphorylation on serine 10 of histone 3 (H3-S10) in the SCN [14], and subsequent observations indicated that histone modifications at ccg promoters occur in a circadian manner [15]. Interestingly, it was reported that CLOCK has an intrinsic histone acetyltransferase activity (HAT), reinforcing the idea of a link between the molecular circadian clock and epigenetic control [16]. CLOCK can acetylate non-histone proteins as well as its partner BMAL1 and the glucocorticoid receptor [17, 18], supporting the notion that CLOCK is involved in establishing functional connections to a variety of metabolic pathways that impact the cell cycle and metabolic pathways [19].

## Desynchronization of the circadian system

A remarkable feature of circadian oscillators is their ability to be entrained to cyclic environmental cues (also called *zeitgebers* or *synchronizing cues*), enabling organisms to anticipate and adaptively respond to daily fluctuations in a particular environment. Synchronization is the adjustment of the endogenous period  $\tau$  of the circadian system so that it equals the period  $T$  of the zeitgeber, reaching a stable phase relationship between them [20].

The timing system is composed of a network of endogenous circadian oscillators in many peripheral tissues that are coordinated by the master clock located in the SCN. At the same time, these oscillators are synchronized with the environment, keeping most biological rhythms internally coupled and synchronized to external periodic cues, in such a way that internal variables occur in an appropriate time sequence and according to the time of day.

The circadian system is particularly sensitive to the environmental light-dark (LD) cycle; synchronization is achieved by the chronic effect of the LD cycle on the

endogenous period, and the acute effects or phase-resetting property of light. It is well known that the magnitude and direction of light-elicited phase shifts depend on the timing of the stimulus (Figure 3); this has been characterized in the phase response curve (PRC). In mammals, the administration of brief light pulses during early night induces phase delays, while light induces phase advances during late night but only small effect during subjective day [21]. In diurnal and nocturnal rodents, the PCR to light exhibits close similarities at both behavioral and molecular levels, indicating that the mechanisms of photic entrainment are phylogenetically highly conserved [22].

The retina perceives photic stimuli by a subset of retinal ganglion cells (RGC) that contain the photopigment melanopsin [23]. The neuronal projections of RGC impinge directly onto the SCN, by the retino-hypothalamic tract (RHT). Exposure to light pulses during the night induces the release of glutamate and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) from the RHT terminals, activation of N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR), and calcium influx within the SCN cells that can modify the expression of components of the molecular clock [24, 25]. It has been demonstrated that the phase-shifting effects of light on the locomotor-activity rhythm are restricted to the night time, producing a fast-resetting in the ventral SCN and a slow-resetting in the dorsal SCN [26], accompanied by a differential induction of the *per1* and *per2* genes [review in 27].

In particular situations, the function of the circadian system becomes dissociated from astronomical time; this is known as desynchronization. Altered circadian organization has been implicated as a cause of various health problems, such as cardiovascular and gastrointestinal diseases, metabolic disorders, cognitive deficits, sleep disorders, reduced fertility, alterations in immune response, and increased cancer risk [review in 28]. Desynchronization may result from both external and internal factors that disrupt the phase relationship between the endogenous timing system and external cues.

External factors include shift work and jet lag, where the phase relationship between the zeitgebers and the circadian system is disrupted, and a certain number of transitory cycles are required to establish a new, stable phase relationship with the synchronizing cue (Figure 3). Shift work is a chronic situation in which subjects are exposed repeatedly to conflicting synchronizing cues (e.g., light, physical activity, social interaction, among others); usually shift workers are undergoing a desynchronization or resynchronization of the circadian timing system and the LD cycle, since they are subjected to repeated changes in the time of day when they are awake or asleep. Jet lag is produced by a single abrupt

shift of environmental timing cues, as occurs in intercontinental travels, forcing the circadian system to resynchronize to a different LD schedule [28-30]. In both cases, the resynchronization takes place gradually over several cycles, due to the transitory desynchronization of SCN neuronal populations [31, 32] and differential rates of re-entrainment among the peripheral oscillators [33-35]. Recent studies suggest that glucocorticoids participate as a key hormonal pathway involved in the rate of resynchronization [35].

Internal factors that have been associated with desynchronization are those that produce the inability to process the photic information, such as blindness, genetic sleep disorders, and aging. In the advanced sleep-phase syndrome (ASPS), the times of sleep onset and waking occur abnormally early; this syndrome is more prevalent in the elderly, and has been associated with a mutation in two core components of the molecular clock, *per2* and *casein kinase 1 $\delta$* . The delayed sleep-phase syndrome (DSPS) is characterized by abnormally late sleep onset and wake times, and this condition is associated with a mutation in *per3* [30, 36].

Elderly subjects commonly exhibit significant changes in circadian organization which are evident at various levels: the overt rhythmicity of different variables becomes imprecise or fragmented, and there are alterations in the function of the central pacemaker, particularly the network properties of the SCN and peripheral oscillators [37, 38]. In addition, the phase resetting of the circadian system by light is affected by aging due to impaired light perception and defects in the canonical clockwork of the SCN.

The sensitivity of the circadian system to light in old rodents and primates is markedly reduced; this occurs within the SCN itself, since no changes were observed in the RHT projections [39-41]. Several studies demonstrated that aging produces an impairment of the photic re-synchronization at different levels; at the behavioral level, old animals required a greater number of transitory cycles than younger mice [42]. At the SCN level, old animals show reduced phase responses of key proteins to light, including the expression of *c-Fos*, an indirect marker of neuronal activity [39-41], and of some core components of the molecular clock such as of *per1* [43, 44]. There is also an increase with age in the phase dispersion among the SCN neurons and the cycles required for re-synchronization [45, 46]. In addition, the phase shifting ability of glutamate, NMDA, and histamine, neurotransmitters that reset the circadian clock in a similar way to light, is markedly decreased in old mice [47]. Considering peripheral oscillators, it has been found that the liver, esophagus, and thymus of old rats displayed slower re-synchronization [45, 46].

Thus, aging is associated with an altered re-synchronization of the SCN and peripheral tissues that reflect a marked reduction in the amplitude and functional output of the circadian hypothalamic pacemaker.

### Molecular alterations associated with clock-genes

Recent years have witnessed the recognition of modified phenotypes, pathological processes, and clinical reports involving the malfunction of clock genes and the timing

system. From experimental models involving manipulation of gene expression to medical descriptions of human patients presenting altered alleles in clock genes, the prevalent notion is that circadian timing influences many physiological activities. In addition, it can be the substrate of pathological manifestations when the organism cannot correctly adapt to a variety of environmental stresses.

**Table 1.** Metabolic and pathological impact of mutations in clock genes: Positive limb of the molecular clock (BMAL1 and CLOCK)

Clock Protein	Model and type of analysis	Action or Phenotype Effect	Reference
<b>BMAL1</b>	Mice BMAL1 <sup>-/-</sup>	Hypoglycemia, Gluconeogenesis abolished	Rudic et al., 2004 [63]
<b>CLOCK</b>	Mice CLOCK <sup>mut</sup>	Hypoglycemia, Protection to develop diabetes under high-fat feeding.	Rudic et al., 2004 [63]
<b>BMAL1</b>	Mice BMAL1 <sup>-/-</sup>	Premature aging with increased sensitivity to oxidative stress	Khapre et al., 2011 [64]
<b>BMAL1</b>	Mice BMAL1 <sup>-/-</sup>	Lifespan reduced, progeria-associated alterations	Kondratov et al., 2006 [65]
<b>BMAL1</b>	Mice and human cell lines, BMAL1 <sup>-/-</sup> , overexpression and silencing	Alterations in adipose tissue differentiation and lipogenesis	Shimba et al., 2005 [66]
<b>CLOCK</b>	Mice CLOCK <sup>-/-</sup>	Lifespan reduced with development of cataracts and dermatitis	Dubrovsky et al., 2010 [67]
<b>CLOCK</b>	Mice CLOCK <sup>-/-</sup>	Normal rhythms of locomotor activity, but with altered responses to light	DeBruyne et al., 2006 [68]

The experimental approaches to characterize the impact of mutations in clock genes were: a) single, double and triple knockout mouse models and, b) punctual mutations. Different animal models were used as male mice, female mice, C57BL/6J mice and humans. Abbreviations: BMAL1 (Brain and Muscle Arnt-Like protein-1) and CLOCK (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput).



**Table 2.** Metabolic and pathological impact of mutations in clock genes: Negative limb of the molecular clock (PER and CRY) and in the Casein kinase I epsilon (CKIε).

Clock protein	Experimental Model	Action or Phenotype Effect	Reference
<b>PER1</b>	Per1 <sup>-/-</sup> mice	Short period (~1h) in locomotor activity; delaying the expression of clock genes (Per1 and Per2) in peripheral tissues	Cermakian et al., 2001 [69]
	Per1 <sup>Brd</sup> mice	Impaired glucocorticoid rhythm; smaller body mass; different food and water intake; increased glucose metabolism	Dallmann et al., 2006 [70]
	Per1 <sup>-/-</sup> middle-aged female mice	Lower reproductive rate	Pilorz & Steinlechner, 2008 [71]
	C57BL/6J Per1 <sup>-/-</sup> mice	Failure in circadian rhythmicity in adult SCN slices in vitro	Pendergast et al., 2009 [72]
<b>PER2</b>	hPer2 S662G mutation	Familial advanced sleep phase syndrome (FASPS)	Toh et al., 2001 [73]
	mPer2 <sup>mut</sup> mice	Sleep disorders; phase advance of motor activity onset	Kopp et al., 2002 [74]
	Per2 <sup>Brd</sup> mice	Higher food and water intake; altered glycemia	Dallmann et al., 2006 [70]
	Per21 <sup>-/-</sup> middle-aged female mice	Lower reproductive rate	Pilorz & Steinlechner., 2008 [71]
<b>Per3</b>	mPer3 <sup>-/-</sup>	Shortening of the circadian period (0.5 h)	Shearman et al., 2000 [75]
	Per3 <sup>tm1Drw</sup> mice	Obesity on a high fat diet	Dallmann & Weaver, 2010 [76]
<b>PER1-3</b>	mPer1/2/3 <sup>tm1Drw</sup> male mice	Higher body mass on a high fat diet	Dallmann & Weaver, 2010. [76]
<b>CRY1</b>	Cry1 <sup>-/-</sup> mice	Accelerated free-running periodicity of locomotor activity in DD	Van der Horst et al., 1999 [77]
<b>CRY2</b>	Cry2 <sup>-/-</sup> mice	Delayed free-running periodicity of locomotor activity in DD	Van der Horst et al., 1999 [77]
<b>Cry1-2</b>	Cry1 <sup>-/-</sup> /Cry2 <sup>-/-</sup> mice	Complete loss of free-running rhythmicity in DD	Van der Horst et al., 1999 [77]
<b>CK1ε</b>	CK1ε <sup>-/-</sup> mice	Circadian period lengthened	Meng et al., 2008 [78]
	CK1ε <sup>tau/tau</sup> mice	Shortened circadian rhythm in vivo and in vitro; accelerated 24 h- oscillations in peripheral tissues	Meng et al., 2008 [78]

The experimental approaches to characterize the impact of mutations in clock genes were: a) single, double and triple knockout mouse models and, b) punctual mutations. Different animal models were used as male mice, female mice, C57BL/6J mice and humans. Abbreviations: Per (period genes), Cry (*cryptochrome genes*), CKIε (casein kinase I epsilon).

Table 1 and Table 2 summarize the most representative reports showing the pathophysiologic effects associated with genetic disruption of clock genes. Table 1 shows examples of molecular alterations in the positive loop of the molecular clock, namely BMAL1 and

CLOCK, whereas Table 2 summarizes modifications in the elements of the negative loop, CRY and PER. It can be seen that health problems including sleep disorders, propensity to neoplastic events, and metabolic alterations such as diabetes, obesity, and metabolic syndrome are

among the maladies associated with malfunctions of the circadian physiology. However, as already mentioned, environmental circumstances can also influence the timing system, and in some instances like trans-meridian travels and nocturnal work sessions, they act as triggers of physical disorders.

## Ontogeny and aging of the circadian system

### Ontogeny

Ontogeny is the functional maturation, especially during embryonic stages, of an organisms' homeostasis, behavior, reproductive systems, and the wane of these systems by aging; during ontogenetic development in mammals, environmental and maternal signals are involved on fetal to early postnatal periods [48, 49].

The ontogeny of the mammalian circadian system and the mechanisms of entrainment have been studied mainly in rodents. The two processes imply maturation as well as adaptation. The SCN of rats is formed, on embryonic days (E) 14 through E17, from a specialized zone of the ventral diencephalic germinal epithelium [50, 51]. Even though the rhythmic fluctuations of the clock genes are detected between E19 and P (postnatal day) 3, the body temperature daily rhythm is not evident during the first days of life. It has been proposed that the phase of the circadian clock is coordinated with that of the mother [51]. The photic and non-photoc cues coming from the mother are part of the entrainment process, but they differ temporally. Synchronization of peripheral oscillators takes place at different times from that of SCN entrainment, and it occurs later in development [51].

Using tissues cultured with a PER1-luciferase reporter (PER1:LUC expression) the maturation of peripheral oscillators was analyzed during the postnatal development of rat pups. Peripheral oscillators matured at different rates, with a strong maternal influence dictating the phase of the pup's liver rhythm. The bioluminescence rhythms in the liver were affected by the nursing time, and became stabilized on P25 with a phase corresponding to late night. In contrast, the lung rhythms reached a stable phase at night on P10 [52].

The circadian physiology during fetal life is dependent on the periodic maternal entrainment provided by a variety of endocrine and metabolic signals [53]. In rat and human, the SCN is histologically detected by mid gestation, and it shows changes in metabolic activity from day to night; however, innervation by the retino-hypothalamic tract in human is completed in utero, whereas in rodents this process occurs after birth [53].

Circadian profiles of SCN rhythmicity in the rat develop before birth. Several mRNAs and clock proteins were assessed at E19 by immunohistochemistry, but they

did not show daily fluctuations. At P3, rhythms in mRNAs for PER1, PER2, CRY1, and BMAL1, but not in CLOCK, were detected in the SCN. The rhythms matured gradually, but they did not reach complete rhythmicity until P10 [50]. Light sensitivity and activation of *per* genes in rat SCN develop in sequence, *per1* preceding *per2* gene expression [54].

Non-photoc maternal entrainment cues seem to be dominant, without being the generator of fetal rhythms intrinsically. Fetal SCN and possibly peripheral clocks are entrained by rhythmically delivered maternal signals, including: signaling by dopamine through induction of c-fos, melatonin, periodic feeding, maternal behavior, stress signals [49], however there is still necessary research to gain more insight into the mechanisms of ontogeny of circadian rhythms in mammals.

### Aging

Aging is a complex biological process that is defined as an age-dependent or age-progressive abatement in intrinsic physiological functions, and it is associated with an increase in mortality rate and a decrease in reproductive success. Aging is not controlled exclusively by genetics, but rather by the interaction of environmental cues and genetic activity [55, 56].

In humans, the changes in circadian properties associated with aging are: 1) the amplitude of the circadian rhythms is reduced, 2) there is a phase advance in the circadian rhythms dependent on the SCN, and 3) there is a disruption of nocturnal sleep. However, the natural free-running period ( $\tau$ ) does not change, and the ability to tolerate abrupt phase shifts is similar to younger people [57].

Free radicals and oxidative stress have been implicated in the biology of aging [56]. A progressive loss of circadian photoreception with aging has been reported, due to a reduction in pupil area and an increase in crystalline lens light absorption [58].

Aging is characterized by decreases in mitochondrial functions associated with an accumulation of mitochondrial DNA mutations, and reactive oxygen species (ROS) are identified as being responsible for some of these age-related changes. It has been postulated that pro-oxidant reactions associated with higher ROS levels could be responsible for the circadian desynchrony and metabolic dysregulation that characterize aging and age-related pathologies.

Longevity is impacted also by nutritional physiology [59]. SIRT1 (silent repressor of transcription) is a NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase that activates the transcription of BMAL1 and CLOCK in the SCN and other peripheral oscillators. However, in aged mice, the levels of SIRT1 are reduced, resulting in circadian abnormalities and

lower activity in comparison to younger animals. Interestingly, some of the circadian changes associated with a senescent SCN are reversed by an overexpression of SIRT1 [60].

Melatonin is a natural antioxidant with significant anti-aging properties. Circulating melatonin decreases with age, and its diurnal rhythm is altered with phase advance in the elderly versus young female humans [61].

Feeding regimens affect circadian rhythms; they can also attenuate aging and increase longevity. Caloric restriction (CR), which limits the daily calorie intake, and intermittent fasting (IF) influence the entrainment of the SCN and extend the life span of diverse species by a mechanism that is still unclear. SIRT1 has been suggested to mediate the induced effects of CR, but the underlying mechanisms of IF are still unknown [62]. Currently, chrono-nutrition is a novel dietary lifestyle strategy used to counteract the deleterious actions of oxidative stress on physiological systems during aging [56].

### Concluding remarks

Based in the knowledge generated in the last twenty years, it is now well accepted that circadian rhythms, along with the temporal adjustments needed to deal with the daily environmental changes, are part of the normal status that characterizes the physiological response in most living beings on our planet. The interdependence of timing and energetic metabolism seems inextricable; hence, circadian physiology covers all aspects of functional adaptations, including developmental and aging-related processes. Examples of pathologies associated with altered functioning of the timing system are ever more numerous. The intimate links between the circadian networks of the molecular clock and the metabolic networks are now considered as a potential substrate to test novel therapies and medical approaches that might prevent or improve diverse health abnormalities. Indeed, we foresee in the near future an increase in the interest of both the scientific community and the general public regarding the inextricable interdependence among circadian rhythmicity, pathological processes, and aging.

### Acknowledgment

The authors thank Dr. Dorothy Pless for her careful and professional review of the English version of this manuscript. We also acknowledge the assistance of Dr. Olivia Vázquez-Martínez in Figures elaboration. EAL and DDP are students enrolled in the Ph.D. program in Biomedical Sciences, Universidad Nacional Autónoma de México. The research and academic activities of MDM are funded by CONACYT (grant 129-511) and DGAPA-PAPIIT (grant IN202412).

### References

- [1] Dunlap JC, Loros JJ and DeCoursey PJ. *Chronobiology: Biological Timekeeping*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, USA. 2009.
- [2] Panda S, Hogenesch JB, Kay SA (2002). Circadian rhythms from flies to human. *Nature*, 417:329-335.
- [3] Dibner C, Schibler U, Albrecht U (2010). The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clock. *Annu Rev Physiol*, 72:517-549.
- [4] Johnson MH, Day ML (2000). Egg timers: how is developmental time measured in the early vertebrate embryo? *Bioessays*, 22:57-63.
- [5] Reppert SM, Weaver DR (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, 418: 935-941.
- [6] Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, Zheng B, *et al.* (2000). Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science*, 288:1013-19.
- [7] Pando MP, Morse D, Cermakian N, Sassone-Corsi P (2002). Phenotypic rescue of a peripheral clock genetic defect via SCN hierarchical dominance. *Cell*, 110:107-117.
- [8] Mohawk JA, Green CB, Takahashi JS (2012). Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annu Rev Neurosci*, 35:445-462.
- [9] Vielhaber E, Eide E, Rivers A, Gao ZH, Virshup DM (2000). Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I epsilon. *Mol Cell Biol*, 13:4888-899.
- [10] Yagita K, Tamanini F, Yasuda M, Hoeijmakers JH, van der Horst GT, Okamura H (2000). Nucleocytoplasmic shuttling and mCRY-dependent inhibition of ubiquitylation of the mPER2 clock protein. *EMBO J*, 21:1301-314.
- [11] Duguay D, Cermakian N (2009). The crosstalk between physiology and circadian clock proteins. *Chronobiol Int*, 26:1479-1513.
- [12] Duffield GE (2003). DNA microarray analyses of circadian timing: the genomic basis of biological time. *J Neuroendocrinol*, 15: 991-1002.
- [13] Cheung P, Allis CD, Sassone-Corsi P (2000). Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell*, 103: 263-271.
- [14] Crosio C, Cermakian N, Allis CD and Sassone-Corsi P (2000). Light induces chromatin modification in cells of the mammalian circadian clock. *Nat Neurosci*, 3: 1241-1247.
- [15] Etchegaray JP, Lee C, Wade PA and Reppert SM (2003). Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock. *Nature*, 421: 177-182.
- [16] Doi M, Hirayama J, Sassone-Corsi P (2006). Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase. *Cell*, 125: 497-508.
- [17] Hirayama J, Sahar S, Grimaldi B, Tamaru T, Takamatsu K, Nakahata Y, Sassone-Corsi P (2007). CLOCK-mediated acetylation of BMAL1 controls circadian function. *Nature*, 450: 1086-1090.



- [18] Nader N, Chrousos GP, Kino T (2009). Circadian rhythm transcription factor CLOCK regulates the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor by acetylating its hinge region lysine cluster: potential physiological implications. *FASEB J*, 23:1572-1583.
- [19] Bellet MM, Sassone-Corsi P (2010). Mammalian circadian clock and metabolism-the epigenetic link. *J Cell Sci*, 123: 3837-848.
- [20] Pittendrigh CS (1981). Circadian systems: general perspective. In: Aschoff J, editor. *Handbook of Behavioral Neurobiology Vol. 4: Biological Rhythms*. New York: Plenum Press, 57-80.
- [21] Daan S, Pittendrigh CS (1976). A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. II. The variability of phase response curves. *J Comp Physiol*, 106:253-266.
- [22] Caldelas I, Poirel VJ, Sicard B, Pévet P, Challet E (2003). Circadian profile and photic regulation of clock genes in the suprachiasmatic nucleus of a diurnal mammal *Arvicantha ansorgei*. *Neuroscience*, 116:583-591.
- [23] Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW (2002). Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science*, 295:1065-1070.
- [24] Gillette MU, Mitchell JW (2002). Signaling in the suprachiasmatic nucleus: selectively responsive and integrative. *Cell Tissue Res*, 309:99-107.
- [25] Gau D, Lemberger T, von Gall C, Kretz O, Le Minh N, Gass P, Schmid W, Schibler U, Korf HW, Schutz G (2002). Phosphorylation of CREB Ser142 regulates light-induced phase shifts of the circadian clock. *Neuron*, 34:245-253.
- [26] Albus H, Vansteensel MJ, Michel S, Block GD, Meijer JH (2005). A GABAergic mechanism is necessary for coupling dissociable ventral and dorsal regional oscillators within the circadian clock. *Curr Biol*, 15:886-893.
- [27] Challet E, Caldelas I, Graff C, Pévet P (2003). Synchronization of the molecular clockwork by light- and food-related cues in mammals. *Biol Chem*, 384: 711-719.
- [28] Golombek DA, Casiraghi LP, Agostino PV, Paladino N, Duhart JM, Plano SA, Chiesa JJ (2013). The times they're a-changing: Effects of circadian desynchronization on physiology and disease. *J Physiol Paris*, 107:310-322.
- [29] Waterhouse J, Buckley P, Edwards B, Reilly T (2003). Measurement of, and some reasons for, differences in eating habits between night and day workers. *Chronobiol Int*, 20: 1075-1092.
- [30] Touitou Y, Bogdan A (2007). Promoting adjustment of the sleep-wake cycle by chronobiotics. *Physiol Behav*, 90: 294-300.
- [31] Nagano M, Adachi A, Nakahama K, Nakamura T, Tamada M, Meyer-Bernstein E, Sehgal A, Shigeyoshi Y (2003). An abrupt shift in the day/night cycle causes desynchrony in the mammalian circadian center. *J Neurosci*, 23: 6141-6151
- [32] Nakamura W, Yamazaki S, Takasu NN, Mishima K, Block GD (2005). Differential response of Period 1 expression within the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci*, 25: 5481-5487.
- [33] Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block GD, Sakaki Y, Menaker M, Tei H (2000). Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*, 288: 682-685.
- [34] Yamazaki S, Straume M, Tei H, Sakaki Y, Menaker M, Block GD (2002). Effects of aging on central and peripheral mammalian clocks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 10801-10806.
- [35] Kiessling S, Eichele G, Oster H (2010). Adrenal glucocorticoids have a key role in circadian resynchronization in a mouse model of jet lag. *J Clin Invest*, 120: 2600-2609.
- [36] Toh KL (2008). Basic science review on circadian rhythm biology and circadian sleep disorders. *Ann Acad Med Singapore*, 37:662-668.
- [37] Froy O (2011). Circadian rhythms, aging, and life span in mammals. *Physiology (Bethesda)*, 26:225-235.
- [38] Palomba M, Nygård M, Florenzano F, Bertini G, Kristensson K, Bentivoglio M (2008). Decline of the presynaptic network, including GABAergic terminals, in the aging suprachiasmatic nucleus of the mouse. *J Biol Rhythms*, 23:220-231.
- [39] Zhang Y, Brainard GC, Zee PC, Pinto LH, Takahashi JS, Turek FW (1998). Effects of aging on lens transmittance and retinal input to the suprachiasmatic nucleus in golden hamsters. *Neurosci Lett*, 258:167-170.
- [40] Lupi D, Semo M, Foster RG (2012). Impact of age and retinal degeneration on the light input to circadian brain structures. *Neurobiol Aging*, 33:383-392.
- [41] Aujard F, Dkhissi-Benyahya O, Fournier I, Claustrat B, Schilling A, Cooper HM, *et al.* (2001). Artificially accelerated aging by shortened photoperiod alters early gene expression (Fos) in the suprachiasmatic nucleus and sulfatoxymelatonin excretion in a small primate, *Microcebus murinus*. *Neuroscience*, 105:403-412.
- [42] Valentinuzzi VS, Scarbrough K, Takahashi JS, Turek FW (1997). Effects of aging on the circadian rhythm of wheel-running activity in C57BL/6 mice. *Am J Physiol*, 273:R1957-R1964.
- [43] Asai M, Yoshinobu Y, Kaneko S, Mori A, Nikaido T, Moriya T, *et al.* (2001). Circadian profile of Per gene mRNA expression in the suprachiasmatic nucleus, paraventricular nucleus, and pineal body of aged rats. *J Neurosci Res*, 66:1133-1139.
- [44] Kolker DE, Fukuyama H, Huang DS, Takahashi JS, Horton TH, Turek FW (2003). Aging alters circadian and light-induced expression of clock genes in golden hamsters. *J Biol Rhythms*, 8:159-169.
- [45] Davidson AJ, Yamazaki S, Arble DM, Menaker M, Block GD (2008). Resetting of central and peripheral circadian oscillators in aged rats. *Neurobiol Aging*, 29:471-477.
- [46] Sellix MT, Evans JA, Leise TL, Castañón-Cervantes O, Hill DD, DeLisser P, *et al.* (2012). Aging differentially affects the re-entrainment response of central and peripheral circadian oscillators. *J Neurosci*, 32:16193-16202.

- [47] Biello SM (2009). Circadian clock resetting in the mouse changes with age. *Age*, 31: 293-303.
- [48] Davis FC (1981). Ontogeny of circadian rhythms. In: Aschoff, J, editor. *Handbook of Behavioral Neurobiology Vol. 4: Biological Rhythms*. New York: Plenum Press, 257-274.
- [49] Sumov A, Bendová Z, Sládek M, El-Hennamy R, Laurinová K, Jindráková Z, et al. (2006). Setting the biological time in central and peripheral clocks during ontogenesis. *FEBS Lett*, 580:2836-2842.
- [50] Sládek M, Sumov A, Kováčiková Z, Bendová Z, Laurinová K, Illnerová H. (2004). Insight into molecular core clock mechanism of embryonic and early postnatal rat suprachiasmatic nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 6231-6236.
- [51] Weinert D (2005). Ontogenetic development of the mammalian circadian system. *Chronobiol Int*, 22:179-205.
- [52] Yamazaki S, Yoshikawa T, Biscoe EW, Numano R, Gallsby LM, Soubry S, et al. (2009). Ontogeny of circadian organization in the rat. *J Biol Rhythms*, 24:55-63.
- [53] Serón-Ferré M, Mendez N, Abarzúa-Catalán L, Vilches N, Valenzuela FJ, Reynolds HE, Llanos AJ, Rojas A, Valenzuela GJ, Torres-Farfán C (2012). Circadian rhythms in the fetus. *Mol Cell Endocrinol*, 349:68-75.
- [54] Matejů K, Bendová Z, El-Hennamy R, Sládek M, Sosniyenko S, Sumová A (2009). Development of the light sensitivity of the clock genes *Period1* and *Period2*, and immediate-early gene *c-fos* within the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci*, 29:490-501.
- [55] Flatt T (2012). A new definition of aging? *Front Genet*, 3:148.
- [56] Garrido M, Terrón MP, Rodríguez AB (2013). Chrononutrition against oxidative stress in aging. *Oxid Med Cell Longev*, 2013:729804.
- [57] Monk TH (2005). Aging human circadian rhythms: conventional wisdom may not always be right. *J Biol Rhythms*, 20:366-374.
- [58] Turner PL, Mainster MA (2008). Circadian photoreception: ageing and the eye's important role in systemic health. *Br J Ophthalmol*, 92:1439-1444.
- [59] Bednářová A, Kodrık D, Krishnan K (2013). Nature's timepiece—molecular coordination of metabolism and its impact on aging. *Int J Mol Sci*, 14:3026-3049.
- [60] Chang HC, Guarente L (2013). SIRT1 mediates central circadian control in the SCN by a mechanism that decays with aging. *Cell*, 153:1448-1460.
- [61] Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Esquifino AI, Perumal SR, Miller SC (2005). Melatonin, immune function and aging. *Immun Ageing*, 2:17.
- [62] Froy O, Miskin R (2010). Effect of feeding regimens on circadian rhythms: implications for aging and longevity. *Aging* 2:7-27.
- [63] Rudic RD, McNamara P, Curtis AM, Boston RC, Panda S, Hogenesch JB, Fitzgerald GA (2004). *BMAL1* and *CLOCK*, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *Plos One*, 2(11):e377. Epub 2004 Nov 2.
- [64] Khapre RV, Kondratova AA, Susova O, Kondratov RV (2011). Circadian clock protein *BMAL1* regulates cellular senescence in vivo. *Cell Cycle*, 10: 4162-4169.
- [65] Kondratov RV, Kondratova AA, Gorbacheva VY, Vykhovanets OV, Antoch MP (2006). Early aging and age-related pathologies in mice deficient in *BMAL1*, the core component of the circadian clock. *Genes Dev*, 20: 1868-1873.
- [66] Shimba S, Ishii N, Ohta Y, Ohno T, Watabe Y, Hayashi M, Wada T, Aoyagi T, Tezuka M (2005). Brain and muscle *Arnt*-like protein-1 (*BMAL1*), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 12071-12076.
- [67] Dubrovsky YV, Samsa WE, Kondratov RV (2010). Deficiency of circadian protein *CLOCK* reduces lifespan and increases age-related cataract development in mice. *Aging*, 2:936-944.
- [68] Debruyne JP, Noton E, Lambert CM, Maywood ES, Weaver DR, Reppert SM (2006). A clock shock: mouse *CLOCK* is not required for circadian oscillator function. *Neuron*, 50: 465-477.
- [69] Cermakian N, Monaco L, Pando MP, Dierich A, Sassone-Corsi P (2001). Altered behavioral rhythms and clock gene expression in mice with a targeted mutation in the *Period1* gene. *EMBO J*, 20: 3967-3974.
- [70] Dallmann R, Touma C, Palme R, Albrecht U, Steinlechner S (2006). Impaired daily glucocorticoid rhythm in *Per1* (*Brd*) mice. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*, 192: 769-775.
- [71] Pilonov V, Steinlechner S (2008). Low reproductive success in *Per1* and *Per2* mutant mouse females due to accelerated ageing? *Reproduction*, 135:559-568.
- [72] Pendergast JS, Friday RC, Yamazaki S (2009). Endogenous rhythms in *Period1* mutant suprachiasmatic nuclei in vitro do not represent circadian behavior. *J Neurosci*, 29:14681-14686.
- [73] Toh KL, Jones CR, He Y, Eide EJ, Hinz WA, Virshup DM, Ptáček LJ, Fu YH (2001). An *hPer2* phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science*, 291: 1040-1043.
- [74] Kopp C, Albrecht U, Zheng B, Tobler I (2002). Homeostatic sleep regulation is preserved in *mPer1* and *mPer2* mutant mice. *Eur J Neurosci*, 16: 1099-1106.
- [75] Shearman LP, Jin X, Lee C, Reppert SM, Weaver DR (2000). Targeted disruption of the *mPer3* gene: subtle effects on circadian clock function. *Mol Cell Biol*, 20: 6269-6275.
- [76] Dallmann R, Weaver DR (2010). Altered body mass regulation in male *mPeriod* mutant mice on high-fat diet. *Chronobiol Int*, 27: 1317-1328.
- [77] Van der Horst GT, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno S, Takao M, de Wit J, Verkerk A, Eker AP, van Leenen D, Buijs R, Bootsma D, Hoeijmakers JH, Yasui A (1999). Mammalian *Cry1* and *Cry2* are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature*, 398:627-630.
- [78] Meng QJ, Logunova L, Maywood ES, Gallego M, Lebiecki J, Brown TM, et al. (2008). Setting clock speed in mammals: the *CK1 epsilon tau* mutation in mice

accelerates circadian pacemakers by selectively destabilizing PERIOD proteins. *Neuron*, 58:78-88

## Research Article

# Synchronization by Food Access Modifies the Daily Variations in Expression and Activity of Liver GABA Transaminase

**Dalia De Ita-Pérez, Isabel Méndez, Olivia Vázquez-Martínez, Mónica Villalobos-Leal, and Mauricio Díaz-Muñoz**

*Instituto de Neurobiología, Campus UNAM-Juriquilla, 76230 Querétaro, QRO, Mexico*

Correspondence should be addressed to Mauricio Díaz-Muñoz; [mdiaz@comunidad.unam.mx](mailto:mdiaz@comunidad.unam.mx)

Received 13 December 2013; Revised 3 March 2014; Accepted 11 March 2014; Published 7 April 2014

Academic Editor: Mario Guido

Copyright © 2014 Dalia De Ita-Pérez et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Daytime restricted feeding (DRF) is an experimental protocol that influences the circadian timing system and underlies the expression of a biological clock known as the food entrained oscillator (FEO). Liver is the organ that reacts most rapidly to food restriction by adjusting the functional relationship between the molecular circadian clock and the metabolic networks.  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) is a signaling molecule in the liver, and able to modulate the cell cycle and apoptosis. This study was aimed at characterizing the expression and activity of the mostly mitochondrial enzyme GABA transaminase (GABA-T) during DRF/FEO expression. We found that DRF promotes a sustained increase of GABA-T in the liver homogenate and mitochondrial fraction throughout the entire day-night cycle. The higher amount of GABA-T promoted by DRF was not associated to changes in GABA-T mRNA or GABA-T activity. The GABA-T activity in the mitochondrial fraction even tended to decrease during the light period. We concluded that DRF influences the daily variations of GABA-T mRNA levels, stability, and catalytic activity of GABA-T. These data suggest that the liver GABAergic system responds to a metabolic challenge such as DRF and the concomitant appearance of the FEO.

## 1. Introduction

GABA transaminase (GABA-T; 4-aminobutanoate:2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.19) is a catabolic enzyme that converts GABA and  $\alpha$ -ketoglutarate into succinate semialdehyde and glutamate. Its specificity is not strict since it can also recognize alanine,  $\beta$ -alanine, aspartate, and propanoate as substrates. GABA-T is dependent on pyridoxal-phosphate (PLP) as cofactor, and its catalytic mechanism consists of two coupled half reactions in which the PLP cofactor oscillates between the pyridoxal and the pyridoxamine forms [1]. GABA-T has been found in a large variety of species ranging from microorganisms, plants, invertebrates, and vertebrates. In eukaryotic cells, GABA-T is present, but not exclusively, within the mitochondria [2, 3]. This enzyme has been crystallized from several sources. The structure of GABA-T from brain pig indicates a  $\alpha_2$  dimer with 472 residues per subunit; the two monomers are tightly intertwined, and the two PLP cofactors are located close to the

subunit interface [4]. The structure of the brain GABA-T also contains a [2Fe-2S] cluster in the vicinity of the PLP cofactors [5]. The maturation process in the synthesis of GABA-T involves a proteolytic cleavage that removes the XRX(\*)XS motif. However, in the liver, GABA-T is further cleaved to a smaller isoform by a second proteolytic step catalyzed by a mitochondrial processing peptidase [6].

GABA is a well-known inhibitory transmitter in the nervous system. However, components of the GABAergic system have also been characterized in a variety of endocrine tissues such as pancreas, testis, and liver [7–9]. Mammalian liver contains GABA at nM levels as well as its specific transporters (GAT2) and receptors (both GABAR-A and GABAR-B) [10]. Liver GABA has been proposed to function as a positive regulator of the cell cycle, with implications in some forms of hepatocellular carcinoma [11]. High GABA-T activity has been reported in hepatic tissue [12], the rationale being that liver GABA-T mainly functions to degrade

the GABA produced by microorganisms in the gastrointestinal tract [13]. In addition, GABA can also be present in the food ingested at mealtime.

Daytime restricted feeding (DRF) is an experimental protocol that influences the circadian timing system by promoting the emergence of an alternate master circadian oscillator that is independent of the suprachiasmatic nucleus (SCN) [14]. The basis for this new form of measuring the “physiological timing” is a circadian entity known as the food entrainable oscillator (FEO), but its anatomical location is still unidentified [15]. The DRF protocol involves the establishment of a catabolic response promoted by limiting the food intake to a few hours (2–4 h) during the light phase of the day-night cycle. The display of an anticipatory behavior is evident before mealtime (food anticipatory activity, FAA) as is a diversity of physiological and metabolic adaptations associated with DRF/FEO expression [16]. During the DRF protocol, some biochemical and structural changes in the liver have been associated with improved mitochondrial function as well as increased apoptotic activity and cell division, resulting in enhanced cellular exchange [17, 18].

To obtain further insights into the modulation of the mitochondrial adaptations of the liver GABA-handling system during the DRF protocol/FEO expression, we analyzed the daily variations of GABA-T mRNA and protein expression and enzymatic activity. The results evidenced under the DRF protocol are as follows: (1) an increased presence of GABA-T in homogenate and mitochondrial fraction, (2) changes in the rhythmic profile of GABA-T activity, and (3) disappearance of an ultradian rhythm of GABA-T mRNA.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Animals and Housing.** Experiments were carried out with male Wistar rats weighing from 200 to 250 g and maintained under a 12:12 h LD cycle (lights on 08:00 h) at constant temperature ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Rats were kept in groups of 4 in transparent acrylic cages ( $40 \times 50 \times 20$  cm) with free access to Purina Chow and water except during food restriction or fasting conditions. Experimental procedures were conducted in accordance with our Institutional Guide for Care and Use of Experimental Animals (Universidad Nacional Autónoma de México) and with international ethical standards [19].

**2.2. Experimental Design.** The experimental protocol has been published previously [20]. Briefly, rats were randomly assigned to one of the following feeding conditions for 3 weeks:

- (1) control animals fed with *ad libitum* with free access to food and water throughout the 24 h period, AL group;
- (2) experimental group with restricted food access (exclusively from 12:00 to 14:00 h), DRF group.

At the end of the 3 weeks, subgroups of animals were sacrificed at 3 h intervals over a complete 24 h cycle, starting at 08:00 h. The protocol was followed until the last day.

In addition, 2 more groups were included to compare the acute fasting and subsequent refeeding response in the DRF group.

- (1) Animals fed *ad libitum* were maintained with free food access for 3 weeks; on the last day, food was removed at 14:00 h, and, after 21 h (~1 day) of food deprivation, they were sacrificed (at 11:00 h), F group.
- (2) A second group of rats was similarly deprived of food for 21 h, then refed for 2 h (from 12:00 to 14:00), and sacrificed at 14:00 h, F + R group.

**2.3. Liver Sampling and Subcellular Fractionation.** Rats were beheaded with a guillotine-like instrument. The liver was removed ( $\approx 5$  g) and immediately placed in an ice-cold isolation medium (1:10 wt/vol) containing 250 mM sucrose, 0.1% BSA (fatty acid free), and 0.5 mM EGTA (pH 7.4). The tissue was homogenized in 10 volumes of 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, with a Teflon homogenizer (40 rpm for 10 s). Subcellular fractionation was done according to Aguilar-Delfin et al. [21]. Briefly, the homogenate was centrifuged at 1,500 g for 15 min, and the supernatant was centrifuged at 10,000 g for 20 min to sediment the mitochondrial fraction. Protein was measured by the method of Bradford [22].

**2.4. GABA-T Activity.** GABA-T activity was measured by a coupled enzymatic assay according to the method reported by Jung et al., 1977 [23]. The method involves the conversion of GABA to succinic acid by the consecutive reactions of GABA-T (in the sample) and semialdehyde dehydrogenase (added in the assay). As part of the reactions,  $\text{NAD}^+$  is reduced to NADH, allowing the quantification of GABA transamination by spectrophotometric recording at 340 nm. The increasing in optical density was recorded during the first 2 min of the assay.

**2.5. Western Blot Analysis.** Liver homogenates and mitochondrial fractions were obtained in RIPA buffer (Sigma-Aldrich, SLM, USA) and subjected to denaturing SDS-PAGE under reducing conditions. Total protein concentrations were determined by the Bradford method and equal amounts (30  $\mu\text{g}$ ) were separated on 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and blocked for 1 h in TBST buffer (20 mM TRIS, pH 7.5; 500 mM NaCl; 0.5% Tween 20) containing 5% nonfat milk. Membranes were then washed and incubated in the presence of mouse anti-GABA-T antibody (Rb mAb to ABAT, ab108249, Abcam, Cambridge, UK) diluted 1/10,000 in TBST overnight at  $4^\circ\text{C}$ . As controls, in the case of homogenates, membranes were incubated in the presence of mouse anti-tubulin antibody (ab56676, Abcam, Cambridge, UK) diluted 1/1,000 or in the case of mitochondrial fractions in the presence of rabbit anti-VDAC1/Porin antibody (ab15895, Abcam, Cambridge, UK) diluted 1/1,000. After washing, membranes were incubated with secondary antibodies conjugated to alkaline phosphatase (1/5,000). Bands were revealed using AP conjugate substrate kit (Bio-Rad, CA, USA). Densitometric analysis was performed using the Image Lab Software (v 3.0, Bio-Rad, CA, USA).



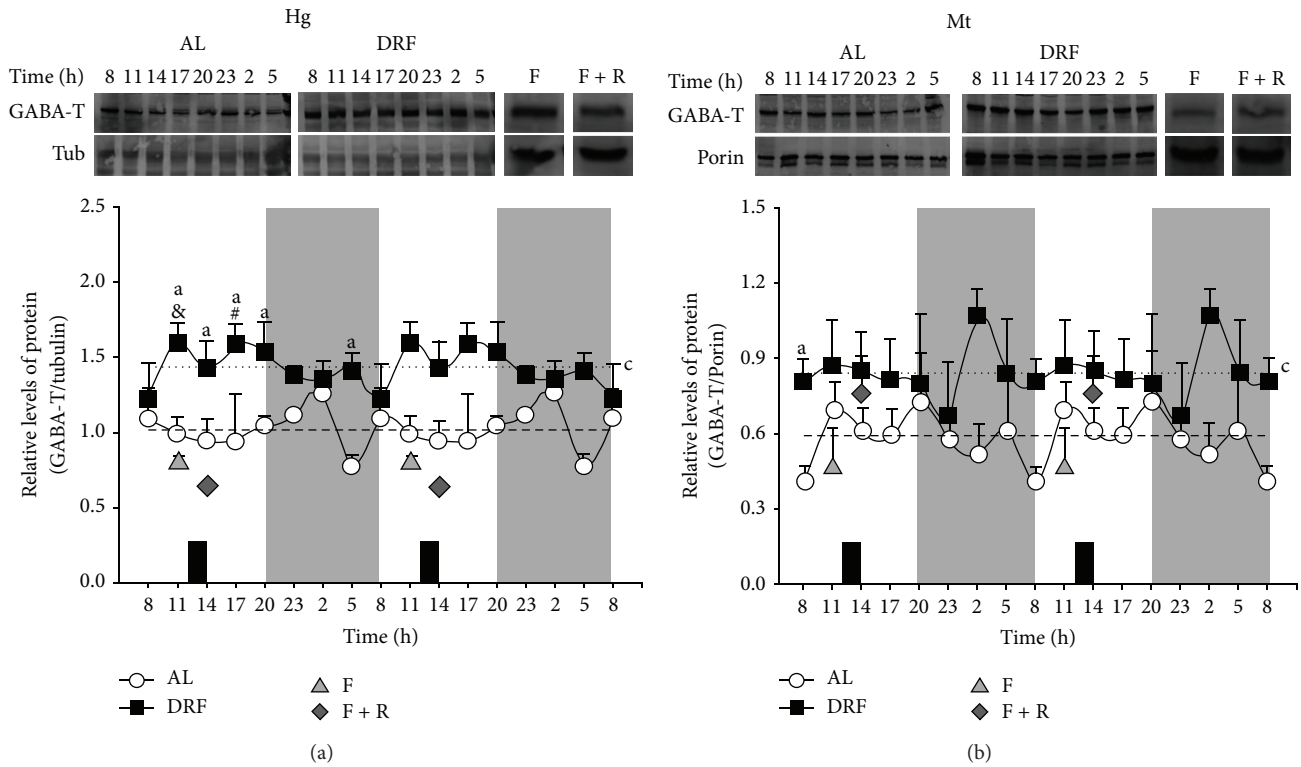


FIGURE 1: Western blot analysis of 24 h profile of GABA-T protein in liver of AL and DRF rats. Liver homogenates (Hg) (a) and mitochondrial fractions (Mt) (b) were subjected to electrophoresis on 10% SDS-polyacrylamide gels. Data were quantified by densitometry of the bands obtained from homogenates (a) and mitochondrial fractions (b) collected over a 24 h period from the AL and DRF groups and food condition controls, F and F + R. Food availability for the DRF group is indicated by dark boxes (from 12:00 to 14:00 h). Average values are represented as a dashed line for the AL group and as a dotted line for the DRF group. Graphs represent the mean  $\pm$  SEM of 4 rats per time point. Significant differences ( $P < 0.05$ ) are indicated as follows: a: DRF versus AL by two-way ANOVA and post hoc Bonferroni test; c: mean of DRF versus mean of AL by Student's *t*-test for both homogenate and mitochondrial fraction; for homogenates only: &, DRF versus F at 11:00; #, DRF versus F + R at 14:00, both by the Student's *t*-test.

TABLE 1: Chronobiological analysis of liver GABA-T parameters: mRNA, protein amount, and activity.

	GABA-T mRNA		GABA-T protein				GABA-T activity			
	AL	DRF	Hg		Mt		Hg		Mt	
			AL	DRF	AL	DRF	AL	DRF	DRF	
Rhythm (%)	—	—	—	—	—	—	—	54.8	40.3	38.4
Mesor	0.9	0.8	1.1	1.5	0.7	0.9	5.2	5.4	2.4	2.0
Amplitude	0.3	—	—	—	—	—	—	1.55	0.48	0.50
Acrophase (h:min)	7:40/15:15/22:50	—	—	—	—	—	—	9:56	5:56	4:14
Period	8 h	—	—	—	—	—	—	24 h	24 h	24 h

Chronos-Fit analysis was performed to evaluate rhythmicity for GABA-T parameters in liver. Acrophases in GABA-T mRNA from AL group were repeated each 7 h with 40 min. Hg: liver homogenate, Mt: mitochondrial fraction, AL: ad libitum, and DRF: daytime restricted feeding. (—) means that no rhythmic pattern was detected.

2.6. *RT-qPCR Amplifications.* GABA-T gene expression was evaluated by isolating total RNA from liver tissues (20–30 mg) using the SV Total RNA Isolation System (Promega, WI, USA). The amount and quality of RNA were estimated spectrophotometrically at 260 and 280 nm, and a constant amount of RNA (2  $\mu$ g) was reverse transcribed using SuperScript III Reverse Transcriptase, Oligo (dT) 12–18 Primer, RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor, and dNTP Set PCR Grade (Invitrogen, CA, USA). Amplification was performed in triplicate in the CFX96TM

Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, CA, USA). Primers used for qPCR amplifications were synthesized by Sigma-Aldrich Co. (MO, USA), and the corresponding sequences were, for GABA-T (GenBank BC081787.1), forward 5'-TTCCGGAAGCTGAGAGACAT-3' and reverse 5'-AGTCTGAACCTCGTCCACCA-3' and, for ribosomal protein S18 (Rps18) (GenBank BC126072.1) used as housekeeping gene, forward 5'-TTCAGCACATCCTGC-GAGTA-3' and reverse 5'-TTGGTGAGGTCAATGTCTGC-3'. Amplifications were carried out with Maxima SYBR

Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, MA USA) in a 10  $\mu$ L final reaction volume containing cDNA (1/100) and 0.5  $\mu$ M of each of the primer pairs in SYBR Green Master Mix, according to the following protocol: activation of Taq DNA polymerase and DNA denaturation at 95°C for 10 min, followed by 40 amplification cycles consisting of 10 s at 95°C, 30 s at 62°C, and 30 s at 72°C. The PCR data were analyzed by the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method and cycle thresholds (CT) normalized to the housekeeping gene Rps18 were used to calculate the mRNA levels of GABA-T.

**2.7. Data Analysis.** Data were classified by group and time and are displayed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Data were compared using a two-way ANOVA using Fisher's least significant difference (LSD) test for multiple and independent measures, with a factor for group (2 levels) and a factor for time (8 levels). In order to determine significant time effects for each daily sampling profile, a one-way ANOVA was performed for individual groups. The one-way ANOVA was followed by Tukey's post hoc test whereas the two-way ANOVA was followed by a Bonferroni post hoc test with the significance threshold set at  $P < 0.05$  for both. The Student's *t*-test was applied to detect significant differences between DRF rats and the controls of feeding conditions (acute fasting and refeeding) both before and after food access (11:00 h and 14:00 h, resp.). The Student's *t*-test was also used to identify significant differences ( $P < 0.05$ ) between the 24 h average values of the AL and DRF groups. Rhythmic analysis was performed by Chronos-Fit (v1.06 developed by P. Zuther, S. Gorbey, and B. Lemmer, 2009) based on a partial Fourier analysis of the data [24]. All statistical analysis was performed with the program STATISTICA, version 4.5 (StatSoft Inc.).

### 3. Results

All results are double plotted displayed to have a better notion of the rhythmic profiles.

**3.1. Liver GABA-T Is Increased by DRF.** The amount of GABA-T protein detected by Western blot analysis in the liver homogenate and mitochondrial fraction is shown in Figure 1. GABA-T did not show any rhythmicity in liver homogenate from AL rats (a). DRF rats showed a significant increase in GABA-T protein throughout the 24 h cycle. The average value was ~38% higher in the DRF group than in the AL group (Table 1 and Figure 1(a)). In addition, significant differences (higher levels in DRF than AL rats) were detected at 05:00 h, 11:00 h, 14:00 h, 17:00 h, and 20:00 h. Similar to the AL rats, no rhythmicity was detected in the Western blot signal in the homogenate of the DRF group. The level of GABA-T was responsive to acute 24 h fasting (F group), showing a significant reduction in comparison to the DRF group at 11:00 h. Two hours of feeding after fasting (F + R group) were not enough to restore the low levels of GABA-T associated with the acute fasting condition (a).

Since GABA-T is in an important proportion a mitochondrial enzyme, the amount of this protein was also evaluated by Western blot analysis in the liver mitochondrial

fraction in the AL and DRF groups (b). As observed in liver homogenate, GABA-T was significantly increased in the DRF group. However, comparing the calculated average values, the elevation was more moderate (~26%, Table 1). Again, no rhythmicity was detected in either group. A significant difference between both groups was detected at 02:00 h. In contrast to the effect observed in the liver homogenate, neither acute fasting (group F) nor acute fasting followed by 2 h of refeeding (F + R group) modified the amount of GABA-T protein in the mitochondrial fraction. However, as to the controls of acute feeding conditions, there was a significant increase (~85%) in the F + R rats in comparison to the F rats.

**3.2. The Activity of Liver GABA-T in the Mitochondrial Fraction Was Modified by DRF.** The activity of GABA-T in AL and DRF groups is shown in Figure 2 for the liver homogenate (a) and for the mitochondrial fraction (b). GABA-T activity in the homogenate fluctuated in both groups, with peaks at 23:00 h and 08:00 h in AL and DRF rats, respectively (Table 1). At these times, significant differences were detected between both groups. In contrast, GABA-T activity in the mitochondrial fraction tended to be reduced in the DRF group, and both groups showed rhythmicity. Peak value for AL rats was at 08:00 h and for DRF rats was at 05:00 h (Table 1). A clear sinusoidal pattern was observed in the AL group with the lowest value in the middle of the light phase and the peak at the transition from the dark and to the light period. The DRF group also exhibited a sinusoidal pattern with the lowest value near the end of the light period and the peak 12 h later. However, this pattern was consistent with the lower values of mitochondrial GABA-T activity, especially during the light period.

In both liver homogenate and the mitochondrial fraction, the food condition controls (F and F + R groups) did not show any changes in comparison to the AL and DRF rats at 11:00 h and 14:00 h, respectively.

**3.3. mRNA of Liver GABA-T Was Not Rhythmic in the DRF Group.** The mRNA for GABA-T was quantified in liver by RT-qPCR in the AL and DRF groups, and the results are shown in Figure 3. AL rats showed rhythmicity in this parameter with 2 larger peaks, one at 17:00 h and the second at 23:00 h, and a minor peak at 08:00 h. There was also a pronounce valley at 20:00 h. Indeed, rhythmic analysis detected an ultradian rhythm with a period of ~8 h (Table 1). DRF rats did not show any rhythmicity. Significant differences between AL and DRF groups were detected at 14:00 h, 17:00 h, and 23:00 h, being higher the values from the AL rats. No significant differences in the expression of GABA-T mRNA were detected between the F and DRF group at 11:00 h as well as between the F + R and DRF group at 14:00 h.

### 4. Discussion

**4.1. Liver GABAergic System.** Our data show that under a protocol of daytime restricted feeding (DRF) with the subsequent appearance of the feeding entrained oscillator (FEO) the properties of liver GABA-T are affected and highlight the

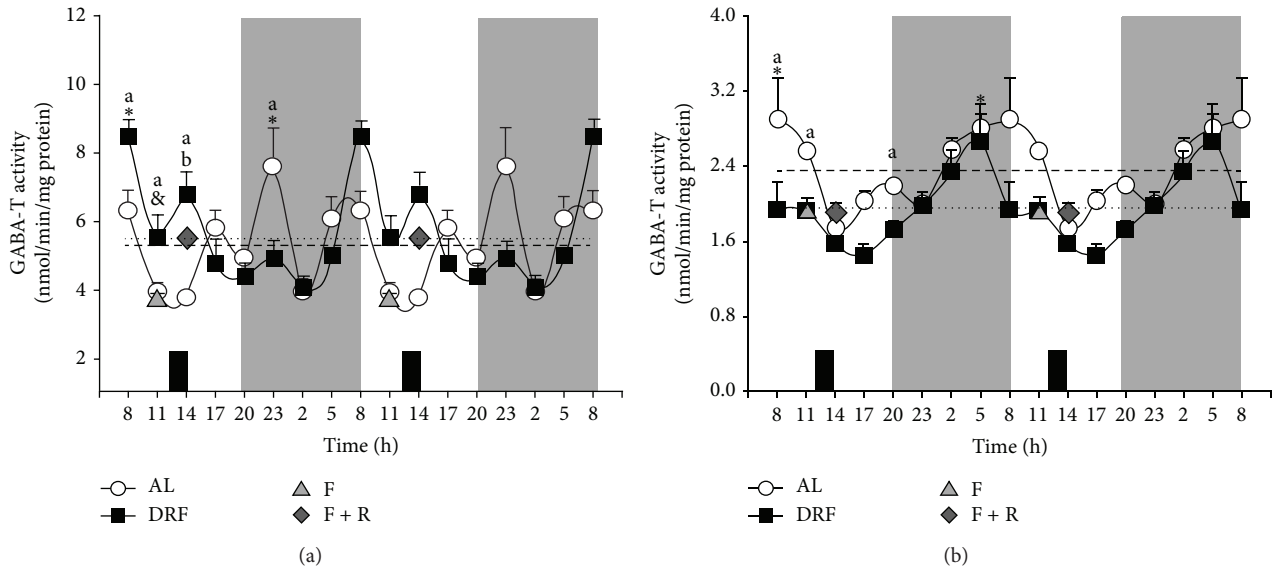


FIGURE 2: Analysis of 24 h profile of GABA-T activity in the liver of AL and DRF rats. GABA-T activity was measured in both the homogenate (a) and mitochondrial fraction (b) of the livers from AL and DRF rats by a spectrophotometric assay over a 24 h period. Rats were subjected to a 12 h : 12 h regime of light : dark. The shaded zone represents the dark phase. Food availability for RFS group is indicated by dark boxes (from 12:00 to 14:00 h). Controls of food condition are shown (F and F + R). Average values are represented as dashed line for AL group and a dotted line for RFS group. Graphs show the mean  $\pm$  SEM of 4 rats per time point. Significant differences ( $P < 0.05$ ) are indicated as follows: \*: DRF versus AL by one-way ANOVA and post hoc Bonferroni test, in both the homogenate and mitochondrial fraction; a: RFS versus AL by two-way ANOVA and post hoc Bonferroni test in the mitochondria fraction only; b: F versus F + R by Student's  $t$ -test.

plasticity of the hepatic GABAergic system under a metabolic challenge.

It is well documented that GABA and its metabolizing enzymes are found outside the nervous system and play a role in the cell signaling of several organs and tissues [25]. These tissues express the anabolic and catabolic enzymes for GABA, and measurable levels of this molecule can be detected [7, 12]. It has also been reported that hepatic tissue expresses elements of the GABAergic system, such as specific receptors (GABAR-A and GABAR-B), transporters, and the catabolic enzyme GABA-T [10]. Hepatocytes and other liver cell types are clearly in contact with GABA, which may be produced by the liver itself or may come from the microbial production of the intestinal tract [13, 25]. In this context, it has been suggested that GABA present in hepatic tissue could act as a regulator of the cell cycle and the migration of cancerous hepatocytes [11, 26]. As a signaling molecule, liver GABA must be finely controlled by plasma membrane transporters but, mainly, by its catabolic transformation by GABA-T [27].

**4.2. Liver GABA Transaminase.** GABA-T is, but not exclusively, a mitochondrial enzyme that requires PLP for its activity. In the liver, it exists as a smaller variant because of proteolytic processing that removes 12–14 amino acids [6]. The pharmacological inhibition of GABA-T has been explored for several years, motivated by attempts to find an effective antiepileptic drug [28]; however, not much information has been reported regarding its transcriptional regulation or the modulation of its activity by covalent modifications.

Our results indicate that liver GABA-T activity, mainly in the mitochondrial fraction, and the level of GABA-T mRNA in AL groups show daily fluctuations. Previously, our group reported that the mitochondrial yield after cellular fractionation did not change by the DRF protocol [17]. The data also show that the DRF protocol affected the properties of hepatic GABA-T at different levels. (1) The elevated levels of this protein enzyme in the liver homogenate and mitochondrial fraction (Figure 1) did not correlate with the corresponding levels of mRNA (Figure 3). A possible explanation is that the restricted feeding schedule promoted an increased stability of GABA-T or an increment in its translational rate. (2) The higher amount in the presence of GABA-T did not correlate with the GABA-T activity measured in liver homogenate and the mitochondrial fraction (Figure 2). This lack of correspondence could be explained by the existence of a negative regulator of GABA-T activity, such as a covalent modification or some other type of posttranslational processing. We have not yet found any reports of phosphorylation, acetylation, methylation, or other modulatory modifications of GABA-T activity. However, these modifications in GABA-T properties promoted by the protocol of DRF/FEO expression can be considered as a metabolic adaptation based on the biochemical plasticity of this enzymatic system.

**4.3. GABA-T under Food Synchronization/Food Entrainable Oscillator.** The changes in the amount and activity of GABA-T associated with the protocol of daytime restricted feeding are part of an extensive set of metabolic and physiological adaptations that occur in the liver and other organs when



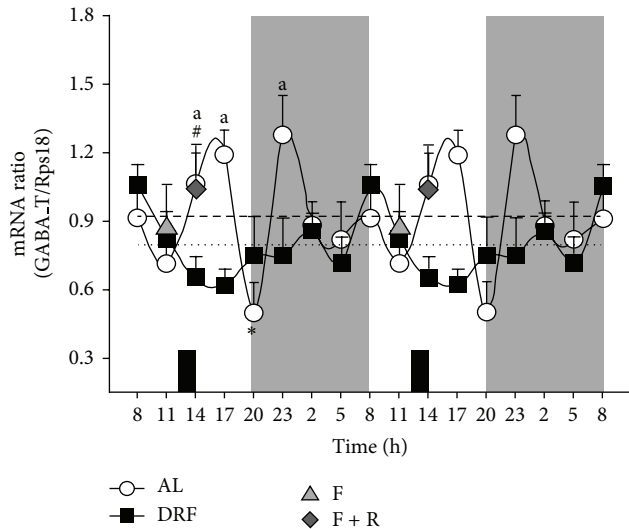


FIGURE 3: Analysis of the 24 h profile of relative mRNA expression of GABA-T in the liver of rats under AL and DRF conditions. Relative mRNA levels were determined by RT-qPCR and normalized to Rps18 expression. The shaded zone represents the dark phase. Food availability for DRF group is indicated by dark boxes (from 12:00 to 14:00 h). Graphs show the mean  $\pm$  SEM of 6 to 8 rats per time point. Average values are represented as a dashed line for the AL group and a dotted line for DRF group. Significant differences ( $P < 0.05$ ) are indicated as follows: \*: DRF versus AL by one-way ANOVA and post hoc Bonferroni test, in both the homogenate and mitochondrial fraction; a: DRF versus AL by two-way ANOVA and post hoc Bonferroni test; #: DRF versus F + R at 14:00, by the Student's *t*-test.

the daily rhythmicity is modified by a new organization of the timing system [29, 30]. The synchronization imposed by offering food for only 2–4 h per day is a powerful timing cue that, in some circumstances, overrules the control of the master pacemaker, the SCN [31]. This situation elicits food anticipatory activity as well as the expression of a biological clock (the FEO) that is independent of the SCN. The anatomical localization of the FEO is unknown, but the hypothesis guiding our research is that it is an emergent oscillator distributed among hypothalamic/midbrain nuclei that control food intake and peripheral organs such as liver, adrenals, stomach, and others important for nutrient processing [15, 32].

It is in the liver where the influence of the FEO is most evident. The liver plays central roles in both the processing of nutrients arriving from the duodenal tract and the modulating of the hunger-satiety cycle [33]. This fact is especially relevant during DRF because of the marked hyperphagia after the 2 h of food access. Indeed, the intense arrival of nutrients during the restricted feeding could be a factor in the daily entrainment showed by the liver [34].

In previous reports, we have shown that DRF/FEO expression strongly modifies the metabolic status of the liver mitochondria, promoting a more oxidized state and increasing the synthesis of ATP [17, 35]. In addition, DRF/FEO expression is associated with an elevation of the malate-aspartate shuttle activity [17]. Together these data indicate

that liver mitochondria are responsive to the adaptations associated with FEO expression, as an example of the plasticity shown by the timing system during the metabolic adaptations associated with restricted feeding schedules. This is of particular interest to the present project since GABA-T is mostly a mitochondrial enzyme.

**4.4. Rheostatic Adaptation.** The exact molecular mechanisms that underlie the adaptive modifications of liver physiology during expression of the FEO and in response to the DRF protocol are not known. However, an initial rationale towards the identification of this sequence of events is to postulate that synchronizing circadian physiology by limited food access has an impact on the reciprocal regulation between energetic metabolic networks and the cellular timing system [36, 37]. During DRF/FEO expression, the connection between the molecular circadian clock and the metabolic activities has been thought to adopt a new relationship that is different from that in the control condition of *ad libitum* feeding. This new interaction has the characteristics of an emergent property, since it is not observed in the *ad libitum* condition or in the control groups of acute fasting and acute fasting followed by refeeding. For example, the increased amount GABA-T protein promoted by the protocol of DRF/FEO expression and detected by Western blot analysis (Figure 1) is unique and is observed neither in the AL group nor in the acute control. The same stands for the augmented GABA-T activity in liver homogenate and the loss of rhythmicity in GABA-T mRNA. Again, all these changes can be considered as part of the plastic adaptations that are present in the liver during the expression of the FEO.

One way to consider the emergence of new properties in biological systems is the concept of rheostasis [38], which is a term used in the theory of physiological control to describe regulation around shifting set points. In contrast to homeostasis, rheostasis triggers associations in situations with potentially adjustable settings [32]. In this context, expression of the FEO could involve a novel rheostatic adaptation in conditions in which two contradictory environmental temporal clues, light-dark cycle and DRF, are coexisting [39].

## 5. Conclusions

Biochemical properties of liver GABA-T were modified by the DRF protocol. An explanation for these findings should consider the coincidence of the FEO expression with a functional light-driven SCN. In addition, GABA-T regulation could be responding to the intense arrival of nutrients during the 2 h of food access, in the context of restricted feeding schedules. The data raise the possibility that alterations in the hepatic GABAergic system could be among the metabolic and physiological adaptations that occur in the liver during expression of the FEO. This possibility needs further exploration.

## Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

## Authors' Contribution

Dalia De Ita-Pérez, Isabel Méndez, and Olivia Vázquez-Martínez contributed equally to this project.

## Acknowledgments

The authors wish to thank Dr. Dorothy Pless for reviewing the English of this paper and L.N. Fernando López Barrera for his help in preparing the figures. This study was supported by CONACyT (project 129–511) and DGAPA (projects IN202412, MDM, and IA200713, IM) from PAPIIT, UNAM, México.

## References

- [1] P. K. Mehta, T. I. Hale, and P. Christen, "Aminotransferases: demonstration of homology and division into evolutionary subgroups," *European Journal of Biochemistry*, vol. 214, no. 2, pp. 549–561, 1993.
- [2] N. Bouché, B. Lacombe, and H. Fromm, "GABA signaling: a conserved and ubiquitous mechanism," *Trends in Cell Biology*, vol. 13, no. 12, pp. 607–610, 2003.
- [3] D. J. Garry, H. D. Coulter, and T. J. McIntee, "Immunoreactive GABA transaminase within the pancreatic islet is localized in mitochondria of the B-cell," *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, vol. 35, no. 8, pp. 831–836, 1987.
- [4] P. Storici, G. Capitani, D. de Biase et al., "Crystal structure of GABA-aminotransferase, a target for antiepileptic drug therapy," *Biochemistry*, vol. 38, no. 27, pp. 8628–8634, 1999.
- [5] P. Storici, D. De Biase, F. Bossa et al., "Structures of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) aminotransferase, a pyridoxal 5 $\prime$ -phosphate, and [2Fe-2S] cluster-containing enzyme, complexed with  $\gamma$ -ethynyl-GABA and with the antiepilepsy drug vigabatrin," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 1, pp. 363–373, 2004.
- [6] Y. Kontani, S. F. Sakata, K. Matsuda, T. Ohyama, K. Sano, and N. Tamaki, "The mature size of rat 4-aminobutyrate aminotransferase is different in liver and brain," *European Journal of Biochemistry*, vol. 264, no. 1, pp. 218–222, 1999.
- [7] I. K. Franklin and C. B. Wollheim, "GABA in the endocrine pancreas: its putative role as an islet cell paracrine-signalling molecule," *Journal of General Physiology*, vol. 123, no. 3, pp. 185–190, 2004.
- [8] A. Gladkevich, J. Korf, V. P. Hakobyan, and K. V. Melkonyan, "The peripheral GABAergic system as a target in endocrine disorders," *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, vol. 124, no. 1-2, pp. 1–8, 2006.
- [9] R. Ertlitzki, Y. Gong, M. Zhang, and G. Minuk, "Identification of  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor subunit types in human and rat liver," *The American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 279, no. 4, pp. G733–G739, 2000.
- [10] G. Y. Minuk, "Gamma-aminobutyric acid and the liver," *Digestive Diseases*, vol. 11, no. 1, pp. 45–54, 1993.
- [11] Y. H. Li, Y. D. Liu, Y. D. Li et al., "GABA stimulates human hepatocellular carcinoma growth through overexpressed GABAA receptor theta subunit," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 18, no. 21, pp. 2704–2711, 2012.
- [12] J. Y. Wu, L. G. Moss, and O. Chude, "Distribution and tissue specificity of 4-aminobutyrate-2-oxoglutarate aminotransferase," *Neurochemical Research*, vol. 3, no. 2, pp. 207–219, 1978.
- [13] R. Dhakal, V. K. Bajpai, and K. H. Baek, "Production of gaba (gamma-Aminobutyric acid) by microorganisms: a review," *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 43, no. 4, pp. 1230–1241, 2012.
- [14] F. K. Stephan, "The "other" circadian system: food as a zeitgeber," *Journal of Biological Rhythms*, vol. 17, no. 4, pp. 284–292, 2002.
- [15] B. T. S. Carneiro and J. F. Araujo, "The food-entrainable oscillator: a network of interconnected brain structures entrained by humoral signals?" *Chronobiology International*, vol. 26, no. 7, pp. 1273–1289, 2009.
- [16] R. E. Mistlberger, "Neurobiology of food anticipatory circadian rhythms," *Physiology and Behavior*, vol. 104, no. 4, pp. 535–545, 2011.
- [17] A. Báez-Ruiz, C. Escobar, R. Aguilar-Roblero, O. Vázquez-Martínez, and M. Díaz-Muñoz, "Metabolic adaptations of liver mitochondria during restricted feeding schedules," *The American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 289, no. 6, pp. G1015–G1023, 2005.
- [18] C. Molina-Aguilar, J. Pérez-Sánchez, O. Vázquez-Martínez, J. Rivera-Zavala, and M. Díaz-Muñoz, "Restricted food access during the daytime modifies the 24-h rhythmicity of apoptosis and cellular duplication in rat liver," *Biological Rhythm Research*, vol. 43, no. 1, pp. 25–37, 2012.
- [19] F. Portaluppi, Y. Touitou, and M. H. Smolensky, "Ethical and methodological standards for laboratory and medical biological rhythm research," *Chronobiology International*, vol. 25, no. 6, pp. 999–1016, 2008.
- [20] M. Ángeles-Castellanos, J. Mendoza, M. Díaz-Muñoz, and C. Escobar, "Food entrainment modifies the c-Fos expression pattern in brain stem nuclei of rats," *The American Journal of Physiology: Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, vol. 288, no. 3, pp. R678–R684, 2005.
- [21] I. Aguilar-Delfín, F. López-Barrera, and R. Hernández-Muñoz, "Selective enhancement of lipid peroxidation in plasma membrane in two experimental models of liver regeneration: partial hepatectomy and acute CC14administration," *Hepatology*, vol. 24, no. 3, pp. 657–662, 1996.
- [22] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding," *Analytical Biochemistry*, vol. 72, no. 1-2, pp. 248–254, 1976.
- [23] M. J. Jung, B. Lippert, and B. W. Metcalf, "The effect of 4 amino hex 5 ynoic acid ( $\gamma$  acetylenic GABA,  $\gamma$  ethynyl GABA) a catalytic inhibitor of GABA transaminase, on brain GABA metabolism in vivo," *Journal of Neurochemistry*, vol. 28, no. 4, pp. 717–723, 1977.
- [24] P. Zuther, S. Gorbey, and B. Lemmer, "Chronos-Fit v 1.06," 2009, <http://www.ma.uni-heidelberg.de/inst/phar/lehre/chrono.html>.
- [25] B. E. Faulkner-Jones, D. S. Cram, J. Kun, and L. C. Harrison, "Localization and quantitation of expression of two glutamate decarboxylase genes in pancreatic  $\beta$ -cells and other peripheral tissues of mouse and rat," *Endocrinology*, vol. 133, no. 6, pp. 2962–2972, 1993.
- [26] C. Lodewyckx, J. Rodriguez, J. Yan et al., "GABA-B receptor activation inhibits the in vitro migration of malignant hepatocytes," *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 89, no. 6, pp. 393–400, 2011.
- [27] Y. Zhou, S. Holmseth, C. Guo et al., "Deletion of the gamma-aminobutyric acid transporter 2 (GAT2 and SLC6A13) gene

- in mice leads to changes in liver and brain taurine contents,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 42, pp. 35733–35746, 2012.
- [28] D. M. Treiman, “GABAergic mechanisms in epilepsy,” *Epilepsia*, vol. 42, 3, pp. 8–12, 2001.
- [29] C. Dibner, U. Schibler, and U. Albrecht, “The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks,” *Annual Review of Physiology*, vol. 72, pp. 517–549, 2009.
- [30] I. Schmutz, U. Albrecht, and J. A. Ripperger, “The role of clock genes and rhythmicity in the liver,” *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 349, no. 1, pp. 38–44, 2012.
- [31] C. A. Feillet, U. Albrecht, and E. Challet, “Feeding time for the brain: a matter of clocks,” *Journal of Physiology Paris*, vol. 100, no. 5–6, pp. 252–260, 2006.
- [32] R. Aguilar-roblero and M. Díaz-muñoz, “Chronostatic adaptations in the liver to restricted feeding: the FEO as an emergent oscillator,” *Sleep and Biological Rhythms*, vol. 8, no. 1, pp. 9–17, 2010.
- [33] P. Magni, E. Dozio, M. Ruscica et al., “Feeding behavior in mammals including humans,” *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1163, pp. 221–232, 2009.
- [34] J. Mendoza, “Circadian clocks: setting time by food,” *Journal of Neuroendocrinology*, vol. 19, no. 2, pp. 127–137, 2007.
- [35] M. Díaz-Muñoz, O. Vázquez-Martínez, R. Aguilar-Roblero, and C. Escobar, “Anticipatory changes in liver metabolism and entrainment of insulin, glucagon, and corticosterone in food-restricted rats,” *The American Journal of Physiology: Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, vol. 279, no. 6, pp. R2048–R2056, 2000.
- [36] R. Buijs, R. Salgado, E. Sabath, and C. Escobar, “Peripheral circadian oscillators: time and food,” *Progress in Molecular Biology and Translational Sciences*, vol. 119, pp. 83–103, 2013.
- [37] U. Albrecht, “Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks,” *Neuron*, vol. 74, no. 2, pp. 246–260, 2012.
- [38] N. Mrosovsky, *Rheostasis: the Physiology of Change*, Oxford University Press, 1990.
- [39] B. Kornmann, O. Schaad, H. Bujard, J. S. Takahashi, and U. Schibler, “System-driven and oscillator-dependent circadian transcription in mice with a conditionally active liver clock,” *PLoS Biology*, vol. 5, no. 2, article e34, 2007.

ORIGINAL ARTICLE

## Molecular and biochemical modifications of liver glutamine synthetase elicited by daytime restricted feeding

Olivia Vázquez-Martínez<sup>1</sup>, Dalia De Ita-Pérez<sup>1</sup>, Marlen Valdés-Fuentes<sup>1</sup>, Alejandra Flores-Vidrio<sup>1</sup>, Gabriela Vera-Rivera<sup>2</sup>, María I. Miranda<sup>2</sup>, Isabel Méndez<sup>1</sup> and Mauricio Díaz-Muñoz<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Cellular and Molecular Neurobiology, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Querétaro, Mexico

<sup>2</sup> Department of Behavioral and Cognitive Neurobiology, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Querétaro, Mexico

### Keywords

allosteric regulation – daytime restricted feeding – food entrained oscillator – nitrogen metabolism

### Correspondence

Isabel Méndez, Department of Cellular and Molecular Neurobiology, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Campus UNAM-Juriquilla, Blvd. Juriquilla 3001, 76230, Querétaro, Qro. Mexico  
Tel/Fax: (52-442) 238-1035  
e-mail: isabelcm@unam.mx

Received 21 July 2013

Accepted 16 November 2013

DOI:10.1111/liv.12412

### Abstract

**Background & Aims:** The circadian clock system in the liver plays important roles in regulating metabolism and energy homeostasis. Restricted feeding schedules (RFS) become an entraining stimulus that promotes adaptations that form part of an alternative circadian clock known as the food entrained oscillator (FEO). The aim of this study was to evaluate the daily variations of glutamine synthetase (GS) in liver under a daytime RFS. **Methods:** Hepatic GS properties were analysed at 3-h intervals over a 24-h period in adult male Wistar rats maintained in a 12:12 h light–dark cycle. RFS group: food access for 2-h in light phase, during 3 weeks. AL group: feeding *ad libitum*. Fa group: acute fast (21 h). Fa–Re group: acute fast followed by refeed 2 h. mRNA expression was measured by RT-qPCR, protein presence by Western-blot and immunohistochemistry, enzyme activity by a spectrophotometric assay, and glutamine by high pressure liquid chromatography. **Results and Conclusions:** Restricted feeding schedule induced circadian rhythmicity in mRNA levels of GS and the loss of the rhythmic pattern in mitochondrial GS activity. GS activity in liver homogenates displayed a robust rhythmic pattern in AL that was not modified by RFS. The presence of GS and its zonal distribution did not show rhythmic pattern in both groups. However, acute Fa and Fa–Re diminished GS protein and activity in liver homogenates. Hepatic glutamine concentrations showed a 24-h rhythmic pattern in both groups, in an antiphasic pattern. In conclusion, daytime RFS influences the liver GS system at different levels, that could be part of rheostatic adaptations associated to the FEO, and highlight the plasticity of this system.

In the liver, glutamine synthetase (GS) (EC 6.3.1.2) is a mostly cytoplasmic enzyme that catalyses the formation of glutamine from glutamate and ammonia in an ATP-dependent reaction (1). Glutamine is in equilibrium with glutamate responding to the activities of GS and glutaminase, and in function of the roles played by the glutamate in the liver, such as anaplerotic intermediate and cellular communication acting as a signalling molecule (2). GS is a homo-oligomeric and allosteric protein formed by eight subunits (~44 kDa) that is activated by  $\alpha$ -ketoglutarate and inhibited by several amino acids (glycine, alanine, glutamine) as well as by carbamyl phosphate (1, 3). In mammals, one functional copy of the gene is present per haploid genome; it is transcriptionally regulated by glucocorticosteroids in rats (4) and generates two different transcripts that differ in the length of their 3'-untranslated region (5).

Glutamine synthetase plays a central role in nitrogen metabolism in the liver, complementing the activity of the urea cycle in the hepatic handling of ammonia (6). GS shows a marked zonal distribution in the liver, being enriched in the hepatocytes surrounding the central vein (7), that is dependent on the Wnt pathway via beta-catenin signalling (8). In contrast, most of the urea cycle occurs in periportal hepatocytes.

Hepatic GS activity is responsive to the feeding condition, since 1–5 days of fasting produced a decrease in the enzyme activity in rats, followed by a recovery to initial levels on day 7 (9), unlike skeletal muscle where GS activity increases (10). In a protocol of protein-free meal, low GS activity recovered to normal levels after 1 month of refeeding with the standard diet, suggesting a slower adaptation of GS to new metabolic conditions in comparison with other enzymes, such as alanine aminotransferase or aspartate aminotransferase (11).



Several physiological processes are under circadian control, which implies the action of complex clock machinery that involves regulation of gene expression, post-transcriptional modifications and enzymatic activity (12, 13). Circadian rhythms are endogenous daily fluctuations in molecular, biochemical, physiological and behavioural parameters. Their oscillations show a period of ~24 h, and are reset and synchronized (entrained) mainly by the light–dark cycle associated to the day–night succession, but also for non-photic signals (cues) such as cyclic food availability (14). Restricted feeding schedules (RFS) is an experimental protocol used in several species to study the adaptation of the circadian system to a mealtime schedule, out of phase of the rhythmicity imposed by the light-driven pacemaker, the suprachiasmatic nucleus (SCN) (15). RFS consists in food access to a period of 2–4 h daily for consecutive days which promotes a set of notable changes in molecular, biochemical, physiological and behavioural activities, such as the food anticipatory activity, that have been associated with the expression of a circadian oscillator, which is independent of the SCN and is known as the food entrained oscillator (FEO) (16, 17).

Furthermore, RFS promotes significant modifications in parameters related to liver metabolic activity and histological characteristics such as: increased oxidized redox state and energy charge (18), enhanced mitochondrial synthesis of ATP (19), reduced glycogen mobilization, increased fatty acid oxidation and changes in the dimensions of hepatocytes (20), and augmentation of peroxisomal markers (21). In addition, RFS affected the rhythmicity of urea formation in a very significant way: it promoted high levels of urea preceding food access, which decreased rapidly to very low levels in response to mealtime; some hours later, the circulating urea rose gradually until reaching a prominent peak just before the onset of feeding (22). Therefore, RFS affects the biochemical status of the liver, including energetic activity and nitrogen metabolism (23).

In the present study, we further explored the adaptations that occur in hepatic nitrogen handling by characterizing molecular, biochemical and histological properties of the GS in rats under a daytime RFS protocol. Additionally, as a feeding control condition and to eliminate the possibility that responses to RFS were due to 22 h food deprivation or fasting–refeeding conditions, we compared RFS with acute fasting (Fa) and fasting/refed (Fa–Re) rats that, unlike restricted feeding rats, do not express the FEO.

## Materials and methods

### Animals and housing

Adult male Wistar rats weighing  $200 \pm 20$  g at the beginning of the experiments were maintained in constant conditions of 12:12 h light–dark cycles (lights on

at 08:00 hours), and constant temperature ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Rats were kept in groups of four in transparent acrylic cages ( $40 \times 50 \times 20$  cm) with free access to water and balanced Purina Chow meal except during food restriction (RFS), fasting (Fa) or fasting–refeeding (Fa–Re) conditions. Illumination was provided by 40 W fluorescent bulbs, 120 lux at the cage lid. All experimental procedures were approved by the Bioethics Committee of the Instituto de Neurobiología from the Universidad Nacional Autónoma de México and conformed with international ethical standards previously recommended (24).

### Experimental design

Control and experimental groups were similar to those reported previously by our group (21). Briefly, rats were randomly assigned to four groups: (i) Rats fed *ad libitum* (AL) for 3 weeks; (ii) Rats exposed to a daily RFS with access to food only between 12:00 and 14:00 hours for 3 weeks; (iii) Rats fasted for 21 h (Fa) and (iv) Rats that were fasted 22 h and refed for 2 h (Fa–Re) (from 12:00 to 14:00 hours). At the end of the third week, rats from the AL and RFS groups were sacrificed by a guillotine at 3-h intervals to complete a 24-h day–night cycle (08:00, 11:00, 14:00, 17:00, 20:00, 23:00, 02:00 and 05:00 hours). The 21-h Fa and the Fa–Re groups were sacrificed at 11:00 and 14:00 hours, respectively. These groups were used as feeding condition controls for the RFS groups corresponding to 11:00 hours (before food access and during food anticipatory activity) and 14:00 hours (after feeding), respectively. Immediately after sacrifice, livers were obtained and processed to homogenize or to be frozen in dry ice and kept at  $-80^\circ\text{C}$  until analysis.

### Subcellular fractionation

A sample of 2 g of the liver was homogenized in 15 ml of homogenization buffer (10 mM Tris–HCl, pH 7.4, 225 mM sucrose, 0.2% BSA, 0.3 M EGTA). An aliquot of liver homogenate was kept at  $-80^\circ\text{C}$ , and the rest was processed by fractionation, as previously reported (25). Briefly, the homogenate was centrifuged at 1500g for 15 min, the supernatant was centrifuged at 10,000g for 15 min to sediment the mitochondrial fraction, which was resuspended in homogenization buffer and kept at  $-80^\circ\text{C}$ . All centrifugations were performed at  $4^\circ\text{C}$ .

### RT-qPCR amplifications

Glutamine synthetase gene expression was evaluated by isolating total RNA from liver tissues (20–30 mg) using the SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA). The amount and quality of RNA were estimated spectrophotometrically at 260 and 280 nm, and a constant amount of RNA (2  $\mu\text{g}$ ) was reverse transcribed using SuperScript™ III Reverse Transcriptase, Oligo (dT)<sub>12-18</sub> Primer, RNaseOUT™ recombinant ribonucle-

ase inhibitor and dNTP Set PCR Grade (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Amplification was performed in triplicate in the CFX96™ real-time PCR detection system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Primers used for qPCR amplifications were synthesized by Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA), and the corresponding sequences were: for GS, forward 5'-GACCCTATTACT GCGGTGTGG-3', reverse 5'-TAAAGTTGGTGTGGCA GCCTG-3' and for ribosomal protein S18 (Rps18) used as housekeeping gene, forward 5'-TTCAGCACATCC TGCGAGTA-3', reverse 5'-TTGGTGAGGTCATGTC TGC-3'. Amplifications were carried out with Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) in a 10 µl final reaction volume containing cDNA (1/100) and 0.5 µM of each of the primer pairs in SYBR Green Master Mix, according to the following protocol: activation of Taq DNA polymerase and DNA denaturation at 95°C for 10 min, followed by 40 amplification cycles consisting of 10 s at 95°C, 30 s at 62°C and 30 s at 72°C. The PCR data were analysed by the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method, and cycle thresholds ( $C_T$ ) normalized to the housekeeping gene Rps18 was used to calculate the mRNA levels of GS.

#### Western-blot analysis

Liver homogenates and mitochondrial fractions were subjected to denaturing SDS-PAGE under reducing conditions. Total protein concentrations were determined by the Bradford method, and equal amounts (40 µg) were separated by 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and blocked for 1 h in TBST buffer (20 mM Tris, pH 7.5, 500 mM NaCl, 0.5% Tween 20) containing 5% non-fat milk. Membranes were then washed and incubated overnight at 4°C in the presence of mouse anti-GS antibody (clone GS-6, MAB302; Millipore, Billerica, MA, USA) diluted 1/1000 in TBST. As controls, in the case of homogenate, membranes were incubated in the presence of mouse anti-tubulin antibody (ab56676; Abcam, Cambridge, UK) diluted 1/1000, or in the case of mitochondrial fractions in the presence of rabbit anti-VDAC1/Porin antibody (ab15895; Abcam) diluted 1/1000. After washing, membranes were incubated with secondary antibodies conjugated to alkaline phosphatase (1/5000). Bands were revealed using the AP conjugate substrate kit (Bio-Rad). Densitometric analysis was performed using the Image Lab Software (v 3.0; Bio-Rad).

#### Immunohistochemical staining

Liver tissues were fixed and dehydrated for paraffin embedding. Briefly, the obtained liver tissue was fixed for 1 week in 10% formalin at 4°C, with formalin changes every 2 days. After fixation, the tissue was embedded in paraffin and sectioned in 7 µm slices. Liver sections were deparaffinized for 2 h at 60°C in a dry heat oven, then rehydrated in a series of solvents: Xylol 100% (10 min),

ethanol 100% (5 min), ethanol 96% (5 min), ethanol 80% (5 min) and deionized water (10 min), and then bathed in permeabilization buffer (3.9 mM sodium citrate, 0.1% Tween 20) for 8 min followed by a 60 s incubation in boiling sodium citrate buffer (10 mM citric acid, 0.05% Tween 20, pH 6.0). The sections were then blocked with 5% non-fat milk for 1 h. After three washes with 0.05% TBST, sections were incubated overnight at 4°C with anti-GS antibody diluted 1/300. Afterwards, sections were washed three times with 0.05% TBST and incubated for 2 h with Alexa Fluor®-488 secondary antibody (Invitrogen) diluted 1/400. The fluorescence was visualized using microscopy (Microscope Olympus CX31, Center Valley, PA, USA) and quantified by the image analysis system Image-Pro Plus 6.0 software.

#### Glutamine synthetase activity

Glutamine synthetase activity was measured in both, liver homogenate and mitochondrial fraction by measuring NADH oxidation in a coupled-enzymatic reaction according to the procedure reported by Kingdon (26). Briefly, the ATP consumed during the glutamine synthesis from glutamate and  $\text{NH}_4^+$  is regenerated by including pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate in the incubations; the resulting pyruvate is reduced to lactate by added lactate dehydrogenase. This step is coupled to the oxidation of NADH, which is recorded spectrophotometrically at 340 nm. The GS activity was assayed in a final volume of 3 ml using 0.2 mg of total homogenate protein or 0.5 mg of total mitochondrial protein. The reaction was followed for 3 min (to ensure linearity), and the results were expressed as µmol/min/mg using a value of 6.22 as the mM extinction coefficient for  $\beta$ -NADH at 340 nm.

#### Measurement of hepatic glutamine by high pressure liquid chromatography

Glutamine concentrations within the liver were assayed by high pressure liquid chromatography (HPLC) using OPA/sulphite derivatization (stock OPA/sulphite solution, 20 mM OPA in 1 M sodium sulphite and 0.1 M sodium tetraborate, pH 9.3; working OPA/sulphite solution, 1/3 stock solution) and recorded by electrochemical detection. The liver samples were homogenized 1:5 (w/v) in 0.1 M perchloric acid containing 0.2 mM EDTA. The HPLC system consisted of a delivery pump (Solvent Delivery System PM-80; Bioanalytical Systems, Inc., West Lafayette, IN, USA), a simple injector (BASi Liquid Chromatography CC-SE, 20 µl loop; Bioanalytical Systems, Inc.), a C18 reverse phase column (BASi ODS C18, 100 × 3 mm, 3 µm particle size; Bioanalytical Systems, Inc.) and an electrochemical detector (Epsilon; Bioanalytical Systems, Inc.) with a carbon electrode; potential was adjusted to +700 mV vs. the reference electrode (Ag/AgCl). Glutamine concentrations were determined from peak areas using an external standard of L-Glutamine (Sigma-Aldrich Co.). The mobile phase contained 0.1 M

dibasic sodium phosphate pH 5.3, 20% methanol (v/v). The flow rate was maintained at 0.6 ml/min at a pressure of 2400 psi. All chromatograms were recorded and analysed using the ChromGraph Report software 2.3 (Bioanalytical Systems, Inc.). The protein concentration in each liver homogenate was determined to normalize the data and the results are expressed as  $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$  protein.

### Statistical analysis

Results are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). All data were replicated in two independent experiments and with three or four rats for each sampling time. The statistical analyses were performed using Sigma Stat software (v 3.5; Systat Software Inc., Richmond, CA, USA) and GraphPad Prism Software (v 5.0; GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Normality distribution was determined by the Kolmogorov–Smirnov test. The data showed a parametric distribution or equal variances; therefore, statistical differences between different points in the time curves were determined by one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc comparison test. All pairwise multiple comparisons were performed by the Student's *t*-test. Differences among groups were considered statistically significant at  $P \leq 0.05$ . Rhythm analyses were performed by CHRONOS-FIT (v 1.06; (27)) and COSANA (v 3.1 developed by AA Benedito-Silva, GMDRB, ICB/USP, Brazil).

### Parameters of circadian rhythmicity

A given oscillation is defined by the next parameters (see Fig. 1): period, the time elapsed for one complete cycle; phase, each instantaneous state of an oscillation; acrophase, the time in which the peak of the rhythm occurs; MESOR (midline estimating statistic of rhythm), the average value around which the variable oscillates; amplitude, the difference between the peak and the mean value of a cycle.

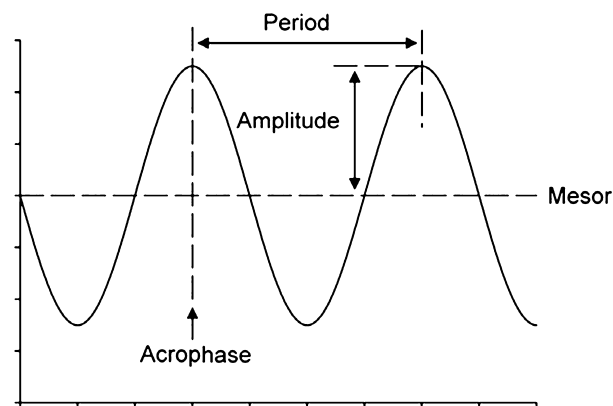
### Calculations for daily fluctuations

For chronobiological analysis, first, a one-way ANOVA was performed in each group and then a 24-h period single-cosinor method was used as previously described (29). For rhythmic interpretation of the results, the following parameters were considered: acrophase, MESOR, amplitude and rhythmicity, which correspond to a *P* value ( $<0.01$ ) of an *F* test of fitting the original results to an expected sinusoidal curve with a 24-h period.

## Results

### Effect of time-restricted feeding on mRNA expression of hepatic glutamine synthetase

Starvation for 24 h has been reported to result in a decrease in GS mRNA (4), while prolonged starvation

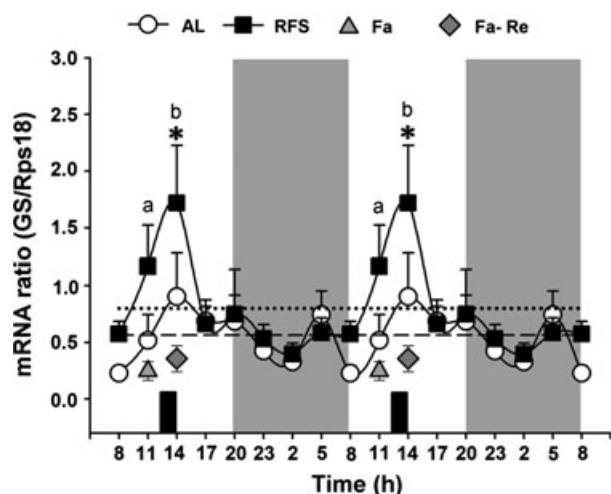


**Fig. 1.** Demonstrative oscillatory trace depicting the principal chronobiological parameters: period, acrophase, amplitude and MESOR. For details, see corresponding section in Methods. Taken from Refinetti (28).

(72 h) induces absence of mRNA expression in pericentral hepatocytes (30). Since restricting food availability during daytime can regulate oscillations at the transcript level in the liver, we evaluated whether RFS modified the mRNA expression of GS by measuring it over a 24-h period by RT-qPCR. Our analysis showed that liver mRNA expression of GS from AL rats did not change over the 24 h, and neither the Fa group nor the Fa–Re group showed modified expression levels compared with the AL group (Fig. 2). In rats under RFS, hepatic mRNA expression of GS displayed a circadian variation ( $P < 0.05$  14:00 hours vs. 2:00 hours by one-way ANOVA) (Table 1). As determined by Cosinor analysis, acrophase appeared at 13:53 hours, in coincidence with the end of the mealtime. However, the MESOR was not significant different comparing the RFS to the AL group (Table 1). Controls of food condition, both acute Fa and acute Fa with a subsequent refeeding for 2 h (Fa–Re), showed mRNA expression levels significantly lower ( $\sim 80\%$ ) than RFS and not different from AL at 11:00 and 14:00 hours, respectively (Fig. 2). These results indicate that daytime RFS induced changes in GS at the molecular level that are not observed in acute Fa or Fa–Re conditions.

### Presence of hepatic glutamine synthetase protein under the time-restricted feeding protocol

Glutamine synthetase in mammalian liver is generally considered to be a cytosolic enzyme which is mostly bound to the outer membrane of endoplasmic reticulum and Golgi complex (1). It has been reported that GS is also found in mitochondrial fraction. To investigate if RFS influenced the amount of GS protein, the presence of GS (Fig. 3) was studied in liver homogenates (panel A) and the mitochondrial fraction (panel B) by Western-blot analysis. A specific band of  $\sim 44$  kDa corresponding to GS was detected in all cases. As determined by densitometry (Fig. 3, lower panels), the levels



**Fig. 2.** Analysis of 24-h profile of relative mRNA expression of GS in the liver of rats under *ad libitum* (AL) and restricted feeding schedules (RFS) conditions. mRNA levels over a 24-h period are shown in a double plot. The shaded zone represents the dark phase. Livers from AL and RFS rats were collected at 3-h intervals over a 24-h period, and from controls of feeding condition Fa at 11:00 hours and Fa-Re at 14:00 hours. Food availability for the RFS group is indicated by dark boxes (from 12:00 to 14:00 hours). Relative mRNA levels were determined by RT-qPCR and normalized to Rps18 expression. Graphs represent the mean  $\pm$  SEM of six to eight rats per time point. MESOR values are represented as a dashed line for AL group and dotted line for RFS group. \* $P < 0.05$  vs. 02:00 hours by one-way ANOVA and post hoc Bonferroni test,  $a = P < 0.05$  vs. Fa and  $b = P < 0.05$  vs. Re-Fa by the Student's *t*-test.

of hepatic GS in both homogenate and mitochondrial fraction of RFS were not significantly different from the AL group over a 24-h period in terms of rhythmicity and mesor (Table 1). GS abundance in liver homogenate in the control groups of feeding condition, Fa and Fa-Re, was reduced (~70%) in comparison with AL and RFS at 11:00 hours and RFS at 14:00 hours, respectively (panel A). Fa-Re group was not different from AL at 14:00 hours (panel A). In the mitochondrial fraction, GS was not altered by the acute Fa or Fa-Re condition. Hence, in the liver homogenate where GS is enriched, the amount of GS protein diminished in the acute Fa and

Fa-Re conditions, but it is maintained during daytime RFS (Fig. 3).

#### Presence of glutamine synthetase protein in pericentral hepatocytes under the time-restricted feeding protocol

Different metabolic pathways are carried out in hepatocytes according to their position within the hepatic parenchyma and related to the vascular architecture of the liver, known as hepatic zonation. In particular, GS is expressed only in a subpopulation of hepatocytes surrounding the central veins. Starvation for 3 days was reported to reduce the GS-positive zone, while a 10 consecutive repetitions of a 48-h starvation /24-h refeeding protocol resulted in expansion of the expression from the pericentral to the middle zone (31). To assess if RFS could modify the signal intensity of GS within the hepatic parenchyma, we evaluated the protein by immunofluorescence staining in rats under RFS at two critical times, before and after food access when the highest GS mRNA expression was observed (11:00 and 14:00 hours, respectively), as well as at a time during the dark phase (02:00 hours). Fluorescent signal appeared over the cytoplasm, in a particulate pattern and was restricted to one to three rows of hepatocytes surrounding the central veins (Fig. 4, panel A). The main signal was in the first layer, with no interruption in the continuity of the lane. Quantification of positive cells (Fig. 4, panel B) and fluorescence intensity (Fig. 4, panel C), as well as in a panoramic view at 2 $\times$  magnification (Fig. 4, panel D), did not show significant differences among groups or related to the time. These observations indicate that GS zonation in the liver is not influenced by RFS, neither in the amount of GS protein nor in the number of cells of expressing it.

#### Effect of time-restricted feeding on hepatic glutamine synthetase activity

Besides the mRNA expression and protein presence, enzymes are also regulated at the level of activity; specifically, GS activity is allosterically modulated by divalent cations and some aminoacids (3). In addition,

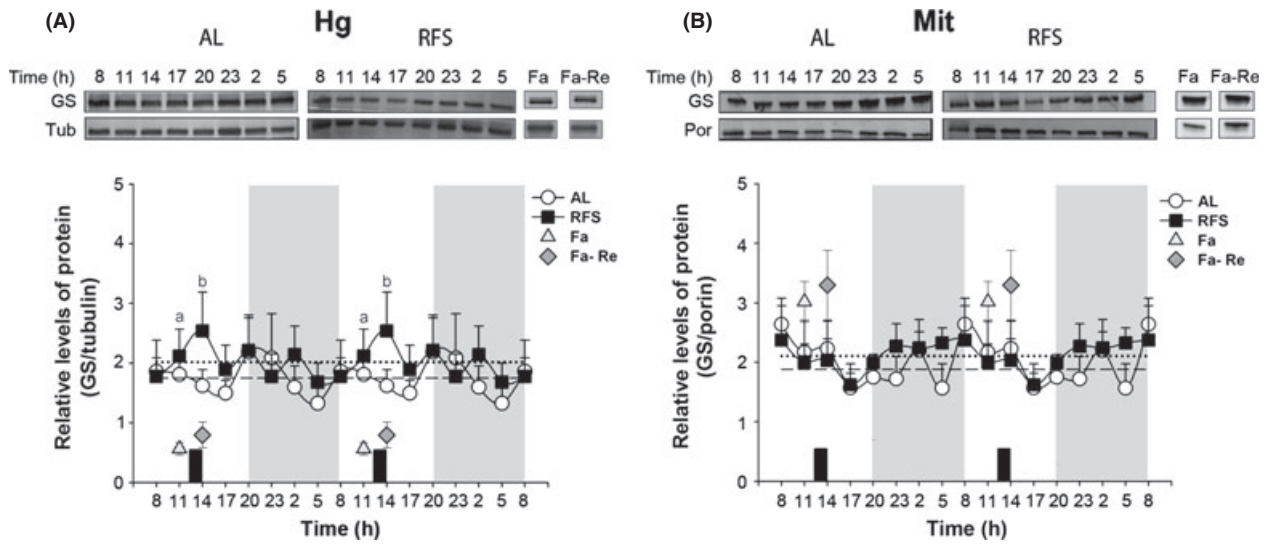
**Table 1.** Chronobiological analysis of liver GS-related parameters: mRNA, protein, and activity and hepatic glutamate concentration

	GS mRNA		GS protein		GS activity				Glutamine	
					Hg		Mit			
	AL	RFS	AL	RFS	AL	RFS	AL	RFS	AL	RFS
Rhythm (%) by cosinor	–	16.4	–	–	68.3	72.7	33.6	–	63.8	56.6
Mesor	0.56	0.79	1.74	2.01	93.11	83.03	<b>52.95</b>	<b>103.50*</b>	6.73	7.19
Amplitude	–	0.45	–	–	60.75	43.2	13.56	–	1.31	1.92
Acrophase (hours:min)	–	13:53	–	–	12:14	11:48	16:07	–	<b>11:56</b>	<b>23:34</b>

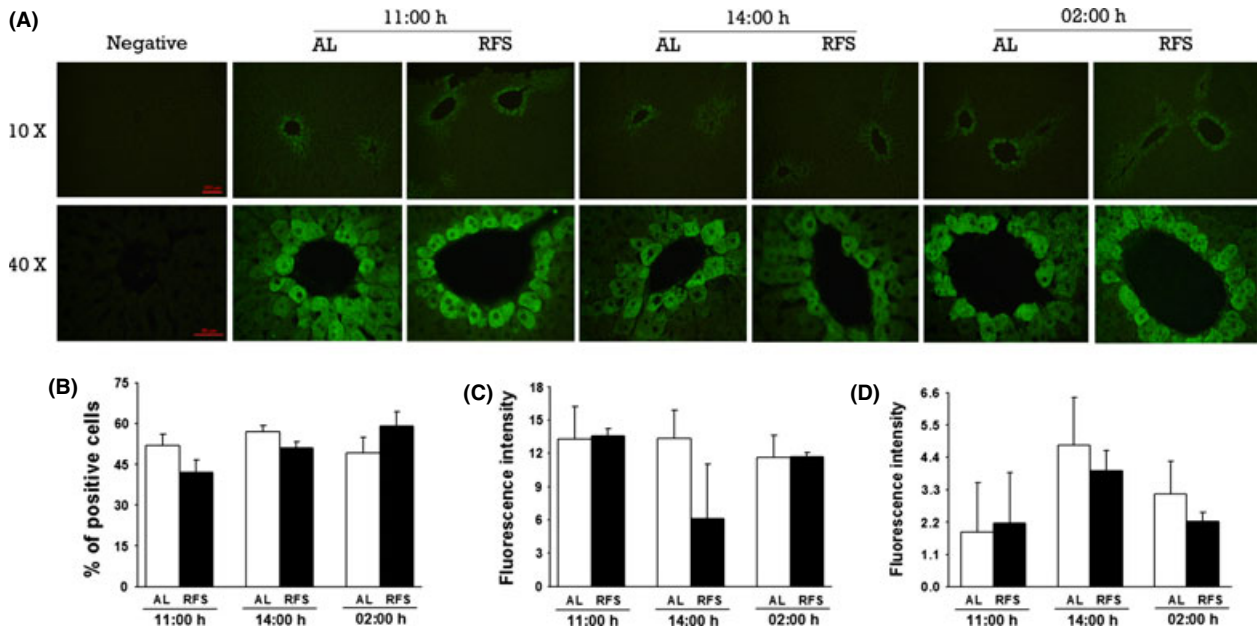
CHRONOS-FIT analysis was performed to evaluate the 24-h rhythmicity of different parameters in liver. Bold characters represent significative changes between AL and RFS groups. Hg, homogenate; Mit, mitochondrial fraction.

\* $P < 0.05$  vs. AL in the same parameter by the Student's *t*-test.





**Fig. 3.** Western-blot analysis of the 24-h profile of GS in liver of RFS and AL rats. Representative images of liver homogenates (Hg) (upper panel A) and the mitochondrial fraction (Mit) (upper panel B) loaded onto 10% SDS-polyacrylamide gels, electrophoresed and transferred to nitrocellulose membranes. Tubulin and VDAC1/porin were used as loading controls for the homogenates and mitochondrial fraction, respectively. Densitometry of the bands over the 24-h period is shown in the graphs for the homogenates (panel A) and mitochondrial fractions (panel B) from the AL, RFS, and the food condition control groups, Fa and Fa-Re. Food availability for the RFS group is indicated by dark boxes (from 12:00 to 14:00 hours). MESOR values are represented as a dashed line for the AL group and as a dotted line for the RFS group. Graphs represent the mean  $\pm$  SEM of seven to eight rats per time point. a =  $P < 0.05$  vs. Fa and b =  $P < 0.05$  vs. Fa-Re by Student's *t*-test.



**Fig. 4.** Immunohistochemical localization of GS in hepatocytes surrounding the central lobular vein in rats under AL and RFS conditions. (A) Representative images of rat liver lobules of AL and RFS rats at 11:00, 14:00 and 02:00 hours visualized under fluorescent microscopy at two magnifications: 10 $\times$  and 40 $\times$ . Negative staining controls are shown. Quantifications in terms of percent positive hepatocytes and signal intensity are represented in the graphs (panels B and C, respectively). In a panoramic view (2 $\times$ ) fluorescence intensity was quantified (panel D). Two slides per rat and three rats per time were analysed. Bars represent the mean  $\pm$  SEM. Differences were not significant as analysed by the Student's *t*-test.

calorie restriction has been shown to reduce the activity of the hepatic GS (32). Therefore, to investigate whether daytime RFS modified the activity of hepatic GS, this parameter was measured over a 24-h period. Since GS is considered as a cytosolic enzyme in mammalian liver because mostly is bound to the outer membranes of diverse organelles (80% in microsomes), we evaluate enzymatic activity in liver homogenate and in mitochondrial fraction.

In liver homogenate, AL and RFS groups displayed a strong rhythmicity in GS activity, with a daytime peak (acrophase) at ~12:00 hours (Table 1) followed by a significant decline towards the beginning of the dark phase (Fig. 5, panel A). Both groups showed an overall comparable GS activity (similar mesor) (Table 1). The Fa group (control of food condition) had significantly lower GS activity (~60%) than AL and was not different from RFS at the same time; however, the liver GS activity in Fa-Re was significantly lower than both RFS and AL at 14:00 hours (Fig. 5, panel A).

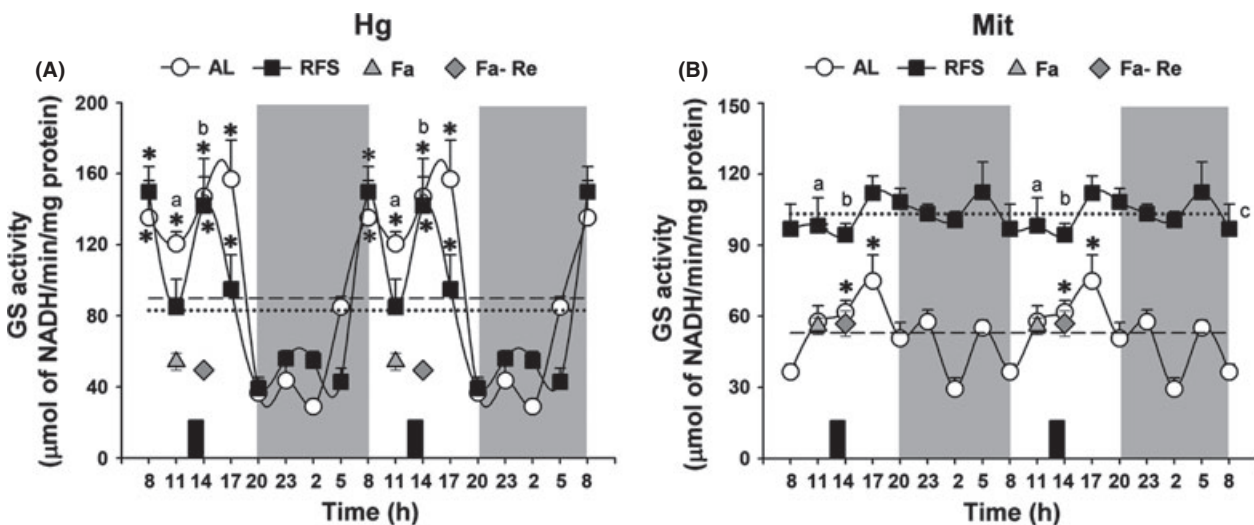
Glutamine synthetase activity in the mitochondrial fraction displayed significant differences between AL and RFS groups. The AL group showed 24-h rhythmicity, and according to cosinor analysis, the acrophase was at 16:09 hours, while daytime RFS led to constitutively elevated activity and the absence of a rhythmic pattern (Table 1). A significant increase (~2-fold) in the mitochondrial GS activity in the RFS group compared with AL group was observed over the entire period of 24 h (Fig. 5, panel B). GS activity in controls of food condition (Fa and Fa-Re) was lower (~60%) than in the RFS

groups at 11:00 and 14:00 hours, respectively, and did not differ from the AL group (Fig. 5, panel B). These results suggest that RFS reprograms the GS activity, depending on the source of the enzyme, promoting significant changes related its regulation and rhythmicity.

#### Effect of time-restricted feeding on hepatic glutamine

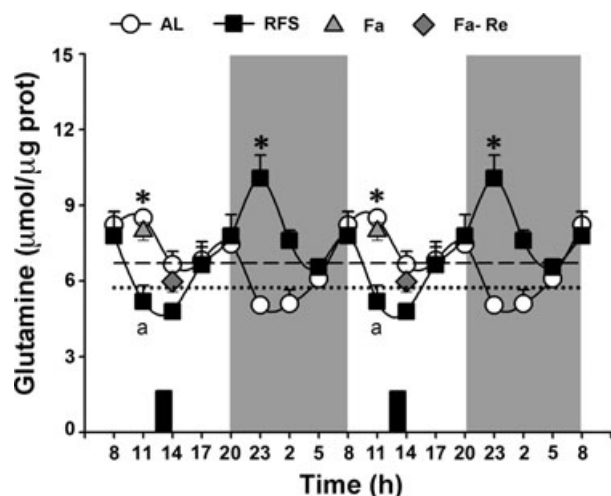
Glutamine is synthesized from glutamate and  $\text{NH}_4^+$  in an ATP-dependent reaction catalysed by GS. It is considered a non-toxic carrier of ammonia and is one of the amino acids whose concentration is highest in the blood plasma of vertebrates (33). In rat plasma its concentration is in the mM range, while within the liver is about  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  of total protein. Since the contribution from blood to liver is less than 30%, we assumed that glutamine concentrations in the liver represent the intrahepatic content of glutamine.

Hepatic glutamine concentrations, quantified by HPLC, exhibited significant rhythmicity in the AL and RFS groups, according to one-way ANOVA and Cosinor analysis (Fig. 6, Table 1). Although the mesor and amplitude did not show significant differences (Table 1), the peak concentration of glutamine was shifted by the daytime RFS, with the highest value occurring during the dark phase (23:32 hours) in contrast with the peak in the AL group in the light phase (11:56 hours). Significant differences were also observed between the control Fa rats and RFS rats at 11:00 hours. The glutamine concentration was 1.6 times higher in Fa than in RFS. Moreover, the serum



**Fig. 5.** Analysis of 24-h profile of hepatic GS activity in AL and RFS rats. GS activity was measured in both the liver homogenate (panel A) and mitochondrial fraction (panel B) of AL and RFS rats by a spectrophotometric assay. GS activity over a 24-h period is shown in a double plot. Rats were subjected to a regime of light:dark = 12:12 h. The shaded zone represents the dark phase. Food availability for the RFS group is indicated by dark boxes (from 12:00 to 14:00 hours). Controls of food condition are shown (Fa and Fa-Re). MESOR values are represented as a dashed line for AL group and a dotted line for RFS group. Graphs represent the mean  $\pm$  SEM of eight rats per time point.

\* $P < 0.05$  vs. 02:00 hours by one-way ANOVA and post hoc Bonferroni test. a =  $P < 0.05$  vs. Fa, b =  $P < 0.05$  vs. Re-Fa, c =  $P < 0.05$  vs. AL, all by Student's *t*-test.



**Fig. 6.** Analysis of 24-h profile of glutamine in liver homogenate in AL and RFS rats. Glutamine concentrations in liver homogenates were measured by HPLC. Rats were subjected to a regime of light: dark = 12:12 h. The shaded zone represents the dark phase. Food availability for the RFS group is indicated by dark boxes (from 12:00 to 14:00 hours). Controls of food condition are shown (Fa and Fa-Re). Mesor values are represented as a dashed line for the AL group and a dotted line for the RFS group. The graphs represent the mean  $\pm$  SEM of four rats per time point. \* $P < 0.05$  vs. 02:00 hours by one-way ANOVA and post hoc Bonferroni test, a =  $P < 0.05$  vs. Fa, by Student's *t*-test.

glutamine concentrations in the corresponding time points of hepatic glutamine acrophases (highest value) and valleys (lowest value) were similar in both groups (data not shown), which support the fact that the rhythmic behaviour is intrinsic of the liver and not for blood contamination. These results suggest that daytime RFS modifies the daily rhythmicity of liver GS at multiple levels.

## Discussion

Glutamine synthetase is a key enzyme in nitrogen metabolism. GS is formed by eight identical subunits of ~44 kDa molecular weight that contains four active sites (34), and it is transcriptionally and allosterically regulated (35). In the present study, we have shown that a 3-week protocol of daytime restricted food availability modified liver GS and the amount of its catalytic product, glutamine, at different levels as measured by different rhythmic parameters.

In the mouse liver, circadian regulation has been demonstrated for many genes implicated in the nutrient and intermediate metabolism (23), such as enzymes and transporters for glucose metabolism, as well as cholesterol biosynthetic and catabolic enzymes (36). In mammals, transcriptional regulation of GS is the key mechanism responsible for the liver-specific zonal expression of GS (37). Our study revealed that mRNA expression of GS did not show a rhythmic pattern over

a 24-h period; however, under restricted feeding a rhythm appeared whose acrophase coincided with the end of food access (~14:00 hours). Although there is no evidence for the presence of consensus sites of regulation by circadian control genes in either the GS promoter or its enhancers, circadian regulation could be the indirect result of other factors that are influenced by or drive circadian output rhythms in target tissues, such as corticosteroids, and by the presence of glucocorticoid-response elements in the GS promoter (38, 39). In fact, the acrophase of mRNA expression in RFS rats occurred after the peak of serum corticosterone in rats under the same restricted feeding protocol (18), supporting this possibility.

It is known that the circadian transcriptome comprises 5–10% of the genes studied by microarray analysis in different tissues (40, 41). Regarding the proteome, up to 20% of soluble proteins, predominantly enzymes, of the mouse liver are subject to circadian control (13), and interestingly, almost half of them lack a corresponding cycling transcript. By inference, these observations strongly suggest that several proteins are subjected to post-transcriptional mechanisms of circadian control. In this context, we analysed if there was a correlation between gene expression, protein levels and activity of liver GS, as well as with the level of glutamine. Overall, there was no a clear relation among these parameters (Table 1): some of them were rhythmic, such as GS activity and glutamine, whereas others did not show 24-h variations at all, such as levels of GS protein. Interestingly, RFS differentially modulated several of them: it induced rhythmicity in GS mRNA, promoted enhanced GS activity in the mitochondrial fraction, preserved the diurnal rhythm of the GS activity measured in the liver homogenate and promoted the phase shift in the levels of hepatic glutamine. These findings indicate that the GS properties and glutamine metabolism can be influenced by the circadian molecular clock at different steps, and by different mechanisms that remain to be elucidated.

Metabolic zonation in the liver is based on the efficient adaptation of functions that occur in the hepatocytes in response to changes in the environment (42), including nutritional supply and levels of oxygen, metabolites and hormones (42, 43). This functional hepatocyte heterogeneity implies modification of gene expression and regulation of enzymatic activities by mechanisms that include allosteric modulation. Ammonia metabolism displays a dynamic and static zonation (7): whereas ureogenesis is performed in periportal hepatocytes, synthesis of glutamine is carried out in pericentral hepatocytes (7, 44). According to our study, the RFS protocol did not modify the presence of GS around the pericentral vein, as measured by two approaches: fluorescence intensity and percent positive cells. In a panoramic analysis of the fluorescent signal, a similar pattern of distribution of GS along the acinus was observed in both the AL and RFS groups. Thus, the

presence of protein analysed by Western-blot and by immunohistochemistry was not influenced by daytime RFS. Many clock proteins are post-transcriptionally regulated to control their rates of accumulation and degradation, allowing cell functions to oscillate even when genes are expressed constitutively or without a rhythmic pattern. Hence, in spite of the changes in its expression, protein content in cellular fractions, and activity, GS kept its characteristic liver zonation during the RFS protocol.

The enzymatic activity of several proteins has been demonstrated to play a key role in rhythmic behaviour of their target proteins. It is the case for enzymes that are associated with food intake and energy status, such as the NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase SIRT1, which functions in a circadian manner, and CLOCK, a key transcription factor in the molecular circadian machinery that has intrinsic acetyltransferase activity (45, 46).

Most enzymes with quaternary structure are susceptible to allosteric regulation. In mammals, GS is an octamer, and substrate binding can stabilize the active form to facilitate the binding of a second substrate. Liver GS contains in its structure various kinds of allosteric sites for regulation that can recognize substrates, products, other metabolites and divalent cations (3, 47). Thus, GS actions ultimately depend upon regulation of its activity and probably, according to the present results, on temporal regulation as well. Our study showed differential patterns of GS activity when the liver homogenate and mitochondrial fraction were compared. In homogenate, although there was neither a rhythmic pattern nor changes in protein abundance, GS activity showed a robust diurnal rhythm that was not modified by the daytime RFS in its rhythmic parameters: mesor, amplitude and acrophase. It seems that the light/dark cycle drove the rhythm of cytoplasm GS activity, whereas the mealtime schedule influenced the mitochondrial activity.

Since GS is mostly bound to the outer membranes of diverse organelles, it is considered a cytosolic enzyme in mammalian liver (1). In this study, the GS activity detected in the mitochondrial fraction is accounted for the attachment of GS to the external mitochondrial membrane. The GS activity in the mitochondrial fraction did not show a rhythmic pattern; however, it was significantly higher in RFS than AL groups at all the times measured. The FEO, promoted by the RFS, appears to influence the GS activity differentially, in a compartment-specific manner. We suggest that GS in the mitochondrial fraction adopts a conformation with higher activity when the FEO is expressed. However, so far we have not identified the biochemical mechanism (s) underlying this phenomenon.

Glutamine is not only a substrate for the biosynthesis of proteins and purine rings, but it is also fundamental in the handling of nitrogen, both as a source and as a carrier. The turnover of liver glutamine is rapid and depends on breakdown by glutaminase and re-synthesis

by GS to ensure a very efficient regulation of body nitrogen balance and acid-base homeostasis. (35). Our study demonstrated that concentrations of intrahepatic glutamine showed a robust daily pattern, both in AL and RFS rats, with similar rhythmic characteristics, but in an antiphasic manner. Taking into consideration the fact that the glutamine concentration in liver depends on anabolism by GS and catabolism by glutaminase, as well as excretion via the SNAT3 transporter, it is possible that the rhythmicity of this parameter is influenced by several metabolic factors and environmental conditions. The antiphasic oscillation suggests an influence of the circadian clock on liver GS under AL conditions, but this influence is modified by the establishment of the FEO under RFS.

It is clear that daytime RFS has an influence on several steps in the handling of nitrogen by the liver, for example, the 24-h rhythmicity of serum urea and the activities of ornithine transcarbamylase and carbamoyl phosphate synthetase-1 (18), the rate-limiting enzyme in the urea cycle, and in this work, we showed evidence that GS characteristics are also affected.

In conclusion, daytime RFS is a strong entraining stimulus that promotes the expression of the FEO, influences liver GS at different levels (transcription, post-transcriptional modifications and enzymatic activity), and regulates rhythmic parameters (the appearance or disappearance of a rhythm, shift of phase and changes in mesor). All these changes seem to be part of the metabolic, physiological and chronobiological adaptations promoted by the RFS during the rheostatic adaptation associated with FEO expression, and they differ from those responses provoked by acute Fa or Fa-Re conditions, maybe to optimize the handling of nutrients and their related compounds, including ammonia. These changes show the plasticity of hepatic GS system when the organism faces a metabolic challenge such as RFS.

## Acknowledgements

We thank Fernando López-Barrera for his expert technical assistance and Dr. Dorothy Pless for critically editing the manuscript.

*Financial support:* This project was supported by grants IA200713 and IB200311 from PAPIIT, UNAM, México.

*Conflict of interest:* All authors declare no conflict of interest regarding any of the material discussed in the manuscript.

## References

1. Deuel TF, Louie M, Lerner A. Glutamine synthetase from rat liver. Purification, properties, and preparation of specific antisera. *J Biol Chem* 1978; **253**: 6111–8.
2. Trivedi RR, Bhattacharyya S. Constitutive internalization and recycling of metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5). *Biochem Biophys Res Commun* 2012; **427**: 185–90.



3. Tate SS, Leu FY, Meister A. Rat liver glutamine synthetase. Preparation, properties, and mechanism of inhibition by carbamyl phosphate. *J Biol Chem* 1972; **247**: 5312–21.
4. de Groot CJ, ten Voorde GH, van Andel RE, *et al.* Reciprocal regulation of glutamine synthetase and carbamoyl-phosphate synthetase levels in rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1987; **908**: 231–40.
5. van de Zande L, Labruyere WT, Arnberg AC, *et al.* Isolation and characterization of the rat glutamine synthetase-encoding gene. *Gene* 1990; **87**: 225–32.
6. Watford M, Chellaraj V, Ismat A, Brown P, Raman P. Hepatic glutamine metabolism. *Nutrition* 2002; **18**: 301–3.
7. Gebhardt R, Mecke D. Heterogeneous distribution of glutamine synthetase among rat liver parenchymal cells in situ and in primary culture. *EMBO J* 1983; **2**: 567–70.
8. Gebhardt R, Hovhannissyan A. Organ patterning in the adult stage: the role of Wnt/beta-catenin signaling in liver zonation and beyond. *Dev Dyn* 2010; **239**: 45–55.
9. Wu C. Glutamine Synthetase. Iv.Its Formation in Rat Liver Following Partial Hepatectomy and during Repletion. *Arch Biochem Biophys* 1964; **106**: 402–9.
10. Arola L, Palou A, Remesar X, Alemany M. Glutamine synthetase activity in the organs of fed and 24-hours fasted rats. *Horm Metab Res* 1981; **13**: 199–202.
11. Felipe V, Minana MD, Grisolia S. Control of urea synthesis and ammonia utilization in protein deprivation and refeeding. *Arch Biochem Biophys* 1991; **285**: 351–6.
12. Bellet MM, Nakahata Y, Boudjelal M, *et al.* Pharmacological modulation of circadian rhythms by synthetic activators of the deacetylase SIRT1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; **110**: 3333–8.
13. Reddy AB, Karp NA, Maywood ES, *et al.* Circadian orchestration of the hepatic proteome. *Curr Biol* 2006; **16**: 1107–15.
14. Carneiro BT, Araujo JF. Food entrainment: major and recent findings. *Front Behav Neurosci* 2012; **6**: 83.
15. Mendoza J. Circadian clocks: setting time by food. *J Neuroendocrinol* 2007; **19**: 127–37.
16. Carneiro BT, Araujo JF. The food-entrainable oscillator: a network of interconnected brain structures entrained by humoral signals? *Chronobiol Int* 2009; **26**: 1273–89.
17. Stephan FK. The “other” circadian system: food as a Zeitgeber. *J Biol Rhythms* 2002; **17**: 284–92.
18. 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 Regul Integr Comp Physiol* 2000; **279**: R2048–56.
19. Baez-Ruiz A, Escobar C, 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**: G1015–23.
20. Díaz-Muñoz M, Vázquez-Martínez O, Baez-Ruiz A, *et al.* Daytime food restriction alters liver glycogen, triacylglycerols, and cell size. A histochemical, morphometric, and ultrastructural study. *Comp Hepatol* 2010; **9**: 5.
21. Rivera-Zavala JB, Baez-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; **2011**: 261584.
22. Luna-Moreno D, García-Ayala B, Díaz-Muñoz M. Daytime restricted feeding modifies 24 h rhythmicity and subcellular distribution of liver glucocorticoid receptor and the urea cycle in rat liver. *Br J Nutr* 2012; **108**: 2002–13.
23. Asher G, Schibler U. Crosstalk between components of circadian and metabolic cycles in mammals. *Cell Metab* 2011; **13**: 125–37.
24. Portaluppi F, Touitou Y, Smolensky MH. Ethical and methodological standards for laboratory and medical biological rhythm research. *Chronobiol Int* 2008; **25**: 999–1016.
25. Aguilar-Delfin I, López-Barrera F, Hernández-Muñoz R. Selective enhancement of lipid peroxidation in plasma membrane in two experimental models of liver regeneration: partial hepatectomy and acute CC14 administration. *Hepatology* 1996; **24**: 657–62.
26. Kingdon HS, Hubbard JS, Stadtman ER. Regulation of glutamine synthetase. XI. The nature and implications of a lag phase in the *Escherichia coli* glutamine synthetase reaction. *Biochemistry* 1968; **7**: 2136–42.
27. Zuther P, Gorbey S, Lemmer B. 2009 Chronos-Fit v 1.06. <http://www.ma.uni-heidelberg.de/inst/phar/lehre/chrono.html>.
28. Refinetti R. The circadian rhythm of body temperature. *Front Biosci* 2010; **15**: 564–94.
29. Caldelas I, Tejadilla D, Gonzalez B, Montufar R, Hudson R. Diurnal pattern of clock gene expression in the hypothalamus of the newborn rabbit. *Neuroscience* 2007; **144**: 395–401.
30. Moorman AF, de Boer PA, Charles R, Lamers WH. Diet- and hormone-induced reversal of the carbamoylphosphate synthetase mRNA gradient in the rat liver lobulus. *FEBS Lett* 1990; **276**: 9–13.
31. Ueberham E, Arendt E, Starke M, Bittner R, Gebhardt R. Reduction and expansion of the glutamine synthetase expressing zone in livers from tetracycline controlled TGF-beta1 transgenic mice and multiple starved mice. *J Hepatol* 2004; **41**: 75–81.
32. Spindler SR. Calorie restriction enhances the expression of key metabolic enzymes associated with protein renewal during aging. *Ann N Y Acad Sci* 2001; **928**: 296–304.
33. Iqbal K, Ottaway JH. Glutamine synthetase in muscle and kidney. *Biochem J* 1970; **119**: 145–56.
34. Llorca O, Betti M, Gonzalez JM, *et al.* The three-dimensional structure of an eukaryotic glutamine synthetase: functional implications of its oligomeric structure. *J Struct Biol* 2006; **156**: 469–79.
35. Gebhardt R, Baldysiak-Figiel A, Krugel V, Ueberham E, Gaunitz F. Hepatocellular expression of glutamine synthetase: an indicator of morphogen actions as master regulators of zonation in adult liver. *Prog Histochem Cytochem* 2007; **41**: 201–66.
36. Panda S, Antoch MP, Miller BH, *et al.* Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* 2002; **109**: 307–20.
37. Clinkenbeard EL, Butler JE, Spear BT. Pericentral activity of alpha-fetoprotein enhancer 3 and glutamine synthetase upstream enhancer in the adult liver are regulated by beta-catenin in mice. *Hepatology* 2012; **56**: 1892–901.
38. Fahrner J, Labruyere WT, Gaunitz C, *et al.* Identification and functional characterization of regulatory elements of the glutamine synthetase gene from rat liver. *Eur J Biochem* 1993; **213**: 1067–73.
39. Dickmeis T. Glucocorticoids and the circadian clock. *J Endocrinol* 2009; **200**: 3–22.

40. Ueda HR, Chen W, Adachi A, *et al.* A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature* 2002; **418**: 534–9.
41. Storch KF, Lipan O, Leykin I, *et al.* Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature* 2002; **417**: 78–83.
42. Gebhardt R. Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function. *Pharmacol Ther* 1992; **53**: 275–354.
43. Jungermann K, Kietzmann T. Role of oxygen in the zonation of carbohydrate metabolism and gene expression in liver. *Kidney Int* 1997; **51**: 402–12.
44. Haussinger D. Hepatocyte heterogeneity in glutamine and ammonia metabolism and the role of an intercellular glutamine cycle during ureogenesis in perfused rat liver. *Eur J Biochem* 1983; **133**: 269–75.
45. Doi M, Hirayama J, Sassone-Corsi P. Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase. *Cell* 2006; **125**: 497–508.
46. Nader N, Chrousos GP, Kino T. Circadian rhythm transcription factor CLOCK regulates the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor by acetylating its hinge region lysine cluster: potential physiological implications. *FASEB J* 2009; **23**: 1572–83.
47. Tate SS, Meister A. Regulation of rat liver glutamine synthetase: activation by alpha-ketoglutarate and inhibition by glycine, alanine, and carbamyl phosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; **68**: 781–5.