

1. Antecedentes

1.1. Ritmos Biológicos

Muchos mecanismos biológicos en los humanos, al igual que en otros animales, plantas, e incluso organismos unicelulares tienen un periodo de actividad rítmica. Esta habilidad es parte básica de la vida, y se lleva a cabo bajo estricto control genético.

Los ciclos más estudiados son los que van en una sincronía con la rotación de la tierra (Gibbons, 1991), ya que la luz es el factor de sincronización más predominante, esta va de la retina al núcleo supraquiasmático (NSQ) a través del tracto retino-hipotalámico.

Los ritmos biológicos son procesos cíclicos y endógenos que se repiten en un intervalo de tiempo, dichos cambios se presentan en las funciones fisiológicas y del comportamiento de organismos. Estos ciclos pueden ir desde un intervalo de minutos hasta meses. Un ejemplo típico es el caso del ciclo del sueño que generan una liberación de hormonas en el cuerpo con un ritmo que es medido en minutos, mientras que otro ciclo como el menstrual es medido en días. Los ritmos que ocurren con una repetición aproximadamente de 24 horas son llamados ritmos circadianos (Mistlberger et al., 2000).

Los ritmos circadianos son generados por un reloj interno, o marcapasos, que se encuentran en el cerebro a nivel del hipotálamo, el núcleo NSQ. Estos ritmos persisten en condiciones constantes, aunque no se tengan señales externas, como la hora o la duración del día, como

es el caso del ciclo de día - noche. Además del NSQ se ha encontrado que otros órganos periféricos están implicados en este control circadiano, como el hígado, el tejido adiposo, el músculo esquelético y algunas glándulas endócrinas (Gibbons, 1991).

El NSQ es un reloj maestro ubicado en la parte anterior del hipotálamo cuya función es dirigir la programación circadiana y organizarla en los tejidos periféricos, por medio de la regulación neural y vías endocrinas como lo son el sistema nervioso simpático, señales de glucocorticoides, y la digestión de nutrimentos. Los estudios que se han hecho tanto moleculares como bioquímicos para entender la fisiología circadiana han llevado a establecer un modelo mecanístico del reloj (Reppert & Weaver, 2001).

En mamíferos se ha observado que existe una jerarquía de varios osciladores circadianos que coordinan los ritmos biológicos de 24 h. Además del NSQ, también existen osciladores periféricos en el riñón, páncreas, hígado y otros órganos.

A principios de 1960 se indicó que las actividades enzimáticas de la piruvato cinasa, ácido graso sintetasa y enzimas asociadas con el metabolismo del glicógeno mostraron claramente ritmicidad relacionada con el día y la noche. Un análisis de el transcriptoma hepático mostró variaciones circadianas en la expresión de muchos genes relacionados con la energía y el metabolismo en el hígado incluyendo aquellos que regulan la gluconeogénesis, lipogénesis, síntesis de ácidos grasos, biogénesis mitocondrial, metabolismo oxidativo, sugiriendo que el hígado tiene relojes circadianos que regulan estos genes.

A pesar de la semejanza que existe en la maquinaria molecular entre el oscilador central y los periféricos, difieren entre ellos en que el NSQ no necesita de otros osciladores para poder ejercer sus funciones; en cambio, parece ser que para prevenir una amortiguación que corte la ritmicidad en la expresión de los genes circadianos en los órganos periféricos, el NSQ los debe re-sincronizar periódicamente (Yamazaki, 2000). La manera en la que el NSQ realiza estas tareas no está bien entendida. De hecho, ligandos de los receptores de glucocorticoides y dos receptores más (RAR δ y RXR δ) (Balsalobre et al., 2000) ionóforos de Cl⁻ o químicos que activan proteínas cinasas A, C ó MAP cinasas (Akashi & Nishida, 2000) pueden activar la expresión de los genes circadianos en tejidos de células en cultivo.

El horario en la alimentación ha sido un factor dominante en los intervalos de tiempo para la expresión rítmica de los genes en tejidos como el páncreas, riñón, corazón y el hígado

(Damiola et al., 2001), este último tiene un rol fisiológico muy importante en el anabolismo y catabolismo de nutrientes y xenobióticos que participan distintos genes. Entonces si los animales nocturnos como las ratas son alimentadas sistemáticamente durante el día, la expresión de genes circadianos en órganos como el hígado invierten su fase. De manera interesante, se ha observado que la restricción alimenticia no tienen ninguna influencia en la ritmicidad del NSQ (Damiola et al., 2001). Éstas y otras observaciones han dado pie a la sugerencia de que existe un oscilador circadiano alternativo al NSQ que se sincroniza por acceso al alimento. Este oscilador se le ha denominado oscilador sincronizado por alimento y no se sabe, hasta la fecha, su localización anatómica precisa (Damiola et al., 2001).

Existen salidas de informaciones de las neuronas que se encuentran en el NSQ hacia los órganos periféricos. Esto significa que tiene un sistema nervioso autónomo (Bartness, 2001). Existen también señales hormonales que son capaces de sincronizar los osciladores periféricos, como los agonistas de los glucocorticoides que puede causar un cambio en estos osciladores (Balsalobre et al., 2000).

El NSQ sincroniza a los osciladores dependientes como el hígado, regulando el ciclo de la actividad y el reposo, por lo tanto la programación al alimento. Esta compleja actividad neuronal, hormonal, entre otras señales externas como el alimento, puede regular la ritmicidad de los osciladores dependientes por la convergencia de los genes *Per1* y *Per2* (Fig. 1) (Le Minh, 2001). Se han identificado en mamíferos siete genes esenciales para la función del reloj circadiano, en los que se incluyen los mencionados anteriormente que son 2 isoformas *mPer1* y *mPer2* (Tei et al., 1997; Zheng et al., 1999), las dos isoformas del citocromo *mCry1* y *mCry 2* (Kume et al., 1999), otros dos genes *Clock* y *Bmal 1* que son factores de transcripción que codifican para PAS (Per-Arnt-Sim, que es un dominio estructural de proteínas utilizado como sensores de señal) en hélice-blucle-hélice (King, 1997; Bunger et al., 2000) y *Tau* que codifica para caseína cinasa 1 (Lowrey et al., 2000).

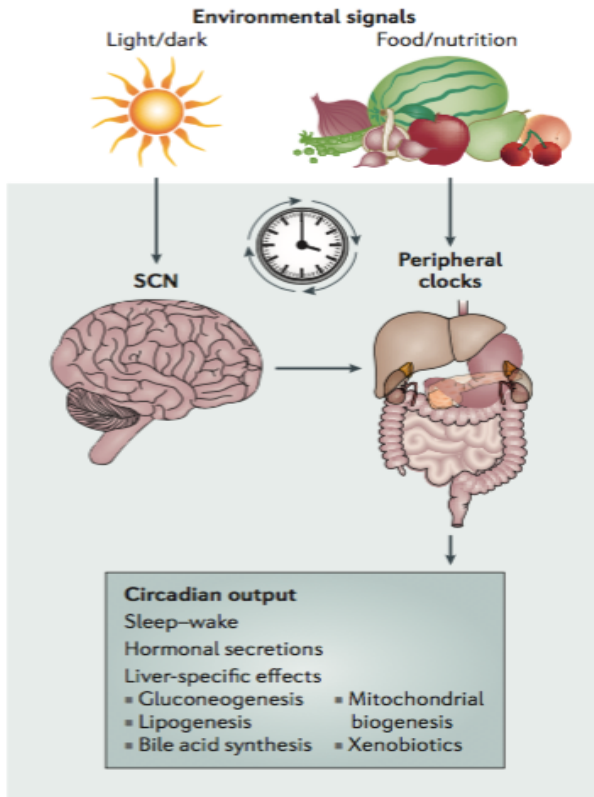


Fig. 1. El núcleo supraquiasmático es el reloj circadiano maestro en mamíferos, junto con los osciladores periféricos que regulan el comportamiento endócrino y vías nerviosas.

1.2. Oscilador sincronizado por el alimento

Como se mencionó anteriormente, existen genes que regulan la maquinaria molecular de estos relojes biológicos en mamíferos. El primero que se estudió y el más conocido es el NSQ y se identificó como el principal marcapasos circadiano. Tiempo después se observó que además de la regulación del NSQ existen osciladores periféricos que regulan la actividad en tejidos como hígado, riñón, páncreas, etc.

Todos los mamíferos tienen ciclos diarios como dormir y despertar o los periodos de alimentación. También existen cambios fisiológicos como la secreción de hormonas y la temperatura del cuerpo. Estos ciclos están sincronizados normalmente por el ciclo externo del día y la noche mediante la señal que le llega al NSQ, pero estos ciclos pueden alterarse

dramáticamente bajo condiciones de restricción de alimento, cambio en la temperatura del ambiente, o la presencia de otros estímulos. Durante mucho tiempo, uno de los más estudiados es la sincronización de los ritmos circadianos que se originan por la digestión de los nutrientes. Distintos experimentos en ratas y otros roedores han mostrado evidencia de que existe un oscilador que es sincronizado por el alimento en el sistema circadiano de los mamíferos (Saper & Fuller, 2015).

La mayoría de los organismos muestra una serie de cambios tanto fisiológicos como conductuales que les permite anticipar los periodos de alimentación. En modelos animales se sabe que existe una expresión rítmica de los genes reloj en tejidos y/o células que participan en la fisiología nutricional y el metabolismo, como el hígado, el páncreas, el tracto gastrointestinal y el tejido adiposo (Cagampang & Bruce, 2012). Se han mostrado en diversos estudios que un protocolo de restricción de alimento resulta en un incremento de la actividad locomotora de los animales, horas antes del periodo de alimentación (Mistlberger, 1994). De tal forma que cuando se restringe el acceso a la comida una vez al día, surge un patrón de ritmicidad con respecto a un grupo alimentado en condiciones *ad libitum* y se puede observar una nueva configuración del sistema circadiano del tiempo.

Este fenómeno persiste aunque el NSQ haya sido removido completamente y por lo tanto es resultado de los osciladores circadianos independientes del NSQ, a este se le ha llamado como el oscilador sincronizado por el alimento (Aguilar Roblero & Díaz Muñoz, 2010).

Durante la investigación de los efectos benéficos que tiene la sincronización a la ingesta de alimento o la composición de nutrientes que activan el reloj circadiano, se le ha denominado como crononutrición. Esta teoría se basa en la evidencia de que los nutrientes son potentes reguladores del reloj hepático circadiano, el cual regula una gran cantidad de funciones fisiológicas (Tahara & Shibata, 2013). Esta regulación puede que sea más poderosa que la regulación del NSQ hacia los osciladores periféricos, ya que este oscilador en órganos periféricos puede estar controlado por el periodo de sincronización debido a un horario de alimentación, que por el ciclo del día-noche. La crononutrición es importante para entender el funcionamiento del reloj circadiano en el hígado, y puede ayudar a prevenir y tratar en un futuro enfermedades relacionadas con el hígado.

Se ha intentado identificar una sola estructura neuronal de este oscilador, pero no se ha tenido éxito. Sin embargo, se sugiere que en el oscilador sincronizado por el alimento participan áreas específicas del cerebro además de órganos periféricos relacionados con la alimentación y el metabolismo (Stephan, 2002).

La restricción de alimento modula de manera muy efectiva el comportamiento y la fisiología de los animales; lo que no causa sorpresa cuando se considera la ventaja adaptativa que los organismos adquieren al predecir el tiempo de acceso a la comida.

Se ha tenido un progreso en la búsqueda de la localización exacta del oscilador sincronizado por el alimento, diferentes maneras en que se sincronizan y su maquinaria molecular. Su búsqueda empezó hace cerca de 20 años. Resaltando las lesiones en núcleos hipotalámicos, otras regiones extra hipotalámicas, las hipotalámicas adrenales pituitarias, y no se ha tenido éxito en bloquear la sincronización de las ventanas temporales de la restricción de alimento (Krieger, 1974). Por otra parte, lesiones en el núcleo ventromedial del hipotálamo, el núcleo parabraquial, y más recientemente el núcleo dorsomedial del hipotálamo, se ha reportado que produce mayor efecto en los déficits de la sincronización (Inouye, 1982; Mistlberger & Rechtschaffen, 1984).

Saper y Fuller (2015) analizaron con más detalle los experimentos de las diferentes lesiones, encontrando un deterioro en la sincronización del alimento. Por ejemplo, las lesiones del núcleo ventromedial del hipotálamo deterioraron la sincronización del alimento (Inouye, 1982). Sin embargo, Mistlberger y Rechtschaffen (1984) confirmaron que lesiones electrolíticas del núcleo ventromedial del hipotálamo en ratas grandes recuperaban la habilidad de sincronizar entre 14 y 21 semanas post-lesión. De manera más reciente Landry (2006) realizó lesiones grandes en el núcleo dorsomedial del hipotálamo y encontró que los animales continuaban mostrando actividad anticipatoria bajo condiciones de restricción de alimento, sugiriendo que el núcleo ventromedial y el núcleo dorsomedial del hipotálamo no son el lugar en donde se encuentra el oscilador sincronizado por el alimento.

Otros experimentos que se han realizado para encontrar la pérdida de la sincronización al alimento fue utilizando una dieta no nutritiva (Mistlberger & Rusak, 1987). Teniendo como resultado que los animales sometidos a este tipo de dieta no nutritiva, utilizando endulzantes artificiales como la sacarina no tuvieron estímulos a esta sincronización. Por lo tanto, puede

que algún tipo de señal acerca del valor nutritivo de los alimentos sea enviado al cerebro, pero el mecanismo de acción se desconoce.

Por otra parte, es posible que el oscilador sincronizado por el alimento pueda estar controlado por diversas vías; y la eliminación de algunas de éstas puede no ser suficiente para evitar la anticipación al alimento. Una vez que se establezca la localización de este oscilador, será mucho más fácil encontrar el principal funcionamiento de esta anticipación al alimento.

También, cabe la posibilidad de que las señales originadas por el alimento funcionen de una manera independiente al oscilador sincronizado por el alimento para sincronizar tejidos periféricos. Por el ejemplo, que la dieta tenga una influencia en la expresión de genes directamente en órganos periféricos (Rutter et al., 2001).

El oscilador sincronizado por el alimento tiene un fundamento en la relación mutua entre el reloj circadiano molecular y las redes de control metabólico.

1.3. Membrana plasmática del hepatocito

Los hepatocitos son células del hígado responsables de mantener una variedad de funciones, entre otras controlar el metabolismo del hígado, ya que este es el órgano más importante para el metabolismo de nutrientes. En un adulto, los hepatocitos abarcan aproximadamente el 87% del volumen total del hígado. Son células grandes de 10 a 30 μm de diámetro (Heatline, 2008).

La arquitectura del hígado es muy compleja; sin embargo, los hepatocitos poseen una forma poligonal, la membrana del hepatocito contiene dominios de subespecialización, que son localizados en una región sinusoidal (basal), lateral y canicular (apical). Aproximadamente el 40% de la superficie de los hepatocitos está expuesta a un sinusoides vascular. La membrana del hepatocito puede tener microvellosidades en ciertas regiones.

La ATPasa de Na^+/K^+ es capaz de generar un gradiente iónico que influye en la fisiología del hepatocito. Los hepatocitos poseen diversos tipos de uniones celulares tales como, uniones adherentes, uniones ocluyentes, desmosomas y uniones comunicantes (*gap*

junctions). Cada tipo de comunicación celular tiene una función específica, de tal forma que los hepatocitos están fuertemente comunicados. Pueden tener movimiento lateral de proteínas de membrana, dan anclaje y estabilidad física o sirven como comunicantes intercelulares intercambiando moléculas pequeñas (Jean & Fasel, 2007).

La homeostasis en el hígado es controlada por una red extracelular, intracelular e intercelular de mecanismos de comunicación. Generalmente las señales extracelulares activan las cascadas de comunicación intracelulares. Muchas de estas señales se propagan a células adyacentes, estas conexiones intercelulares están formadas por arreglos y son llamadas uniones comunicantes o “gap junctions” (Vinken et al., 2006, 2008). El hígado fue uno de los primeros órganos en donde se estudiaron las uniones comunicantes (Loewenstein & Kanno, 1967). Estas estructuras están formadas por conexinas, las cuales en el hígado se han encontrado más de 20 diferentes tipos con estructuras similares.

Las uniones comunicantes median la difusión pasiva de moléculas pequeñas e hidrofílicas como la glucosa, glutamato, glutatión, adenosin trifosfato, adenosin mono fosfato cíclico, inositol trifosfato y iones incluyendo Ca^{2+} , Na^{+} y K^{+} (Alexander & Goldberg, 2003). Una gran variedad de procesos fisiológicos son regulados por sustancias que son intercambiadas intracelularmente a través de las uniones comunicantes y por lo tanto la comunicación intercelular a por medio de uniones comunicantes es considerada como un mecanismo clave para el control de la homeostasis del tejido (Vinken et al, 2006).

1.4 Canales iónicos en el hepatocito

Los canales iónicos en los hepatocitos tienen una función integral. En los hepatocitos se expresan canales activados por ligando (receptores) y canales dependientes de voltaje, los cuales regulan el intercambio iónico con el medio extracelular. Algunos funcionan con cambios del volumen celular; por ejemplo, cambios en los osmolitos intracelulares, secreción de fluidos y electrolitos, recaptura de glucosa dependiente de Na^{+} , por el intercambiador

Na/H o el cotransporte de Na-K-2Cl e insulina, factores de crecimiento y factores mitogénicos, así como ciertas fases del ciclo celular (Stutzin & Hoffmann, 2006).

Si se presenta un incremento en el volumen celular se genera una serie de eventos de señalización, resultado de la activación de mecanismos reguladores; mientras que la respuesta de disminución del volumen depende de la salida de K^+ , Cl^- y osmolitos orgánicos acompañados de agua (Stutzin & Hoffmann, 2006).

Los canales de K^+ son los más ampliamente distribuidos y pueden encontrarse en prácticamente todos los organismos vivos (Derst & Karschin, 1998). Contribuyen en el mantenimiento del potencial de membrana, pH, regulación de volumen celular, excitabilidad y muerte celular, entre otros procesos celulares (Bertil, 1991). Diferentes tipos celulares detectan y responden a cambios como la acidificación, la presión de O_2 , la osmolaridad y la concentración iónica, los cuales son dependientes de la actividad de canales de K^+ (Almanza et al, 2008). En muchas células el potencial de membrana es mantenido a través de la bomba Na^+/K^+ operada por ATP junto con canales de K^+ , generando un gradiente iónico necesario para el mecanismo de transporte (Hille, 2001).

Las respuestas reguladoras del volumen celular incrementan la conductancia de K^+ debido a su gradiente e hiperpolariza la membrana, la cual favorece la salida de Cl^- . Sin embargo, se sabe que los canales de Cl^- que son activados por el aumento del volumen celular son elementos cruciales en el proceso de dichas respuestas reguladoras. Esto es causado por el hecho de que el transporte del Cl^- en la mayoría de las células está dominado por un proceso de difusión. La permeabilidad de Cl^- es muy baja en las células (Stutzin & Hoffmann, 2006).

Los cambios en la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma, el retículo endoplásmico, la mitocondria y otros organelos intracelulares contribuyen a la regulación de las funciones de los hepatocitos. La dinámica del Ca^{2+} en el hepatocito está finamente regulada por dos componentes, el principal se da a partir de la liberación del Ca^{2+} del retículo endoplásmico y el segundo componente es controlado por los canales operados por reservas de Ca^{2+} (store-operated Ca^{2+} channels) localizados en la membrana plasmática (Almanza et al, 2008). En el hígado, los canales operados por reservas de Ca^{2+} son activados por un decremento de Ca^{2+} en una subregión del retículo endoplásmico enriquecido con un receptor de IP_3 tipo 1. El receptor de este tipo, mejor caracterizado en la membrana plasmática, es el canal CRAC

(Ca²⁺-release-activated Ca²⁺). En los hepatocitos un aumento en el volumen celular puede abrir canales catiónicos no selectivos activados por estiramiento, lo que aumenta el flujo de Ca²⁺ y así se activan canales de K⁺ por Ca²⁺. Por lo tanto, el incremento en el Ca²⁺ citosólico dispara un aumento en la permeabilidad de K⁺ (P_K) (Burguess et al., 1982).

Esta permeabilidad de un ion es equivalente a la conductancia del ion, la cual es el inverso de la resistencia. La unidad que se utiliza para la conductancia son los siemens (S).

La caracterización y funcionalidad de la actividad de los canales requiere un método electrofisiológico directo. En este contexto, la técnica de fijación de voltaje (patch-clamp) es una herramienta poderosa. Para este estudio se modifican las soluciones extra- e intracelular, para explorar los cambios en la conductancia de K⁺, Na⁺, Cl⁻ y Ca²⁺. Además de ubicar a los receptores que favorezcan el aumento del flujo de estos iones, como los cotransportadores de glucosa, que favorece el flujo de Na⁺, ya que entran de una manera simporte.