



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS

**“VARIACIONES DIARIAS EN LA EXPRESIÓN DE p53 EN
HÍGADO DE RATA DURANTE LA SINCRONIZACIÓN
CIRCADIANA POR UN HORARIO DE RESTRICCIÓN
CALÓRICA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

PRESENTA

ERIKA LIZBETH SOLORIO GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS: Biol. Christian Molina Aguilar

CO-DIRECTOR DE TESIS: Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Ensenada, B.C.

Abril 2016.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS

Ensenada, B.C. a 04 de Abril de 2016

P. BIOL. Erika Lizbeth Solorio García
Presente.-

Por este medio comunicamos a usted que después de haber leído detenidamente el trabajo que presenta como Tesis Profesional bajo el Título: "VARIACIONES DIARIAS EN LA EXPRESIÓN DE p53 EN HÍGADO DE RATA DURANTE LA SINCRONIZACIÓN CIRCADIANA POR UN HORARIO DE RESTRICCIÓN CALÓRICA"

Consideramos que reúne los requisitos para aprobar la parte escrita de su Examen Profesional.

ATENTAMENTE


Dr. Faustino Gamarena Rosales
PRESIDENTE


Dr. Ulises Pacheco Bardullas
SECRETARIO

Dr. Julio Valencia Suarez

1er. VOCAL

“Los viajes permiten descubrir que hay en el mundo muchas personas de corazón excelente, dispuestas siempre a servirnos aun cuando no se les haya visto jamás ni vayan a volverse a encontrar nunca.”

Darwin

“Los grandes trabajos no son hechos por la fuerza sino por la perseverancia.”

Ben Jonson

“Si buscas resultados distintos, no hagas siempre lo mismo.”

Albert Einstein

DEDICATORIA

Mi tesis está dedicada a mi Familia.

Gracias a ustedes he logrado cumplir mis objetivos como persona y estudiante.

A mi Papá y Mamá por su amor, trabajo, sacrificios en todos estos años, por brindarme los recursos necesarios, por hacer de mí una mejor persona a través de sus consejos, enseñanza y amor.

A mis hermanas por estar acompañándome siempre.

A todo el resto de familia y amigos que de una u otra manera me han llenado de sabiduría para terminar la tesis.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera dar las gracias a mi Co-Director el Dr. Mauricio Díaz Muñoz por haberme aceptado en el Laboratorio B-11 para realizar mi tesis de Licenciatura por su confianza en mis capacidades y su apoyo.

A mi Director de Tesis Biol. Christian Molina Aguilar gracias por ayudarme a crecer profesionalmente.

A mi Papá y Mamá por enseñarme que los sueños se logran a base de esfuerzo y dedicación. A mis hermanas, Lili y Lulú, por darme la oportunidad de crecer al lado de ellas y ser mejor día a día.

A mi Abuelita que siempre me dijo “Todo esfuerzo tiene su Recompensa”

A la familia maravillosa de mis hermanas adoptivas Giovanna y Karen porque sin ellos esta historia no se habría escrito.

A mis compañeros del laboratorio B-11, por los buenos momentos que pasamos juntos por todo el ánimo y apoyo que me dieron en su momento, en especial a Marlen, Dalita, Julieta, Cristina, por su ayuda en la Técnica de Western Blot.

A la Dra. Olivia Vázquez Martínez por su apoyo en el laboratorio.

A Héctor por ser una excelente persona y convertirse en mi mejor amigo gracias por compartir momentos inolvidables a tu lado a lo largo de este camino y tu apoyo incondicional en todo momento.

A mis amigas Areli, Vero y Adriana porque a pesar de la distancia siempre conté con su apoyo desde lejos para seguir con esta aventura y porque siempre me recordaron que “Si las cosas fueran fáciles cualquier persona las haría”.

A mis amigos que han estado conmigo a lo largo de mi vida y me han aceptado como soy.

GRACIAS A TODOS.

Resumen de la tesis

“VARIACIONES DIARIAS EN LA EXPRESIÓN DE p53 EN HÍGADO DE RATA DURANTE LA SINCRONIZACIÓN CIRCADIANA POR UN HORARIO DE RESTRICCIÓN CALÓRICA”

que presenta

Erika Lizbeth Solorio García como requisito parcial para la obtención de la Licenciatura en Biología.

Los ritmos circadianos (oscilaciones de variables biológicas con duración de ~24h) han surgido y evolucionado en los seres vivos como una capacidad de anticiparse, adaptarse y sobrevivir a cambios del medio ambiente. Los horarios de alimentación generan cambios rítmicos en los procesos metabólicos, humorales y de transcripción de genes. En el hígado los horarios de alimentación inducen cambios en la ritmicidad circadiana de procesos como proliferación, apoptosis, reparación de ADN, respuesta al estrés y cambios metabólicos, entre otros. En el presente proyecto estudiamos los cambios generados por el horario de restricción calórica (acceso al alimento sólo por 2 h durante 3 semanas) en la presencia de la proteína p53 bajo un ciclo de 24h (luz:oscuridad, 12:12 h) en hígado de rata. Los resultados obtenidos sugieren que el horario de restricción calórica incrementa la concentración del factor transcripcional p53 en la fracción nuclear que podría estar relacionada con los cambios inducidos por este protocolo en la homeostasis del hígado ya que incrementa tanto la tasa de proliferación y apoptosis en células hepáticas.

Resumen aprobado: Christian Molina Aguilar

Ensenada, Baja California, México.

Abril 2016.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	RITMOS BIOLÓGICOS	1
1.2	OSCILADOR SINCRONIZADO POR LUZ (OSL)	2
1.3	OSCILADOR SINCRONIZADO POR ALIMENTO (OSA)	3
1.4	RESTRICCIÓN CALÓRICA.....	5
1.5	MAQUINARIA DEL RELOJ MOLECULAR	6
1.6	FISIOLOGÍA DEL HÍGADO	7
1.7	EL DAÑO AL ADN Y SU REPARACIÓN.....	8
1.8	Proteína p53.....	10
1.9	MECANISMO DE REPARACIÓN DE ADN Y p53	13
1.10	LA PROTEÍNA p53 PRESENTA RITMICIDAD CIRCADIANA	13
2.	ANTECEDENTES	14
3.	HIPÓTESIS.....	17
4.	OBJETIVO.....	17
5.	METODOLOGÍA	18
5.1	FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR.....	19
5.1.1	Homogenado.....	19
5.1.2	Fracción Nuclear	19
5.1.3	Fracción Citosólica	19
5.2	WESTERN BLOT	20
6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	21
7.	RESULTADOS	22
7.1	Cuantificación de p53 en homogenado y fracción citosólica de hígado.....	22
7.2	Cuantificación de p53 en fracción nuclear de hígado.....	25
8.	DISCUSIÓN	26
9.	CONCLUSIÓN.....	30
10.	LITERATURA CITADA	31

1. INTRODUCCIÓN

1.1 RITMOS BIOLÓGICOS

Los ritmos biológicos son oscilaciones de parámetros biológicos dependientes de un reloj endógeno que se ajustan a cambios ambientales (fotoperiodicidad, cambios climáticos estacionales, disponibilidad de alimento, entre otros) que permiten a los organismos organizar temporalmente su comportamiento y metabolismo como una capacidad adaptativa que les permite anticiparse a dichos fenómenos (Preitner *et. al.*, 2002). Los ritmos Biológicos se encuentran a lo largo de la escala evolutiva presentándose desde las bacterias y hongos hasta insectos, plantas y mamíferos. (Vanselow y Kramer 2010).

Uno de los ritmos biológicos más estudiados son los ritmos circadianos (RC), que son oscilaciones de parámetros biológicos que presentan un periodo cercano a 24 h y que van desde la expresión de genes y procesos bioquímicos hasta funciones fisiológicas y patrones conductuales (Vanselow y Kramer 2010). Algunos ejemplos de RC son: los patrones de sueño/vigilia, temperatura corporal, presión arterial, gasto cardiaco, consumo de oxígeno y secreción de glándulas endocrinas (Reppert y Weaver 2002, Vriend y Reiter 2015).

1.2 OSCILADOR SINCRONIZADO POR LUZ (OSL)

En mamíferos existe un núcleo hipotalámico llamado núcleo supraquiasmático (NSQ) que se ajusta a los ciclos de luz/oscuridad. Está conformado por un conjunto de células autónomas que forman 2 núcleos localizados en la parte anterior del hipotálamo encima del quiasma óptico. El estímulo de la luz que reciben las células ganglionares de la retina del ojo es internalizado a través del tracto retinohipotalámico hasta llegar al NSQ donde un sistema de medición a nivel molecular conocido como reloj molecular (RM), el cual consiste en la transcripción/traducción de genes (será descrito más adelante) da temporalidad a este núcleo (Reppert y Weaver 2001, Reppert y Weaver 2002, Challet *et. al.*, 2003, Mendoza *et. al.*, 2010, Challet 2010, Aguilar-Roblero y Díaz-Muñoz 2010) **(Figura 1)**.

El NSQ sincroniza a otros núcleos del cerebro y a órganos periféricos como el hígado, páncreas, estómago, intestino y corazón a través de vías humorales y neuronales. De tal modo que la sincronización de los ciclos de sueño/vigilia, la homeostasis energética, presión arterial, temperatura, actividad renal, metabolismo del hígado y ciclos de actividad/descanso entre otros son formas de medir la sincronización del NSQ y del individuo completo (Pleitner *et. al.*, 2002) **(Figura 1)**.

El NSQ es considerado como reloj maestro, ya que se ha demostrado que en ausencia de estímulos de luz (oscuridad constante) es capaz de continuar ejerciendo una sincronización en el organismo mostrando evidencia de ser autosostenido comparado con órganos periféricos considerados osciladores ya que pierden su ritmicidad al momento de lesionar al NSQ (Buttgereit *et. al.*, 2015) **(Figura 1)**.

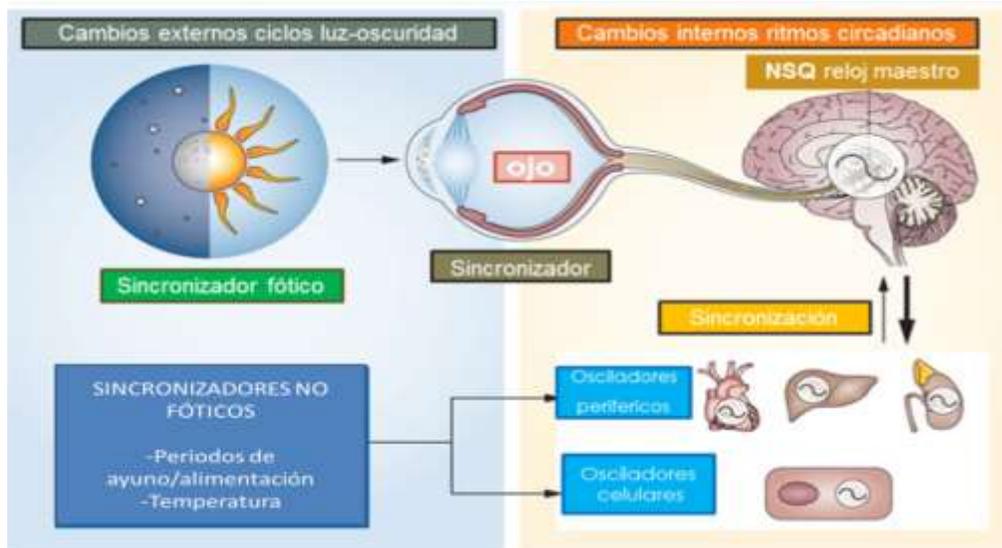


Figura 1. Esquema representativo de los cambios en el medio ambiente que pueden sincronizar a los mamíferos. Los periodos de luz/oscuridad son censados por la retina en mamíferos, esta señalización pasa a través del tracto retinohipotalámico y las enervaciones llegan directamente al NSQ donde se sincronizan las neuronas de este núcleo. El NSQ sincroniza a osciladores periféricos como el hígado, corazón y riñón mediante vías humorales y neuronales. Existen otros sincronizadores no fóticos como los periodos de ayuno/realimentación que sincronizan a los órganos periféricos y que en algunas condiciones específicas puede modificar la sincronización del NSQ (Modificado de Buttgerit *et. al.*, 2015).

1.3 OSCILADOR SINCRONIZADO POR ALIMENTO (OSA)

Además del OSL existe un oscilador sincronizado por alimento (OSA), (Mendoza *et. al.*, 2006) del cual no se sabe el sitio anatómico exacto, pero está formado por la comunicación y retroalimentación entre diferentes áreas del cerebro como el hipotálamo dorsomedial, ventromedial, el núcleo talámico paraventricular y órganos periféricos como el hígado, corazón, páncreas, estómago, intestino, tejido adiposo y músculo esquelético, también algunas glándulas endocrinas (Aguilar-Roblero y Díaz-Muñoz 2010).

Este oscilador emerge a partir de una alimentación periódica que es una señal sólida para sincronizar los ritmos circadianos en órganos periféricos. En mamíferos pequeños como las ratas, cuando el acceso al alimento es restringido por 2 h al día en el periodo de luz, un patrón alternativo de ritmicidad circadiana aparece con respecto al grupo control que

tiene acceso al alimento las 24 h (*Ad Libitum*) presentando actividad en la fase de luz correspondiente a una anticipación a la llegada del alimento conocida como actividad anticipatoria al alimento (AAA) (Aguilar-Roblero y Díaz-Muñoz 2010).

Las ratas bajo acceso restringido al alimento (2 h de acceso diariamente) presentan una ingesta de 30% menos calorías diarias comparadas con las ratas *Ad Libitum*, por lo que también se le conoce como horario de restricción calórica (HRC) (Arellanes-Licea *et. al.*, 2014). El HRC es un estímulo no fótico que tiene la capacidad de sincronizar los órganos periféricos y al NSQ (Mendoza *et. al.*, 2005 Mendoza *et. al.*, 2012) como el hígado que presenta sincronización de procesos metabólicos, ciclo celular, apoptosis y respuesta al estrés (Aguilar-Roblero y Díaz-Muñoz 2010, Mendoza 2009, Challet 2010) **(Figura 2)**.

La expresión de la AAA es un cambio de la actividad locomotora que se usa como una forma de medir la sincronización circadiana asociada a las señales metabólicas de la dieta hipocalórica y el horario de alimentación (Challet 2010). El OSA fue evidenciado cuando se lesionó el NSQ en ratas y se les dio el HRC, presentando la AAA y la sincronización de órganos periféricos al horario de acceso al alimento (Aguilar-Roblero y Díaz-Muñoz 2010).

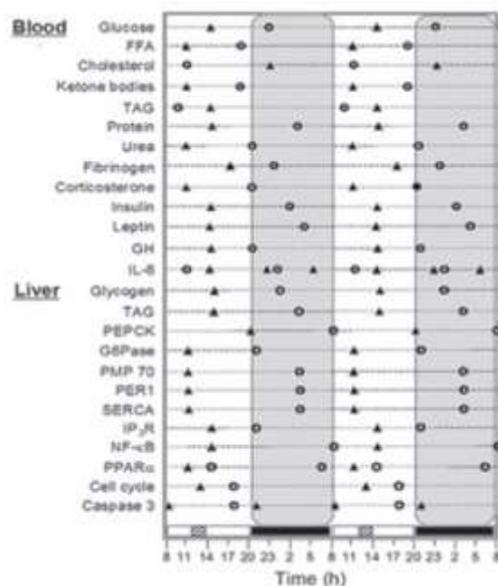


Figura 2. Mapa de fases de doble plot (grafica con días duplicados) que representa los horarios de máxima expresión (acrofase) de parámetros biológicos de animales bajo alimentación ad libitum (círculos) y horarios de alimentación restringida (triángulos). Las barras blancas representan el periodo de luz de 12 horas, barras grises periodo de oscuridad 12 horas, el área sombreada representa el horario de alimentación (12-14 h) (Aguilar-Roblero y Díaz-Muñoz 2009).

1.4 RESTRICCIÓN CALÓRICA

La restricción calórica (RC) sin malnutrición ha sido estudiada en las últimas décadas, ya que se ha demostrado que en especies desde bacterias hasta humanos, incrementan la longevidad de un 20-50%. La evidencia de que la longevidad de los mamíferos podría incrementarse surgió en 1935 en un estudio con roedores, demostrando que la restricción calórica extendió la esperanza de vida media y máxima, en estudios posteriores se demostró que la restricción calórica retrasa la aparición de enfermedades asociadas a la edad como obesidad, demencia, Parkinson, incluyendo enfermedades neoplásicas (Masoro 2005, Mendoza *et. al.*, 2007, Mendoza *et. al.*, 2012 Ramis *et. al.*, 2015).

1.5 MAQUINARIA DEL RELOJ MOLECULAR

Todas las células de nuestro cuerpo tienen la capacidad de sincronizarse a estímulos externos, regulada por un conjunto de genes en los cuales sus procesos de transcripción y traducción tienen una duración de 24 h llamada “reloj molecular” (RM) (Aguilar-Roblero y Díaz-Muñoz 2010).

El RM está constituida por los genes reloj *bmall*, *clock*, *rev-erba*, *per* (1,2 y3) y *cry*(1 y 2) y sus proteínas correspondientes. Estos genes forman 2 asas de transcripción-traducción que tienen retroalimentación positiva y negativa (Preitner *et. al.*, 2002). Las proteínas CLOCK y BMAL1 forman un heterodímero que induce la transcripción de otros genes y proteínas reloj mediante su unión a la caja E (CACGTG) del promotor (Repert y Weaver 2002), actuando como activadores transcripcionales de los genes *rev-erba*, *per* y *cry* además de otros genes que presentan caja E y que están relacionados con metabolismo, respuesta al estrés, ciclo celular, entre otros y que son llamados GCR (genes regulados por el reloj, por sus siglas en inglés).

Las proteínas PER y CRY entran al núcleo inhibiendo la transcripción de los genes *clock* y *bmall* para regular su propia transcripción (Vriend y Reitner 2015, Shearman *et. al.*, 2000) (**Figura 3**).

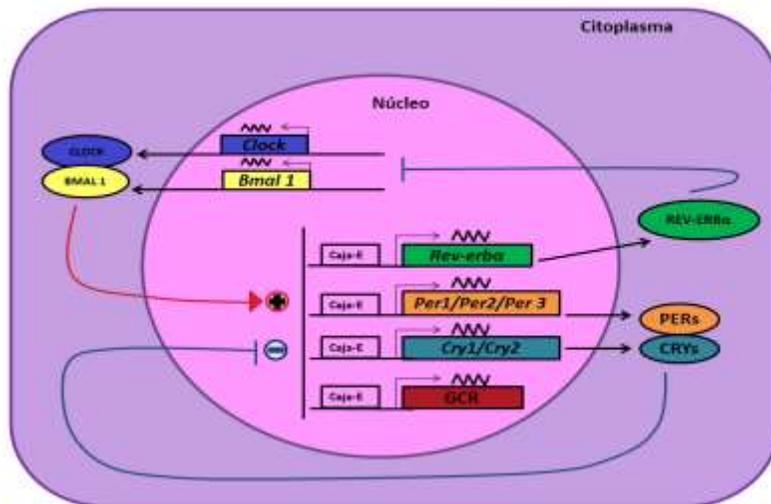


Figura 3. Maquinaria del reloj molecular en los mamíferos. *clock* y *bmal1* se transcriben formando a sus proteínas que forman un heterodímero en el citoplasma y se traslocan al núcleo. El heterodímero CLOCK-BMAL1 se unen a la caja-E localizada en la región promotora de los genes *per* y *cry*, activando su transcripción. Las proteínas PER y CRY forman su heterodímero y regresan al núcleo para inhibir su propia transcripción. Las proteínas CLOCK-BMAL1, también inducen la transcripción del gen *rev-erba* y su proteína inhibe la transcripción de los genes *clock-bmal1*.

1.6 FISIOLÓGÍA DEL HÍGADO

El hígado forma parte de nuestro estudio ya que sus principales funciones son la captación de los nutrientes, que son transportados desde el intestino por la vena porta, además de la biosíntesis y degradación de casi todas las proteínas plasmáticas, el suministro constante de metabolitos al organismo y otras sustancias biosintéticas, la detoxificación de compuestos nocivos por medio de su biotransformación entre otros (Koolmam y Röhm 2004).

En el hígado los hepatocitos representan cerca del 90% de la masa celular y constituyen el sitio central del metabolismo intermediario. Estas células se hallan en estrecho contacto con la sangre que ingresa al hígado por la vena porta y la arteria hepática, ésta fluye a través de sinusoides y es recolectada nuevamente en las venas centrales de los

lobulillos hepáticos. Los hepatocitos son células epiteliales poligonales presentando usualmente 6 lados. Los hepatocitos se reciclan por medio de apoptosis. En las ratas la vida media de los hepatocitos abarca un rango amplio de 191 a 453 días (Huntz y Kuntz, 2008). Los hepatocitos son células autónomas que deciden su replicación y destino (Nelson *et. al.*, 2012).

1.7 EL DAÑO AL ADN Y SU REPARACIÓN

La integridad del genoma es fundamental para las funciones biológicas y la viabilidad celular, sin embargo el material genético de las células eucariotas se encuentra bajo ataques endógenos (estrés oxidativo) o exógenos (radiaciones ionizantes y químicos genotóxicos) constantes causando daño al ADN. Además, el genoma también se ve amenazado por los subproductos del metabolismo celular normal, como especies reactivas de oxígeno (EROS) derivados de la respiración oxidativa y otras reacciones pro-oxidantes, que pueden causar una variedad de daños en el ADN. Se ha estimado que una célula puede sufrir hasta un millón de cambios al ADN por día (Hu y Wang 2014, Clancy 2008, Houtgraaf *et. al.*, 2006). El estrés oxidativo y el daño al ADN son factores que inducen apoptosis en las células. La apoptosis favorece la eliminación de células dañadas (por estrés oxidativo, glucosilación y daño al ADN). La apoptosis se correlaciona con el nivel de la lesión acumulada, su papel es primordial para efectuar un

mecanismo de protección esencial contra la tumorigénesis asociada a la edad (Yoshikazu y Shimokawa 2000) (**Figura 4**).

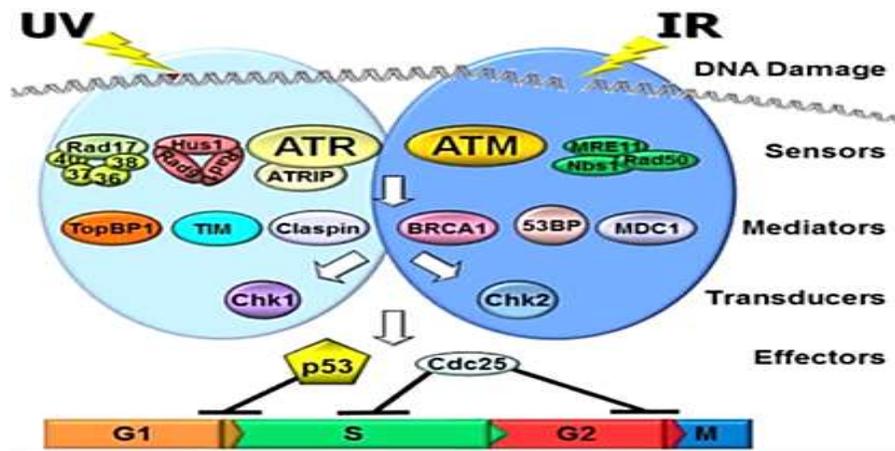


Figura 4. Modelo de vías y sistemas para el control de daños al ADN de mamíferos. Cuando hay daño al ADN por luz ultravioleta UV o radiación ionizante IR se activan sensores como ATR o ATM que inician la cascada de señales. Los sensores activan a mediadores que a su vez activarán a las cinasas Chk1 o Chk2 que traducen las señales activando mediante fosforilación a las proteínas p53 y Cdc25, cuya función es arrestar el ciclo celular para la reparación del daño al ADN (Sancar *et. al.*, 2015).

El daño al ADN activa los puntos de control del ciclo celular que se encargan de detener la proliferación de las células, para permitir la correcta reparación del ADN y evitar la acumulación de mutaciones (Houtgraaf *et. al.*, 2006). Después de la reparación la célula puede continuar con el proceso del ciclo celular, pero si el daño no es reparado o hay un daño severo, el ciclo celular se bloquea de forma permanente y la célula entra en senescencia o apoptosis. Cuando los daños permanecen sin detectarse o no se reparan, esto puede dar lugar a la inestabilidad genómica y mutaciones que pueden generar eventualmente oncogénesis (Houtgraaf *et. al.*, 2006) (**Figura 5**).

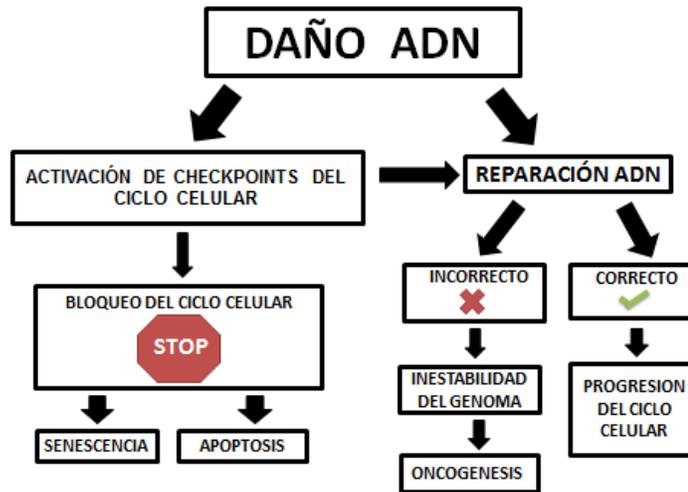


Figura 5. Proceso de reparación del ADN. En el lado izquierdo de la imagen cuando se presenta un daño al ADN se activan los puntos de control del ciclo celular que tienen la función de bloquear el ciclo celular y mandar las células a senescencia o apoptosis. En el lado derecho de la imagen si hay daño al ADN, hay una reparación del daño y puede ser incorrecto y se produce una inestabilidad en el genoma y a su vez oncogénesis. Por otro lado si el daño al ADN es reparado correctamente hay una progresión del ciclo celular (Modificado de Houteraaf *et. al.*, 2006).

1.8 Proteína p53

La proteína p53 es un factor transcripcional que controla la expresión de genes implicados en una diversidad de respuestas fisiológicas como los procesos de reparación, la eliminación de proteínas dañadas, la reparación del ADN, la generación de ATP a través de la fosforilación oxidativa, las funciones de los orgánulos que mantienen la señalización de la autofagia, la función mitocondrial y la división del ciclo celular (Kruse y Gu 2009).

En condiciones fisiológicas, en las células no estresadas la proteína p53 se encuentra niveles bajos en citoplasma (Tang *et. al.*, 2008). Cuando el ADN sufre algún daño resulta esencial inducir la respuesta de la célula ante el daño del ADN y desencadenar procesos de reparación. p53 debe ser activado rápidamente y translocarse al núcleo para

inducir la transcripción de genes relacionados con procesos de reparación de ADN, defensas antioxidantes y de inductores/efectores de apoptosis (Brooks y Gu 2003, Chéne 2003, Tang *et. al.*, 2008, Dimitrio *et. al.*, 2013).

En citoplasma la proteína p53 se encuentra regulada por el inhibidor Mdm2 (murine double minute) que favorece la acción de la enzima ubiquitina ligasa E3 para inducir la degradación de la proteína p53 manteniendo niveles citosólicos bajos, además de inhibir las translocación de p53 al núcleo evitando su función transcripcional. Por otra parte, p53 activa la transcripción de Mdm2 formando un asa de retroalimentación negativa (Kruse y Gu 2009, Brooks & Gu 2011, Dimitrio *et. al.*, 2013) (**Figura 6**).

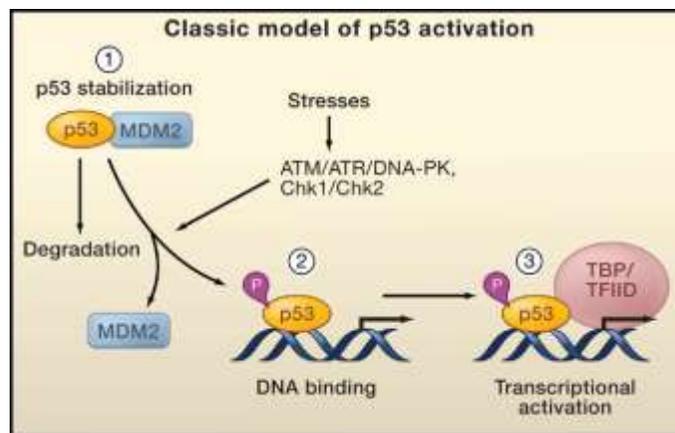


Figura 6. Representación de la activación de p53. Activación de p53 en tres pasos (1) la estabilización de la proteína inducida por la fosforilación, (2) la unión al ADN, y (3) el reclutamiento de la maquinaria transcripcional (Kruse & Gu 2009).

La pérdida de funcionalidad de p53 se traduce en alteraciones en la respuesta al estrés y la acumulación de mutaciones que favorecen el desarrollo del cáncer (Chéne 2003). La importancia de p53 en la homeostasis del tejido se refleja en el hecho de que se

encuentra mutado en más del 50% de los tumores humanos. (Geske *et. al.*, 2000) y por estas razones p53 es conocido como el guardián del genoma y considerado como un importante supresor tumoral (Levine y Oren 2009). Cuando se da alguna agresión a nivel celular, la proteína p53 incrementa su concentración tanto en el citoplasma como en el núcleo inducida por la degradación de Mdm2. Dependiendo del nivel de agresión y sus efectos en la misma célula, la proteína p53 logra diferenciar entre agresiones a nivel fisiológico y agresiones a nivel patológico y dependiendo del tipo de agresión desencadena diferentes procesos de respuesta que van desde un incremento de las defensas antioxidantes hasta senescencia y apoptosis (Levine y Oren 2009) (**Figura 7**).

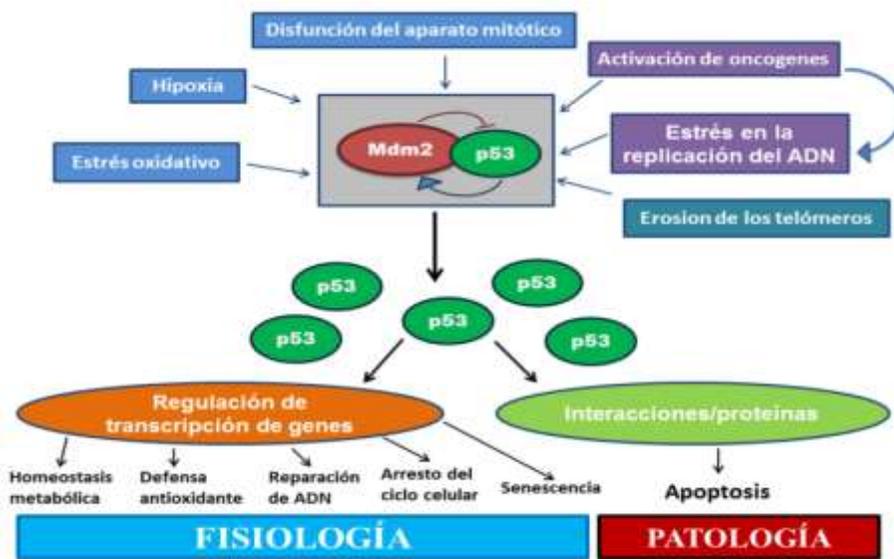


Figura 7. El estrés oxidativo, óxido nítrico, hipoxia, depleción de ribonucleótidos, disfunción del aparato mitótico, activación de oncogenes, replicación del ADN por estrés, rompimiento de la doble cadena, erosión de los telómeros mandan señales a MDM2 que es un inhibidor de p53 entonces MDM2 se degrada y p53 se libera y regula la transcripción de genes o las interacciones de proteínas dependiendo si el daño es medio o severo. Produciendo una homeostasis metabólica, defensa antioxidante, reparación del ADN, arresto del crecimiento celular, senescencia o apoptosis (Modificado de Levine y Oren 2009).

1.9 MECANISMO DE REPARACIÓN DE ADN Y p53

p53 promueve el arresto del ciclo celular proporcionando más tiempo para que la reparación del ADN se lleve a cabo antes de la entrada en la fase S. p53 es esencial en apoptosis inducida por daño al ADN (Smith y Seo 2002). La función de p53 es la capacidad para inducir la detención del ciclo celular en G1, para esto incrementa a p21Waf1 / Cip1, regulando negativamente la ciclina / complejos cdk. p21 es inducida por p53 en tiempos de estrés celular, provisionalmente detiene el ciclo celular, para dar tiempo a la reparación del ADN (Geske *et. al.*, 2000).

1.10 LA PROTEÍNA p53 PRESENTA RITMICIDAD CIRCADIANA

Se ha demostrado una interacción entre el RM y la expresión y actividad de la proteína p53. La proteína *Bmal1* actúa como un supresor tumoral secundario en células de cáncer pancreático ya que cuando se sobreexpresa regula a la alza la activación transcripcional del supresor tumoral p53 disminuyendo la velocidad de proliferación e incrementando la apoptosis en estas células (Hamada *et. al.*, 2014, Jiang *et. al.*, 2016). La mutación de la proteína *Per2* genera una disminución de la proteína p53 (Hamada *et. al.*, 2014). Los niveles de la proteína p53 presentan una oscilación circadiana en epitelio oral de humano y en tejidos de ratón (Horiguchi *et. al.*, 2013) (**Figura 8**).

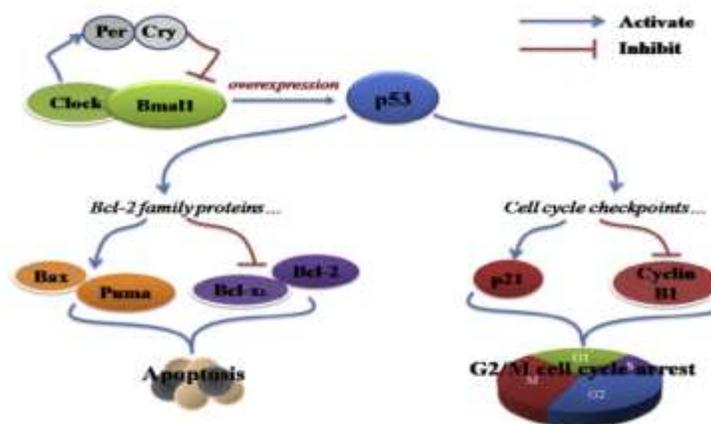


Figura 8. Mecanismo de inhibición e inducción de la proteína p53 por medio de las proteínas reloj Per y Cry en células cancerosas de páncreas. La sobreexpresión de p53 incrementa las proteínas proapoptóticas Bax y Puma además de inhibir a las proteínas antiapoptóticas Bcl-XL y Bcl-2. Por otro lado la proteína p53 induce la transcripción de la proteína p21 cuya función es la de arrestar el ciclo celular y a su vez inhibe la acción de la ciclina B1 cuya función es inducir la entrada al ciclo celular (Jiang *et. al.*, 2014).

2. ANTECEDENTES

En los primeros estudios realizados en ratas con el protocolo de acceso restringido a la alimentación, demostraron que se modifica la conducta y actividad locomotora presentándose un importante incremento de la actividad de 2 a 4 h antes de la presentación del alimento, a esta se le conoce como actividad anticipatoria al alimento (AAA) y es usado como una señal del establecimiento del OSA (Bolles y Stokes 1965).

Cuando se presenta el horario de restricción calórica (HRC) en un periodo de 2 h (12:00-14:00 h) durante 2-3 semanas se presenta una resincronización en los ritmos circadianos en órganos periféricos (Escobar *et. al.*, 1998). El HRC sincroniza el reloj molecular en hígado ya que las proteínas reloj Per1 (**Figura 9a**) y Bmal1 (**Figura 9b**) tienen un cambio de fase presentándose el máximo nivel (acrofase) de la proteína Per1 en el

horario de oscuridad en el grupo AL y en el grupo con HRC su acrofase en el periodo de luz coincidiendo con el horario de acceso al alimento. La proteína BMAL1 presenta su acrofase en el periodo de luz en el grupo AL y en el grupo con HRC se presenta la acrofase en el periodo de oscuridad (Luna-Moreno *et. al.*, 2009, Arellanes-Licea *et. al.*, 2014).

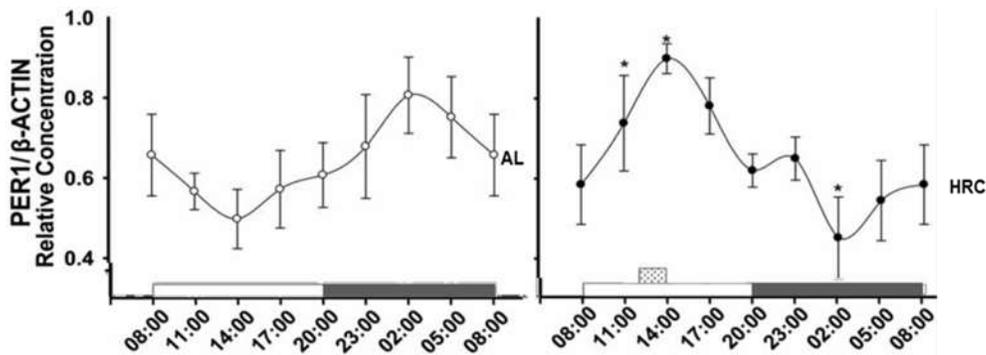


Figura 9a. Expresión de la proteína Per1 en Hígado en el grupo AL y HRC medida a través de la técnica de western blot. La barra blanca indica el periodo de luz y la barra negra el periodo de oscuridad (periodo 12:12). La barra sombreada es el horario de acceso al alimento para el grupo HRC (Luna-Moreno *et. al.*, 2009).

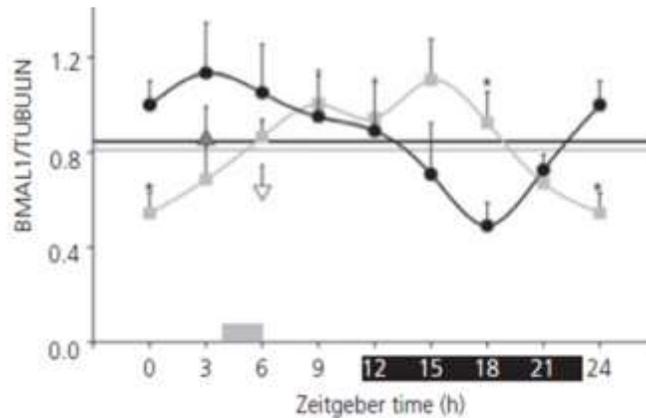


Figura 9b. Expresión de la proteína Bmal1 en hígado en el grupo AL y HRC a través de la técnica de western blot. La barra blanca indica el periodo de luz y la barra negra el periodo de oscuridad (periodo 12:12). La barra gris es el horario de acceso al alimento para el grupo con HRC (Arellanes-Licea *et. al.*, 2014).

La expresión del OSA promueve un nuevo equilibrio entre la proliferación y la apoptosis del hígado ya que ambos procesos se ven incrementados por el HRC, generando así un incremento homeostático en el recambio celular. (Molina-Aguilar *et. al.*, 2012). La actividad de la caspasa-3 usada para identificar la forma efectora de la inducción de apoptosis se vio incrementada en ratas con HRC comparadas con ratas AL, generando además un ritmo ultradiano, al presentarse dos picos en un periodo de 24 h (**Figura 10 a**). Por otro lado los núcleos identificados con (antígeno nuclear de células en proliferación) PCNA se incrementa en ratas con HRC, estos resultados demuestran que las ratas con restricción alimenticia muestran un incremento en los patrones de proliferación y apoptosis sugiriendo un incremento en la dinámica de recambio celular en el hígado (Molina-Aguilar *et. al.*, 2012).

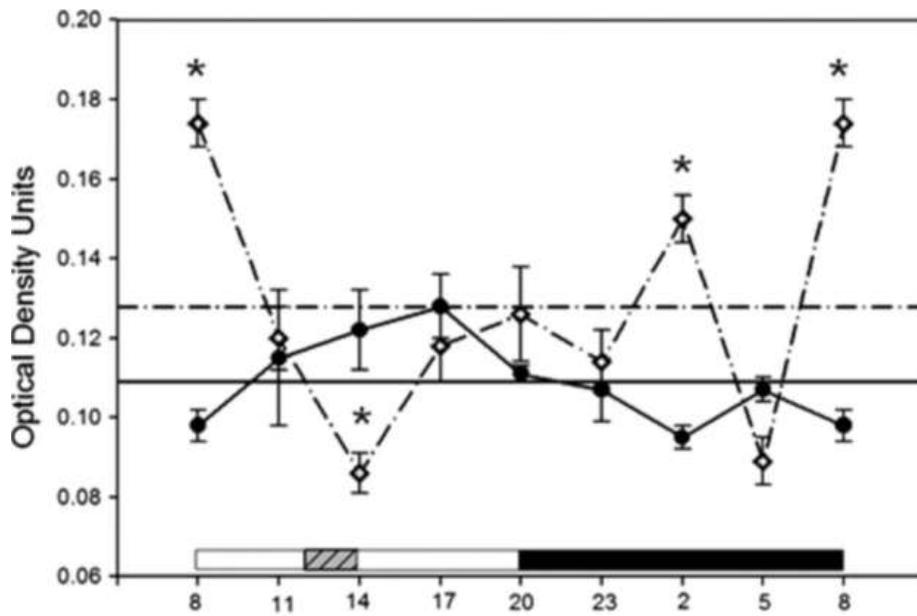


Figura 10a. Actividad de la proteína Caspasa3 en Hígado en el grupo AL y HRC. La barra blanca es el periodo de luz y la barra negra el periodo de oscuridad 12:12. La barra sombreada es el horario de acceso al alimento (Molina-Aguilar *et. al.*, 2012).

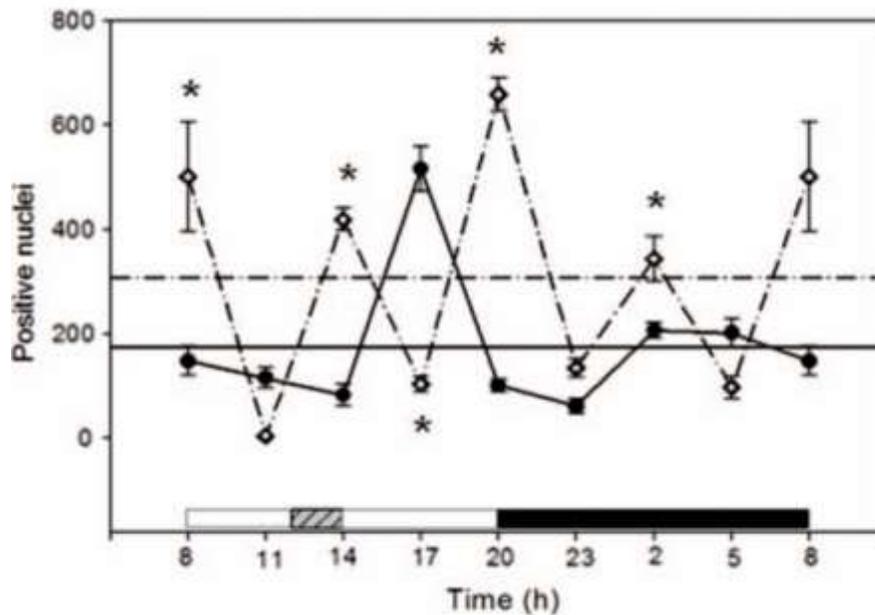


Figura 10b Expresión de la proteína PCNA en Hígado en el grupo AL y HRC. La barra blanca es el periodo de luz y la barra negra el periodo de oscuridad 12:12. La barra sombreada es el horario de acceso al alimento (Molina-Aguilar et. al., 2012).

3. HIPÓTESIS

El horario de restricción calórica genera cambios en la ritmicidad diaria de la expresión de p53 en el hígado.

4. OBJETIVO

Evaluar los cambios generados por el horario de restricción calórica en la expresión de la proteína p53.

Objetivo particular: evaluar la abundancia relativa de la proteína p53 por Western Blot en condición AL y HRC en homogenado de hígado, núcleo y citosol de hepatocitos.

5. METODOLOGÍA

Las ratas macho de la cepa Wistar se utilizaron con un peso de 180 ± 20 g al inicio del experimento, estas ratas y se mantuvieron bajo condiciones de luz-obscuridad 12:12 (el encendido de la luz fue a las 08:00 h). Los tratamientos experimentales se realizaron siguiendo la norma aprobada por “la guía para el cuidado y uso de animales en experimentación” de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y conforme a las normas internacionales de ética recomendadas por Portaluppi *et al.*, 2008. Los animales se colocaron en grupos de 4 ratas por caja de acrílico transparente (40 x 50 x 20 cm) con libre acceso al agua y alimentados con dieta estándar (Rodent Lab Chow 5001, Purina Inc) y con temperatura de $\sim 21^\circ$ centígrados.

Las ratas se asignaron de forma aleatoria en una de dos condiciones durante 21 días: Grupo AL presenta ratas con acceso al alimento 24 h (*Ad Libitum*). El grupo HRC con ratas expuestas a un horario de restricción calórica (acceso al alimento de 12:00 a 14:00 h). Se ha comprobado que 2h de acceso al alimento de forma diaria reduce el consumo ~ 23 -30% de alimento comparado con ratas *Ad Libitum* sin presentar mal nutrición. Se sacrificaron 4 ratas por cada grupo AL y HRC por decapitación cada 3 h, comenzando a las 8 horas hasta completar un perfil de 24 h (diurno) (Honma *et. al.*, 1983 y Arellanes-Licea *et. al.*, 2014).

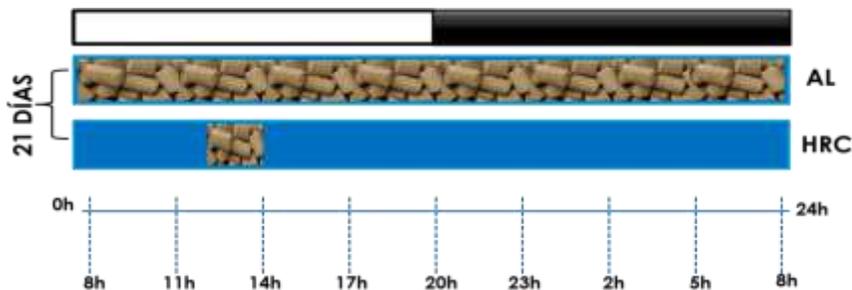


Figura 11. Metodología experimental. La barra blanca significa el periodo de luz y la barra negra el periodo de oscuridad. AL (Ad-Libitum), HRC (Horario de restricción calórica). Se muestran los horarios en que se sacrifican a los animales concluyendo los 21 días del experimento.

5.1 FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR

5.1.1 Homogenado: se obtuvieron ~5 g del hígado y se homogenizó en Buffer A: sacarosa 225 mM, Tris-HCl 10 mM, 1 mM DTT (Ditiotreitol), EGTA (ácido tetraacético etilenglicol) 0.3 mM suplementado con coctel de inhibidores de proteasas (0.1 mM PMSF, 0.1 mM benzamidina, 10 µl de pepstatina A, 1 µg/ml de aprotina, 1 µg/ml de o-fenantrolina y 10 µg/ml de leupeptina) pH 7.4 (No. de catálogo P8340 SIGMA) de esta manera se obtuvo el Homogenado total.

5.1.2 Fracción Nuclear: se utilizó ~1g de hígado y se homogenizó en 5 ml de Buffer A. El homogenado se decantó en 15 ml de Buffer B (Sacarosa 250 mM, Tris-HCl 10 mM) pH 7.5, posteriormente se centrifugó a 3,500 rpm durante 20 min el pellet se resuspendió en 500 µl de Buffer C (40% glicerol, 50mM Tris-HCl, 5mM MgCl₂, 0.1 Mm EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) obteniendo la fracción enriquecida con núcleos.

5.1.3 Fracción Citosólica: el sobrenadante de la fracción nuclear fue centrifugado a 10,000 rpm por 20 minutos el sedimento es la fracción mitocondrial. El nuevo

sobrenadante fue ultracentrifugado a 100,000 rpm por 60 min obteniendo la fracción citosólica en el sobrenadante.

5.2 WESTERN BLOT

Se utilizaron geles de poliacrilamida al 10%. El gel separador inferior se constituyó por 0.05 M TRIS pH 8.8, agua destilada, Tris 0.5 M pH 6.8, SDS 10% (100 ul), Acrilamida 30%, Persulfato de Amonio 10% es un iniciador en la polimerización, TEMED (tetrametiletilendiamina) acelera la polimerización de la acrilamida. Gel concentrador (4%) en 0.125 M TRIS pH 6.8 agua destilada, Tris 0.5 M pH 6.8, SDS 10%, Acrilamida 30%, Persulfato de Amonio 10% es un iniciador en la polimerización, TEMED (tetrametiletilendiamina) acelera la polimerización de la acrilamida. Después se realizó una electroforesis con Buffer de corrida pH 8.3 por 30 min/80 v, seguido de 90 min/120 v.

La transferencia del gel se realizó en membrana de PVDF (polifluoruro de vinilideno) (No.de catalogo IPVH00010 Millipore) se activa en metanol absoluto por un min se utilizó en la fracción de homogenado y fracción citosólica, en la fracción nuclear se utilizó membrana de nitrocelulosa (No. de catálogo 162-0115 BIO-RAD) la transferencia tiene una duración de 40 min a 22 volts en homogenado, en fracción citosólica 35 min 22 volts, fracción nuclear 45 min a 23 volts en la cámara de transferencia, bloqueo 1 hora con leche descremada 5%, 3 lavados de 10 min (Buffer de Lavado PBST).

Las membranas se incubaron toda la noche con los anticuerpos primarios p53 Anti-p53 (ab26 Abcam) a una concentración de 1:1000, GAPDH(Anti-GAPDH ab9485 Abcam) a

una concentración de 1:1000 utilizado como un control de carga en homogenado, fracción citosólica p53 Anti-p53 (ab26 Abcam) a una concentración de 1:1000, β -actina Anti- β -actina (#4970 cell signaling) 1:1000, fracción nuclear p53 Anti-p53 (ab26 Abcam) a una concentración de 1:1000, Lamin B1 Anti-Lamin B1(ab16048 Abcam) a una concentración de 1:1000. Después se realizaron 3 lavados de 10 min (Buffer de Lavado PBST) y se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario Donkey-Anti-mouse (sc2320 Santa Cruz) a una concentración 1:500 en homogenado y 1:1000 en fracción citosólica y nuclear y Donkey-Anti-rabbit (sc2315) a una concentración 1:1000 en homogenado y fracción nuclear en fracción citosólica se utilizó 1:4000, seguido de 3 lavados de 10 min (Buffer de Lavado PBST) y fueron reveladas con BIO-RAD AP Conjugate Substrate Kit (No. de catálogo 170-6432).

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron pruebas de ANDEVA de 1 vía y de 2 vías. Los datos se agruparon por condición experimental y tiempo (valor promedio \pm error estándar). Para detectar ritmicidad se realizó la prueba de ANDEVA de 1 vía. Se realizó la prueba ANDEVA de 2 vías con un factor por grupo (2 niveles) y un factor de tiempo (8 niveles) entre los grupos AL y HRC. Las pruebas de ANDEVA fueron seguidas de la prueba post-hoc Tukey utilizando el programa GraphPad Prism 5, todas las gráficas se realizaron con el programa Sigma Plot 12.0.

7. RESULTADOS

7.1 Cuantificación de p53 en homogenado y fracción citosólica de hígado.

El promedio de la proteína p53 no tuvo cambios en homogenado ni en fracción citosólica de los dos grupos AL y HRC. En ningún horario se presentaron diferencias estadísticas, corroborando que no hay ritmo en ninguno de los dos grupos.

El análisis ANDEVA de una vía no mostró diferencias significativas comparando el grupo AL $F(7,38)=0.483$, $p=0.8405$ y HRC $F(7,38)=0.602$, $p=0.7507$ en fracción de homogenado.

El análisis ANDEVA de dos vías no mostró diferencias significativas en tiempo $F(7,76)=0.777$, $p=0.6081$, alimentación $F(1,76)=2.21$, $p=0.1412$, ni interacción entre tiempo y alimentación $F(7,76)=0.269$, $p=0.9641$, generaron cambios en los niveles de la proteína p53 en la fracción de homogenado (**Figura 11**).

El análisis ANDEVA de una vía no mostró diferencias significativas comparando el grupo AL $F(7,24)=0.09992$, $p=0.9978$ y HRC $F(7,24)=0.3555$, $p=0.9190$ en fracción citosólica (**Figura 11**).

El análisis ANDEVA de dos vías no mostró diferencias significativas en tiempo $F(7,48)=0.25$, $p=0.9707$, alimentación $F(1,48)=0.50$, $p=0.4831$, ni interacción entre tiempo y alimentación $F(7,38)=0.32$, $p=0.9400$, generaron cambios en los niveles de la proteína p53 en la fracción citosólica (**Figura 12**).

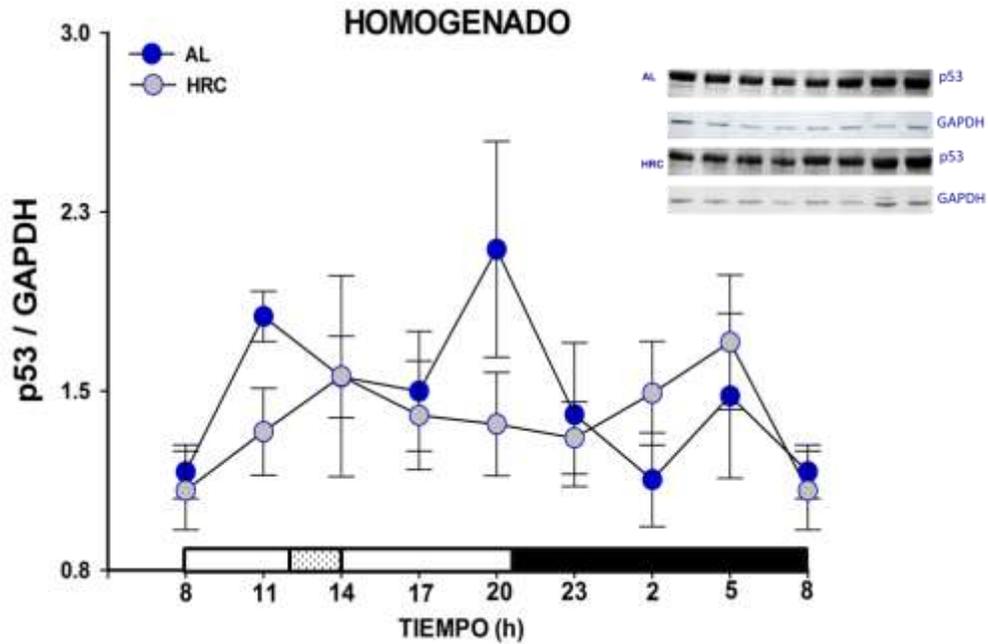


Figura 12. Cuantificación de p53 en homogenado de hígado. En el eje de las Y se muestran los valores normalizados de p53 con GAPDH. En el eje de las X se muestran los horarios a los que se tomaron muestras graficados por tiempo (h). Los círculos azules corresponden al grupo AL y los círculos grises corresponden al grupo HRC. Las barras en cada círculo indican el error estándar ($P > 0.05$). La barra blanca es el periodo de luz y la barra negra el periodo de obscuridad 12:12. La barra sombreada es el horario de acceso al alimento.

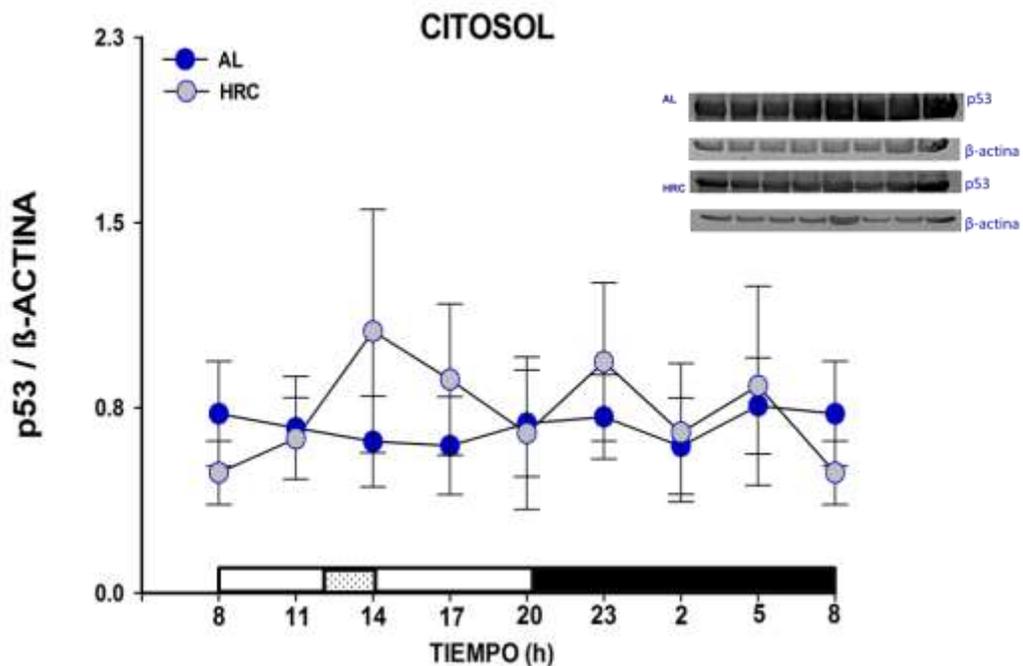


Figura 13. Cuantificación de p53 en fracción citosólica de hígado. En el eje de las Y se muestran los valores normalizados de p53 con β -actina. En el eje de las X se muestran los horarios a los que se tomaron muestras graficados por tiempo (h). Los círculos azules corresponden al grupo AL y los círculos grises corresponden al grupo HRC. Las barras en cada círculo indican el error estándar ($p > 0.05$). La barra blanca es el periodo de luz y la barra negra el periodo de obscuridad 12:12. La barra sombreada es el horario de acceso al alimento.

7.2 Cuantificación de p53 en fracción nuclear de hígado.

Se realizó una prueba (T-student) encontrando diferencias significativas $p=0.0011$, presentándose un aumento de ~48% de la proteína p53 en el grupo HRC comparado con el grupo AL (**Figura 14**).

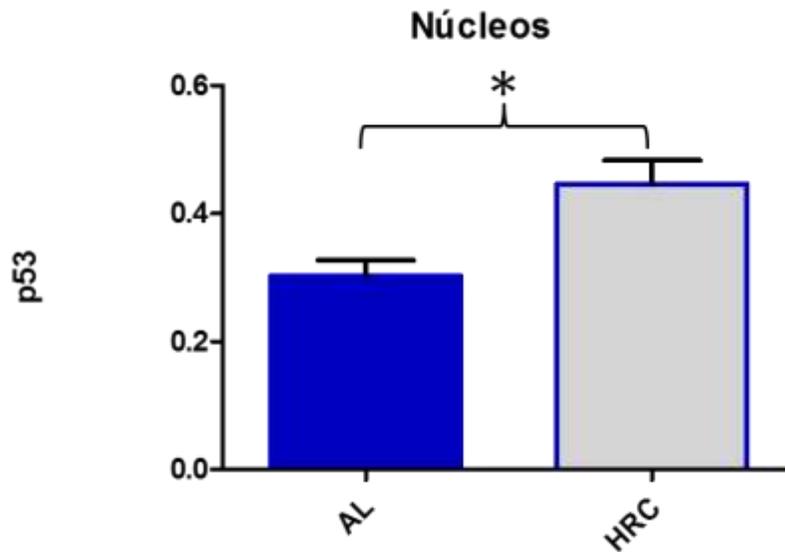


Figura 14. Gráfica del promedio de la proteína p53 en fracción nuclear. El HRC incrementó un 48% a la proteína p53 en fracción nuclear.

El análisis estadístico de ANDEVA de 1 vía $F(7,24)=1.511$, $p=0.2112$ no mostró cambios significativos en los grupos AL y HRC mostrando que no existe una ritmicidad circadiana en la translocación de p53 al núcleo. Por otro lado el análisis de ANDEVA de 2 vías no mostró diferencias en tiempo $F(7,46) = 1.90$, $p = 0.091$, en el grupo HRC, ni en la interacción $F(7,46)=0.69$, $p=0.6836$, la alimentación presenta diferencias significativas $F(1,46)=11.27$, $p=0.0016$, y estos cambios se asocian al periodo del encendido de la luz 5h y 8h (**Figura 15**).

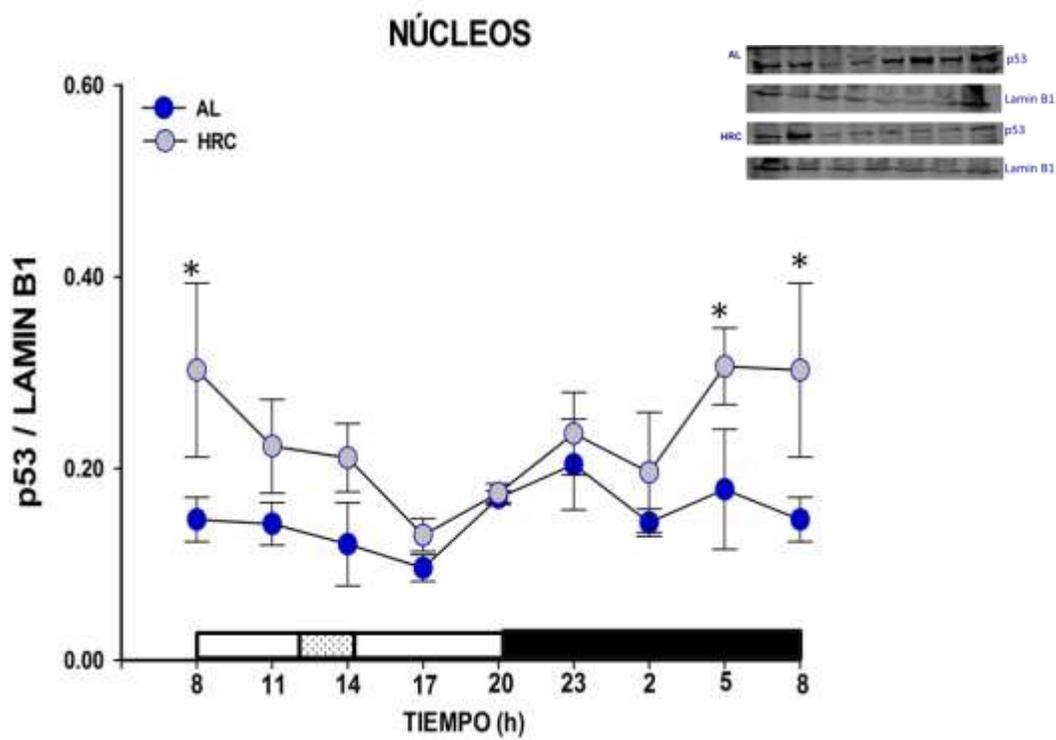


Figura 15. Cuantificación de p53 en fracción nuclear de hígado. En el eje de las Y se muestran los valores normalizados de p53 con Lamin B1. En el eje de las X se muestran los horarios a los que se tomaron muestras graficados por tiempo (h). Los círculos azules corresponden al grupo AL y los círculos grises corresponden al grupo HRC. Las barras en cada círculo indican el error estándar, los asteriscos indican que el horario 8 y 5 h HRC presentan diferencias significativas $p < 0.05$ comparado con el grupo AL. La barra blanca es el periodo de luz y la barra negra el periodo de obscuridad 12:12. La barra sombreada es el horario de acceso al alimento.

8. DISCUSIÓN

La proteína p53 está regulada por modificaciones covalentes como ubiquitinación, fosforilación, metilación y acetilación, es translocada al núcleo para iniciar procesos de reparación al ADN (Tang et. al., 2008, Dimitrio et. al., 2013). El anticuerpo de la proteína p53 utilizado en este trabajo reconoce el epítipo de 213 a 217 aminoácidos sin distinguir cambios postranscripcionales antes mencionados. La proteína p53 juega un

papel muy importante en los procesos de reparación de daño al ADN controlando la proliferación celular y la inducción de apoptosis en condiciones sanas, además se ha evidenciado que la ausencia de esta proteína no solo genera cambios celulares sino incluso fisiológicos y conductuales de tipo circadiano (Hamada et al., 2014). En los últimos años se ha incrementado el interés por conocer la relación que existe entre el reloj molecular y la proteína p53.

Estudios de proteómica en hígado han revelado que existe oscilación circadiana en proteínas solubles hasta de un 50% que no se ve necesariamente reflejado en oscilaciones del correspondiente ARNm. Los estudios proteómicos incluyen la identificación y la cuantificación de proteínas, su localización, modificaciones, interacciones, actividades y de su función. De este modo se han propuestos nuevos niveles de regulación que van desde el nivel transcripcional, traduccional y post-traduccional (Partch *et. al.*, 2014).

Resultados publicados por nuestro grupo de trabajo demuestran que protocolo de HRC sincroniza el reloj molecular (Luna-Moreno *et. al.*, 2009, Arellanes-Licea *et. al.*, 2014), además de modificar la dinámica de algunos de los procesos relacionados con la actividad de ciclo celular y de apoptosis (Molina-Aguilar 2012).

Las ratas que se encuentran bajo acceso al alimento de forma *Ad-Libitum* presentan la acrofase de la proteína Per1 en el periodo de oscuridad (2:00 am) (**Figura 9a**), esta proteína induce la activación de la vía de reparación conformada por ATM/Tim /Chk1 y Chk2 induciendo arresto del ciclo celular, reparación de ADN e incluso apoptosis

(Chen-Goodspeed & Lee 2007). Ya que la reparación del ADN se esperaría que suceda después de la activación de la vía ATM/Tim /Chk1 y Chk2 cerca de las 2:00 am, se observa que el PCNA (proteína marcadora de la fase S) (**Figura 10b**) se presenta a las 5:00 pm, momento para el cual ya se ha reparado el ADN. Cabe señalar que la presencia de p53 en el núcleo de hepatocitos en ratas con acceso al alimento de forma *Ad Libitum* no presentó ritmicidad circadiana (**Figura 15**).

Ya que el heterodímero *CLOCK/BMAL1* inducen la transcripción de p53, (Arellanes-Licea *et. al.*, 2014) demostraron en ratas bajo el protocolo de HRC la proteína BMAL1 tiene su acrofase cerca de las 23h (**Figura 9b**) y la acrofase de p53 en núcleo de ratas con HRC (**Figura 15**) se da entre el horario de las 5 y 8 am, tomando en cuenta el tiempo que tardan los procesos de transcripción/traducción y translocación de p53 al núcleo, se sugiere que efectivamente; los niveles de proteína en núcleo están influenciados por el reloj molecular .

Las alteraciones en la maquinaria del reloj molecular han sido relacionadas con numerosas patologías como el cáncer, sugiriendo una dependencia del ciclo celular al reloj molecular (Masri *et. al.*, 2013). En este estudio evidenciamos que el HRC tiene un efecto importante sobre la translocación de la proteína p53 al núcleo, incrementando un 48% su concentración (**Figura 14**) lo que sugiere un incremento en la capacidad de respuesta de las células hepáticas ante daños provocados al ADN evitando daño celular irreversible.

El proceso de apoptosis o muerte celular programada se da de forma autorregulada con el fin de controlar el desarrollo, crecimiento y diferenciación de los tejidos. Su papel es crucial en la destrucción de células dañadas como en el cáncer, caracterizado por presentar una proliferación descontrolada. Datos recientes han demostrado reloj molecular circadiano regula el proceso de apoptosis : 1) La apoptosis, a través de las expresiones rítmicas de proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 y pro-apoptótica BAX, 2) La detección de daño en el ADN a través de las interacciones moleculares de ATM/ATRIP con proteínas del reloj PER, CRYs y TIM y 3) en la reparación del ADN a través de actividades rítmicas o niveles de O6-ADN metiltransferasa metilguanina, una proteína que esconde las lesiones del ADN alquilados letales producidas por nitrosoureas (Matsunaga *et. al.*, 2011).

En este protocolo se pudo identificar que las ratas con HRC presentan dos picos de actividad apoptótica durante el periodo de oscuridad y por otro lado la translocación de p53 al núcleo presenta también su mayor incremento en el periodo de oscuridad. Ya se ha demostrado que el heterodímero CLOCK/BMAL1 incrementan la tasa de apoptosis, resultados publicados por (Arellanes-Licea *et. al.*, 2014) muestran que el HRC modifica el horario de la acrofase para BMAL1, estando incrementada en el periodo de oscuridad, sugiriendo una correlación directa entre el RM y los niveles de apoptosis a través de la proteína p53 (**Figura 10b**).

9. CONCLUSIÓN

El horario de restricción calórica generó un incremento de la proteína p53 en la fracción nuclear durante el periodo de oscuridad.

La proteína p53 no presenta cambios en homogenado y fracción citosólica.

Los cambios encontrados en p53 fueron inducidos por la ingesta calórica y no por la ritmicidad circadiana.

10. LITERATURA CITADA

- 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, 9-17.
- Arellanes-Licea E., Baez-Ruíz A., Carranza M., Aramburo 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, 282-295.
- Bolles R., Stokes L., 1965. Ra'ts anticipation of diurnal and diurnal feeding. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 60, 290-294.
- Brooks C., Gu W., 2003. Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Current Opinion in Cell Biology*.15, 164-171.
- Brooks C., Gu W., 2011. The impact of acetylation and deacetylation on the p53 pathway. *Protein Cell*. 2(6), 456-462.
- Challet E., Caldelas I., Graff C., Pévet P., 2003. Sinchronization of the Molecular Clockwork by Light- and Food-Related cues in Mamals. *Biological Chemistry*. 384, 711-719.
- Challet E., 2010. Interactions between light, mealtime and calorie restriction to control daily timing in mammals. *Journal of Comparative Physiology B*. 180, 631-644.
- Chen-Goodspeed M., Lee Ch., 2007. Tumor Suppression and Circadian Function. *Journal of Biological Rhythms*. 22, 291-298.

- Chéne P. 2003. Inhibiting the p53–MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 3, 102-109.
- Clancy S. 2008. DNA damage & repair: mechanisms for maintaining DNA integrity. *Nature Education*. 1(1), 103.
- Dimitrio L., Clairambault J., Natalini R., 2013. A spatial physiological model for p53 intracellular dynamics. *Journal of Theoretical Biology*. 316, 9-24.
- 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 Physiology*. 274, 1309-1316.
- Geske F., Nelson A., Lieberman R., Strange R., Sun T., Gerschenson L., 2000. DNA repair is activated in early stages of p53-induced apoptosis. *Cell Death and Differentiation*. 7, 393-401.
- Hamada T., Niki T., Ishida N., 2014. Role of p53 in the entrainment of mammalian circadian behavior rhythms. *Genes Cells*. 19, 441-448.
- Honma, K., Honma S., Hiroshige T., 1983. Critical role of food amount for prefeeding corticosterone peak in rats. *American Journal Physiology*. 245, 339-344.
- Horiguchi M., Koyanagi S., Hamdan A., Kakimoto K., Matsunaga N., Yamashita C., Ohdo S., 2013. Rhythmic Control of the ARF-MDM2 Pathway by ATF4 Underlies Circadian Accumulation of p53 in Malignant Cells. *Cancer Research*. 73, 2639-2649.

- Houtgraaf J., Vermissen J., Van der Giessen W., 2006. A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovascular Revascularization Medicine*. 7, 165-172.
- Hu J., Wang Y., 2014. p53 and the PWWP domain containing effector proteins in chromatin damage repair. *Cell Dev Biol*. 2, 112.
- Huntz E., Kuntz H., 2008. *Hepatology Textbook and atlas Germany*: Springer. 23-27.
- Jiang W., Zhao S., Jiang X., Zhang E., Hu G., Hu B., Zheng P., Xhiao J., Lu Z., Lu Y., Ni J., Chen C., Wang X., Yang L., Wan R., 2016. The circadian clock *Bmall* acts as a potential anti-oncogene in pancreatic cancer by activating the p53 tumor suppressor pathway. *Cancer Letters*. 371, 314-325.
- Koolman J., Röhm K., 2004. *Bioquímica: texto y atlas*. Madrid España. Panamericana. 306-309.
- Kruse J., Gu W., 2009. Modes of p53 Regulation. *Cell*. 137, 602-622.
- Levine A., Oren M., 2009. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nature Reviews Cancer*. 9, 749-758
- 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, 1409-1429.
- Masri S., Cervantes M., Sassone-Corsi P., 2013. The circadian clock and cell cycle: interconnected biological circuits. *Current Opinion in Cell Biology*. 25, 730-734.

- Masoro E., 2005. Overview of caloric restriction and ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*. 126, 913-922.
- Matsunaga N., Kohno Y., Kakimoto K., Hayashi A., Koyanagi S., Ohdo S., 2011. Influence of CLOCK on cytotoxicity induced by diethylnitrosamine in mouse primary hepatocytes. *Toxicology*. 280, 144-151.
- Mendoza J., Graff C., Hugues D., Pevet P., Challet E., 2005. Feeding Cues Alter Clock Gene Oscillations and Photic Responses in the Suprachiasmatic Nuclei of Mice Exposed to a Light/Dark Cycle. *The Journal of Neuroscience*. 25(6), 1514-1522.
- Mendoza J., Pevet P., Challet E., 2007. Circadian and photic regulation of clock and clock-controlled proteins in the suprachiasmatic nuclei of calorie-restricted mice. *European Journal of Neuroscience*. 25, 3691-3701.
- Mendoza J. 2009. Neurobiología del sistema circadiano: su encuentro con el metabolismo. *Suma Psicológica*. 16, 85-95.
- Mendoza J., Challet E., 2010. Metabolic and reward feeding synchronises the rhythmic brain. *Cell Tissue Research*. 341, 1-11.
- Mendoza J., Gormelen S., Dumont S., Sage D., Pevet P., Challet E., 2012. Setting the main circadian clock of a diurnal mammal by hipocaloric feeding. *The Journal of Physiology*. 590(13), 3155-3168.
- Molina-Aguilar C., Pérez-Sánchez J., Vázquez-Martínez O., Rivera-Zavala J., Díaz-Muñoz M., 2012. Restricted food access during the daytime modifies the

24-h rhythmicity of apoptosis and cellular duplication in rat liver. *Biological Rhythm Research*. 43(1), 25-37.

- Nelson F., Campbell J., Riehle K., 2012. Liver regeneration. *Journal of Hepatology*. 57, 692-694.
- Partch C., Green C., Takahash J., 2014. Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends in Cell Biology*. 24(2), 90-99.
- Portaluppi F., Touitou Y., Smolensky M., 2008. Ethical and methodological standars for laboratory and medical biology rhythm research. *Chronobiology International*. 25 (6), 999-1016.
- Preitner N., Damiola F., Lopez L., Zakany J., Doubule D., Albrecht U., Schibler U., 2002. The Orphan Nuclear Receptor REV-ERB α Controls Circadian Transcription within the Positive Limb of the Mammalian Circadian Oscillator. *Cell*. 110, 251-260.
- Ramis M., Esteban S., Miralles A., Tan D., Reiter R., 2015. Caloric restriction, resveratrol and melatonin: Role of SIRT1 and implications for aging and related-diseases. *Mechanisms of Ageing and Development*. 146-148, 28-41.
- Reppert S., Weaver D., 2002. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*. 418, 935-941.
- Sancar A., Lindsey-Boltz L., Gaddameedhi S., Selby C., Ye R., Chiou Y., Kemp M., Hu J., Lee J., Ozturk N., 2015. Circadian clock, Cancer, and Chemoterapy. *Biochemistry*. 54, 110-123.

- Smith M., Seo Y., 2002. p53 regulation of DNA excision repair pathways. *Mutagenesis*. 17(2), 149-156.
- Shearman P., Sriram S., Weaver D., Maywood E., Chaves I., Zheng B., Kume K., Chi Ch., Van der Horst G., Hastings M., Reppert S., 2000. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science*. 288, 1013-1019.
- Tang Y., Zhao W., Chen Y., Zhao Y., Gu W., 2008. Acetylation Is Indispensable for p53 Activation. *Cell*. 133, 612-626.
- Vanselow J., Kramer A., 2010. *The Circadian Clock: Springer*. 79-104
- Vriend J., Reiter R., 2015. Melatonin feedback on clock genes: a theory involving the proteasome. *Journal of Pineal Research*. 58, 1-11.
- Yoshikazu H., Shimokawa I., 2000 Apoptosis in the aging process. *Cell Tissue Research*. 301, 125-132.