

# GLUCONEOGÉNESIS: UNA VISIÓN CONTEMPORÁNEA DE UNA VÍA METABÓLICA ANTIGUA\*

Moisés Pérez-Mendoza, Dalia De Ita-Pérez y Mauricio Díaz-Muñoz

Instituto de Neurobiología, Campus UNAM-Juriquilla, Querétaro 76230, QRO. México  
Correo E: barrales.hebert@colpos.mx

## RESUMEN

La gluconeogénesis (GNG) es la ruta metabólica que permite la síntesis de glucosa a partir de sustratos no glúcidos, principalmente en el hígado. La vía como tal, apareció temprano en la filogenia de los seres vivos, pero actualmente se le relaciona primariamente con la respuesta al ayuno (se activa) y a la alimentación (se inhibe) en organismos vertebrados. Las enzimas clave del proceso, fosfoenolpiruvato carboxicinasa y glucosa 6-fosfatasa se encuentran sujetas a una compleja regulación endocrina y transcripcional. Otro tipo de regulación ejercida sobre la GNG es a través del reloj circadiano molecular, que le confiere ritmicidad con un periodo cercano a las 24 h. La GNG en el hígado se lleva a cabo principalmente en los hepatocitos periportales. Varias patologías, entre ellas la diabetes, existe desregulación en la GNG.

## ABSTRACT

Gluconeogenesis (GNG) is a metabolic pathway that allows the generation of glucose from non-glycosidic substrates such as amino acids, lactate and glycerol. GNG appeared very early in the phylogenetic development of living beings. In vertebrates it is active during fasting, and inhibited after feeding. The two principal enzymes of the process, phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose 6-phosphatase, are regulated for a complex network of endocrine and transcriptional factors. GNG is also modulated by the circadian molecular clock which communicates 24-h rhythmicity to the process. Within the liver, GNG is more active in periportal than pericentral hepatocytes. Several diseases, such as diabetes, show deregulation of the GNG.

## PALABRAS

### CLAVE:

Metabolismo de carbohidratos, hígado, piruvato carboxilasa, fosfoenol-piruvato carboxicinasa, zonación metabólica, hormonas.

### KEY WORDS:

Carbohydrates metabolism, liver, pyruvate carboxylase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, metabolic zonation, hormones.

Existen rutas metabólicas bien establecidas en los libros de texto desde hace décadas. La gluconeogénesis (GNG), que se define como la formación de glucosa a partir de sustratos diferentes a los glúcidos, se ubica en esta categoría. Sin embargo, aunque ya se cuenta con un conjunto de conceptos plenamente aceptados por la comunidad científica sobre el proceso gluconeogénico, el avance constante de la investigación biomédica básica detecta periódicamente peculiaridades bioquímicas y aspectos metabólicos novedosos que continúan enriqueciendo nuestra perspectiva. Esta revisión intenta dar cuenta de hallazgos recientes sobre el surgimiento, la naturaleza y la regulación de la GNG, haciendo evidente nuevos enfoques y aplicaciones en el quehacer médico relacionados con esta vía.

## 1) LA VÍA

La GNG consta de una serie de reacciones enzimáticas de aparición temprana en el surgimiento y consolidación de los seres vivos en nuestro planeta. Culmina con la síntesis neta de glucosa partiendo de sustratos diversos como aminoácidos, lactato y glicerol. En los vertebrados, se le asocia como parte de la respuesta al ayuno y es clave para el mantenimiento de la glucemia, aunque la glucosa generada también puede terminar incorporada al glucógeno hepático en ciertas condiciones post-absortivas. El hígado es el principal órgano, aunque no el único, en donde se lleva a cabo la GNG. La vía se ha detectado, aunque en mucha menor escala, en tejido renal y epitelio intestinal.

La GNG se relaciona y coordina con otras rutas

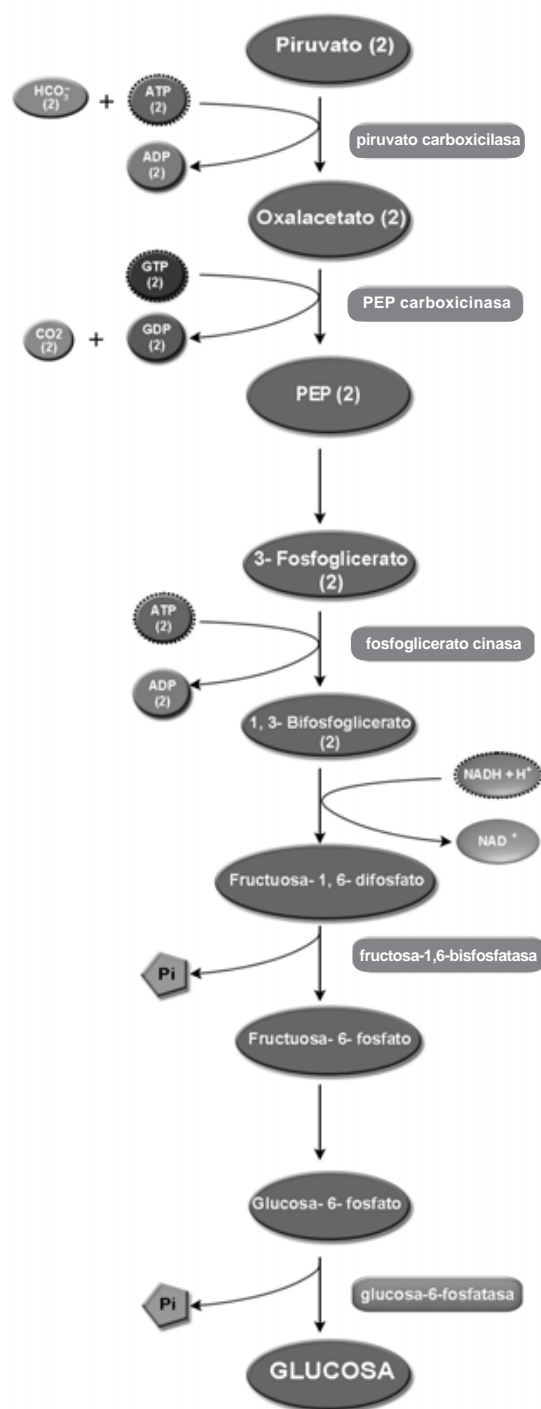
metabólicas como la glucólisis, el ciclo de Krebs y el ciclo de la urea. En la Figura 1 se ilustra un esquema con la ruta gluconeogénica, en donde se observa que sustratos como el lactato y la alanina se transforman primariamente en piruvato (todos ellos formado por 3 átomos de C), y eventualmente se encausan hasta su conversión en glucosa (6 átomos de C). Varias de las reacciones de la GNG son compartidas con la glucólisis, ya que no tienen impedimento termodinámico para ser reversibles. La GNG se caracteriza por la presencia y actividad de 4 enzimas que no participan en la glucólisis, y que por lo tanto son distintivas de la actividad gluconeogénica (1):

1. Piruvato carboxilasa: Enzima mitocondrial dependiente de biotina que forma oxaloacetato, en una reacción que se considera anaplerótica del ciclo de Krebs. Es modulada alostéricamente de forma positiva por acetil-CoA.
2. Fosfoenolpiruvato carboxicinasas: Enzima mitocondrial y/o citoplásmica, según la especie. En una reacción dependiente de energía convierte al oxaloacetato en fosfoenolpiruvato.
3. Fructuosa 1,6-bisfosfatasa: Metaloenzima que convierte al intermediario bifosfatado de la fructosa en su forma monofosfato. El AMP y la 2,6-fructosa bisfosfato actúan como inhibidores.
4. Glucosa 6-fosfatasa: Enzima intrínseca de membrana localizada en el retículo endoplásmico, permite al hígado aportar glucosa al torrente sanguíneo.

Estas enzimas se encuentran reguladas a múltiples niveles (ver siguientes secciones), pero un aspecto interesante de destacar es que el hígado siempre presenta un nivel basal de sus actividades, sin importar la condición alimenticia o la influencia endocrina.

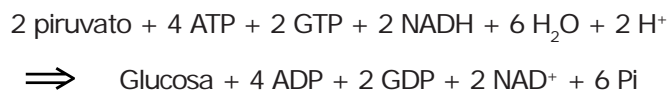
La GNG es también susceptible de ser regulada por el estado redox celular. La reacción reversible catalizada por la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (enzima común para la glucólisis y la GNG) requiere coenzima oxidada ( $\text{NAD}^+$ ) para la glucólisis y reducida ( $\text{NADH}$ ) para la GNG (Fig. 1). Por lo tanto, la GNG se favorece en un estado redox reducido (relación  $\text{NAD}^+ : \text{NADH}$  de 500:1 en el ayuno) en comparación con un estado redox oxidado (relación  $\text{NAD}^+ : \text{NADH}$  de 700:1 después de comer).

La incorporación del glicerol (3 átomos de C), proveniente de la actividad lipolítica, a la ruta gluconeogénica, se realiza por su conversión a fosfato de dihidroxiacetona, mediante la acción secuencial de las enzimas glicerol cinasa y glicerol 3-fosfato deshidrogenasa.



**Figura 1.** Elementos constituyentes y moduladores de la vía gluconeogénica del hígado.

La ecuación general que engloba las reacciones gluconeogénicas partiendo del piruvato y culminando con la síntesis de glucosa es la siguiente:



## II) EVOLUCIÓN

Reportes recientes han puesto en evidencia que la GNG o elementos centrales de esta vía metabólica están presentes en micro organismos quimio-lito-autótrofos, de aparición muy temprana en la filogenia de nuestro planeta. Estos procariontes anaerobios, con capacidad de fijar CO<sub>2</sub>, obtienen energía a partir de la oxidación de compuestos inorgánicos como el hierro y el azufre, siendo las bacterias nitrificantes ejemplos bien conocidos. El metabolismo intermediario de estos organismos está centrado en la síntesis y manejo de la acetil-CoA; estos organismos son capaces de formar fosfoenolpiruvato por una serie de reacciones de fijación de CO<sub>2</sub>, y además manejan el ciclo de Krebs de manera reductiva (se produce NADH, no NAD<sup>+</sup>). El punto clave es que en un conjunto de arqueobacterias y de eubacterias termofílicas se ha detectado la expresión de una fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa/fosfatasa que hace posible la formación de hexosas (como la fructosa bisfosfato) a partir de triosas lábiles (gliceraldehído fosfato y dihidroxiacetona fosfato), que son susceptibles de convertirse al compuesto tóxico metilglioxal. Esta enzima bifuncional, muy conservada y estable en altas temperaturas, pudiera representar una enzima gluconeogénica ancestral (2). Una interpretación interesante de la actividad unidireccional de la enzima fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa/fosfatasa, y de otros estudios de filogenia molecular, es que en la ruta Embden-Meyerhof-Parnas del metabolismo de glucosa, la actividad gluconeogénica (anabólica) haya precedido a la actividad glucolítica (catabólica).

## III) REGULACIÓN HORMONAL-TRANSCRIPCIONAL

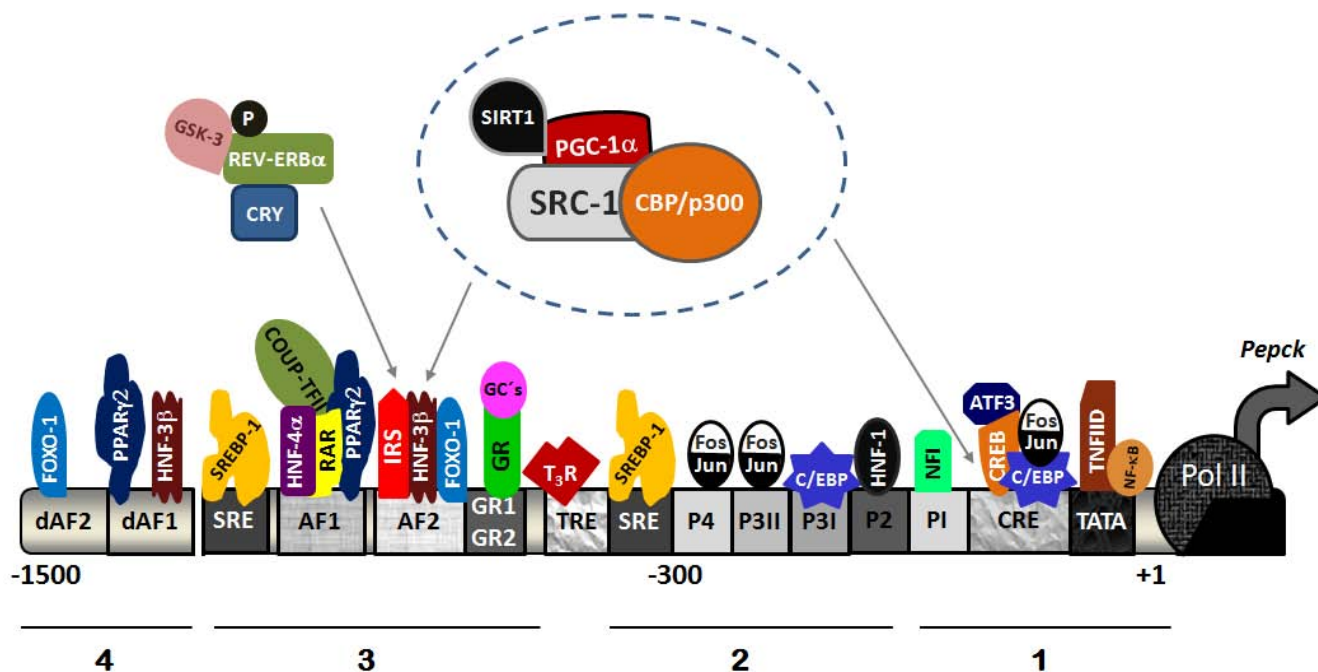
En los organismos, las hormonas que son secretadas por un tipo celular específico en un órgano viajan en la circulación sanguínea y regulan las funciones celulares de otros tejidos u órganos. Esta regulación implica una respuesta a la señalización endocrina que puede ser por modificaciones post-traduccionales, liberación de iones o a nivel transcripcional. En el último caso, la hormona activa un factor de transcripción específico, el cual se une a su correspondiente elemento de respuesta genómico, inhibiendo o activando genes blanco. La acción coordinada de hormonas secretadas por varios tejidos se aprecia al estudiar el mantenimiento del nivel de glucemia. La concentración de glucosa es mantenida dentro de un rango muy definido (independiente del ayuno o la alimentación), por un delicado balance entre la absorción

intestinal, la producción de glucosa por el hígado (gluconeogénesis) y la utilización de glucosa por los tejidos periféricos.

La ruta gluconeogénica es catalizada por varias enzimas, sin embargo destacan 2: la fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK) y la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa). La PEPCK es la primera enzima de la vía mientras que la G6Pasa es la última. La enzima PEPCK cataliza la conversión del oxaloacetato a fosfoenolpiruvato (PEP), y su actividad es afectada por la regulación hormonal a nivel de la transcripción ya que no se conocen modificadores alostéricos. Por otro lado, la enzima G6Pasa juega un papel importante en la formación de glucosa libre a partir de glucosa-6-fosfato (G6P). La G6P es un intermediario metabólico de encrucijada, ya que además de participar en la GNG-glucólisis, interviene en el metabolismo del glucógeno y en el ciclo de las pentosas. La expresión genética de estas 2 enzimas se modula a la alta por varias hormonas, entre ellas el glucagon (proviene del páncreas) y los glucocorticoides (proviene de la corteza adrenal) que son secretados principalmente durante el ayuno. También, el ácido retinoico y las hormonas tiroideas favorecen la transcripción del gen *PEPCK*. En contraste, la insulina que es liberada por las células  $\beta$  pancreáticas cuando hay disponibilidad de alimento, es el principal represor transcripcional de los genes de las enzimas PEPCK y G6Pasa.

## IV) FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXICINASA (PEPCK)

La transcripción del gen *Pepck* en el hígado está sujeta a regulación por múltiples factores tanto coactivadores como correpresores que se unen a la región promotora, y que son activados y reclutados por la acción secuencial y coordinada de las hormonas implicadas (Fig. 2). Entre los coactivadores que regulan su transcripción se incluyen: la proteína de unión al CREB (CBP), el coactivador del receptor de esteroides tipo 1 (SRC-1), el coactivador del PPAR $\gamma$  tipo 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ). Se ha sugerido que el factor SRC-1 interacciona con HNF-4 $\alpha$  ("hepatic nuclear factor-4 $\alpha$ "), COUP-TFII ("chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II") y con HNF-3 $\beta$ , los cuales son todos necesarios para una inducción transcripcional máxima por parte de los glucocorticoides, formando así un gran complejo transcripcional con CBP. Por otro lado, el glucagon induce el aumento en los niveles del mensajero de PGC-1 $\alpha$ , siendo PGC-1 $\alpha$  un estimulador de la transcripción de *Pepck*. Sin embargo, la transcripción de *Pepck* ocurre aun sin PGC-1 $\alpha$  (niveles basales) sugiriendo que actúa como un amplificador



**Figura 2.** Factores de transcripción que se unen al sitio promotor de *Pepck*. Elemento regulado por AMPc (CRE); RNA polierasa II (Pol II); elementos reguladores que interaccionan con miembros de la familia C/EBP (PI, P2, P3I, P3II, P4); elemento regulado por esteroides (SRE); elemento de respuesta a hormonas tiroideas (TRE); unidades reguladas por glucocorticoides (GR1, GR2); factores accesorios (AF1, AF2); factores accesorios distales (dAF1, dAF2); factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B); factor de transcripción IID (TFIID); heterodímero (Fos/Jun); proteína de unión aceleradora/CAAT (C/EBP); proteína de unión del elemento regulado por AMPc (CREB); factor de transcripción activado 3 (ATF3); factor nuclear 1 (NF1); factor nuclear hepático (HNF-1, HNF-3 $\beta$ , HNF-4 $\alpha$ ); proteína de unión al elemento regulado por esteroides (SREBP-1); receptor de la hormona tiroidea T3 (T<sub>3</sub>R); glucocorticoides (GC); receptor de glucocorticoides (GR); factor de transcripción forkhead (FHKR o FOXO); receptor activado por el proliferador peroxisomal gamma 2 (PPAR $\gamma$ 2); receptor de ácido retinoico (RAR); factor de transcripción del promotor de ovoalbúmina de pollo tipo II (COUP-TFII); secuencia regulada por insulina (IRS); coactivador del receptor de esteroides tipo 1 (SRC-1); sirtuina 1 (SIRT1); coactivador de PPAR gamma tipo 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ); proteína de unión a CREB/p300 (CBP/p300); cinasa de la glucógeno sintasa tipo 3 (GSK-3); criptocromo (CRY); proteína del receptor nuclear (REV-ERB $\alpha$ ); grupo acetilo (Ac). Las flechas significan que la proteína o complejo proteínico se une a las proteínas señaladas favoreciendo (+) o inhibiendo (-) el evento transcripcional. Los números indican que son isoformas diferentes. Adaptado de referencia 3.

transcripcional para este gen. También, la acción de la enzima sirtuina 1 (SIRT1) al deacetilar a PGC-1 $\alpha$  promueve la transcripción por el ensamblaje del complejo transcripcional que incluye al SRC-1 y al CBP/p300. Sin embargo, se ha propuesto que el PGC-1 $\alpha$ , junto con FOXO-1 ("forkhead box proteína O1") y HNF-4 $\alpha$ , participa en la inhibición promovida por insulina de la transcripción del gen *Pepck*. La SIRT1 y el NAD<sup>+</sup> favorecen la disminución de la actividad de FOXO-1. Mientras, que el CBP al interactuar con el NF-1, C/EBP $\beta$ -B1, Sp1 y con SREBP-1c inhibe su transcripción (3).

El promotor del gen *Pepck* comprende 4 regiones (Fig. 2). La región I presenta una caja TATA, crucial para la transcripción basal y un elemento regulador de AMPc (CRE) a través del cual el AMPc ejerce su efecto estimulador en la transcripción de

*Pepck*. Otros factores que se unen a esta región incluye al NF-1, CREB, CREM, C/EBP, Fos/Jun, ATF-3 y AT-4. La región II es importante para la regulación de tejidos específicos, tiene un dominio que une a HNF-1 y que es requerido para la expresión renal de PEPCK y un elemento regulador que interacciona con miembros de la familia C/EBP de factores de transcripción en sitios conocidos como P3(1). El sitio P3(1) es también necesario para la inducción del gen *Pepck* en respuesta a la triyodotironina (T3), al AMPc, y a la proteína de unión al CRE (CREB), que interactúa con el coactivador tipo 1 del receptor de esteroides (SRC-1) al ser reclutado por el receptor tiroideo (TR) en presencia de T3. La región III, contiene una unidad regulada por glucocorticoides (GRU), que contiene 2 sitios regulatorios (GR1 y GR2), 2 sitios (AF1 y AF2) que



unen al receptor del ácido retinoico (RAR), una secuencia regulada por la insulina (IRS), el factor nuclear hepático tipo 3 $\beta$  (HNF-3 $\beta$ ) y -4 $\alpha$ , el elemento que une al factor transcripcional promotor de la ovoalbúmina de pollo (COUP-TF), y los sitios para receptores activados por el factor proliferador peroxisomal PPAR $\gamma$ 2. Además, 2 sitios de unión al SREBP-1 localizado en ambas regiones II y III que permiten la regulación por la insulina disminuyendo la expresión del gen *Pepck*. La región IV, contiene elementos reguladores que están implicados en la expresión del tejido adiposo del gen *Pepck*. Aquí se ha detectado un sitio de unión a PPAR $\gamma$ 2, que es requerido para la expresión de *Pepck*, en el tejido adiposo blanco así como el pardo. Otros factores que se unen a los sitios de unión dAF son FOXO-1 y HNF-3 $\beta$  (4).

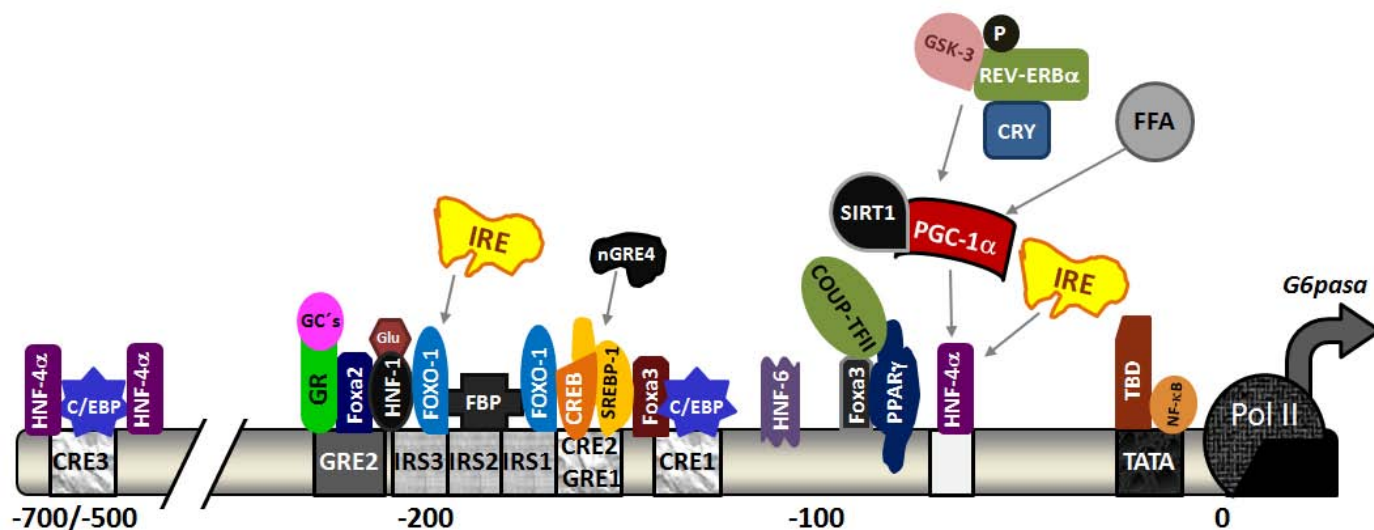
El estudio de los mecanismos responsables de la regulación de la transcripción del gen *Pepck* por la acción de la insulina ha sido un campo de mucho interés por más de 50 años. En 1963, Shrago y colaboradores publicaron el primer análisis sistemático de la regulación de la expresión génica de *Pepck* por hormonas, incluyendo a la insulina. Observaron que en hígados de ratas diabéticas, la actividad de la PEPCK aumentaba, y que al inyectar insulina la actividad disminuía hasta niveles basales. Estos estudios fueron de suma importancia en la predicción de que durante la diabetes se estimulaba la expresión de *Pepck*, debido a una elevación en los niveles de AMPc, y a la falta de acción inhibitoria de la insulina. Otro factor enzimático importante en la regulación de la PEPCK es la glucógeno sintasa cinasa tipo 3 (GSK-3), que al fosforilar a la enzima glucógeno sintasa (GS) provoca que disminuya su actividad y por lo tanto que se reduzca la formación de glucógeno. Con respecto a la regulación de la PEPCK, al disminuir la GSK-3 se ha observado que también disminuye la expresión de *Pepck* (3). Otros factores que disminuyen la expresión de *Pepck* (también de G6Pasa) es la proteína reloj "cryptochrome" tipo 1 (CRY1), al interactuar con la subunidad  $\alpha$  de las proteínas G e interferir en su señalización (5) y el receptor nuclear estimulado por las proteínas de reloj (REV-ERB $\alpha$ ), el cual se une a la región del elemento de respuesta a receptores nucleares (RORE) e impide la unión de otros factores de transcripción que favorecen la expresión de *Pepck*, además de reprimir directamente a PGC-1 $\alpha$  (6).

## V) GLUCOSA-6-FOSFATASA (G6Pasa)

La G6Pasa está localizada en el retículo endoplásmico y es un sistema con estructura cuaternaria

que consta de una subunidad catalítica y transportadores para G6P y glucosa. El gen para G6pasa, tiene regiones promotoras que inducen su expresión en respuesta a múltiples factores: elementos de respuesta a glucocorticoides, al AMPc estimulado por glucagón, la misma glucosa, los ácidos grasos libres y a la insulina (Fig. 3).

Hay 3 elementos que favorecen la expresión de G6pasa por medio del receptor a glucocorticoides (GR) que se unen a HNF-1 y -4, factores que se unen al CRE y a FKHR (FOXO-1a), que son esenciales para su completa inducción. El único factor que inhibe la respuesta de los glucocorticoides es el nGRE4 con una baja afinidad. La unidad de respuesta a insulina (IRU, por sus siglas en inglés) disminuye la transcripción de G6pasa, y está compuesta por las regiones A y B. La región A funciona como un elemento accesorio para la unión de HNF-1. La región B contiene 3 elementos de respuesta a insulina (IRE) denominados IRE-1, -2 y -3. Así el FOXO-1a une a IRE-1 con una alta afinidad y a IRE-2 con baja afinidad, pero con similar importancia para la respuesta de la insulina. Sin embargo, IRE-3 no reconoce a FOXO-1a. Además, la respuesta del promotor de G6pasa a AMPc depende de la cooperación entre las regiones proximal y distal, e involucra a HNF-4 $\alpha$ , los sitios de unión a C/EBP y a CREB. De forma similar, el PGC-1 $\alpha$  actúa en conjunto con el HNF-4 $\alpha$  y el GR para inducir la expresión de G6pasa. La insulina actúa vía la cinasa Akt/PKB fosforilando e inactivando a PGC-1 $\alpha$ , con la intermediación de TORC2 fosforilado. El coactivador TORC2 interactúa con CREB favoreciendo la expresión de PGC-1 $\alpha$  en respuesta al glucagón durante el ayuno permitiendo un incremento en G6pasa. Por otro lado, la isoforma  $\alpha$ 2 de la cinasa AMPK reduce la expresión de G6pasa al fosforilar e inhibir a TORC2. El factor transcripcional FOXO-1 es otro potente estimulador de la transcripción de G6pasa, siendo más efectivo que para *Pepck* (7). La glucosa por medio de sus elementos de respuesta en el promotor de G6pasa, coadyuva a su expresión al interactuar con HNF-1. Otro factor enzimático es la GSK-3, su acción en la expresión de la G6pasa es similar que con la *Pepck*, que al disminuir la GSK-3 también disminuye la expresión de G6pasa (3). Los ácidos grasos libres (FFA, por sus siglas en inglés) también contribuyen de forma positiva a la expresión de G6pasa. Los FFA más abundantes durante el ayuno son el palmitato y el oleato. El palmitato favorece el reclutamiento de varios factores como PPAR $\gamma$ , HNF-4 $\alpha$ , HNF-3 $\beta$ , C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , SREBP-1, FOXO, CREB, NF-kB y COUP-TF, los cuales incrementan la expresión de G6pasa (8).



**Figura 3.** Factores de transcripción que se unen al sitio promotor de *G6pasa*. Elementos regulados por AMPc (*CRE1*, *CRE2*); RNA polimerasa II (*Pol II*); elementos regulados por glucocorticoides (*GRE1*, *GRE2*); secuencias reguladas por insulina (*IRS1-3*); factor nuclear  $\kappa$ B (*NF- $\kappa$ B*); proteína de unión a la secuencia TATA (*TBD*); proteína de unión aceleradora/CAAT (*C/EBP*); proteína de unión del elemento regulado por AMPc (*CREB*); factores nucleares hepáticos (*HNF-1*, *HNF-4 $\alpha$* , *HNF-6*); elemento de respuesta a insulina (*IRE*); proteína de unión al elemento regulado por esteroides (*SREBP-1*); glucosa (*Glu*); receptor de glucocorticoides (*GR*); factor de transcripción forkhead (*FHFR* o *FOXO*); receptor activado por el proliferador peroxisomal gamma (*PPAR $\gamma$* ); factor de transcripción del promotor de ovoalbúmina de pollo (*COUP-TFII*); sirtuina 1 (*SIRT1*); coactivador de *PPAR* gamma tipo 1a (*PGC-1 $\alpha$* ); cinasa de la glucógeno sintasa tipo 3 (*GSK-3*); criptocromo (*CRY*); proteína de receptor nuclear (*REV-ERB $\alpha$* ); ácidos grasos libres (*FFA*); grupo acetilo (*Ac*); grupo fosfato (*P*). Las flechas significan que la proteína o complejo proteínico se une a las proteínas señaladas favoreciendo (+) o inhibiendo (-) el evento transcripcional. Los números indican que son isoformas diferentes. Modificada de referencia 8.

## VI) REGULACIÓN NUTRICIONAL Y CIRCADIANA

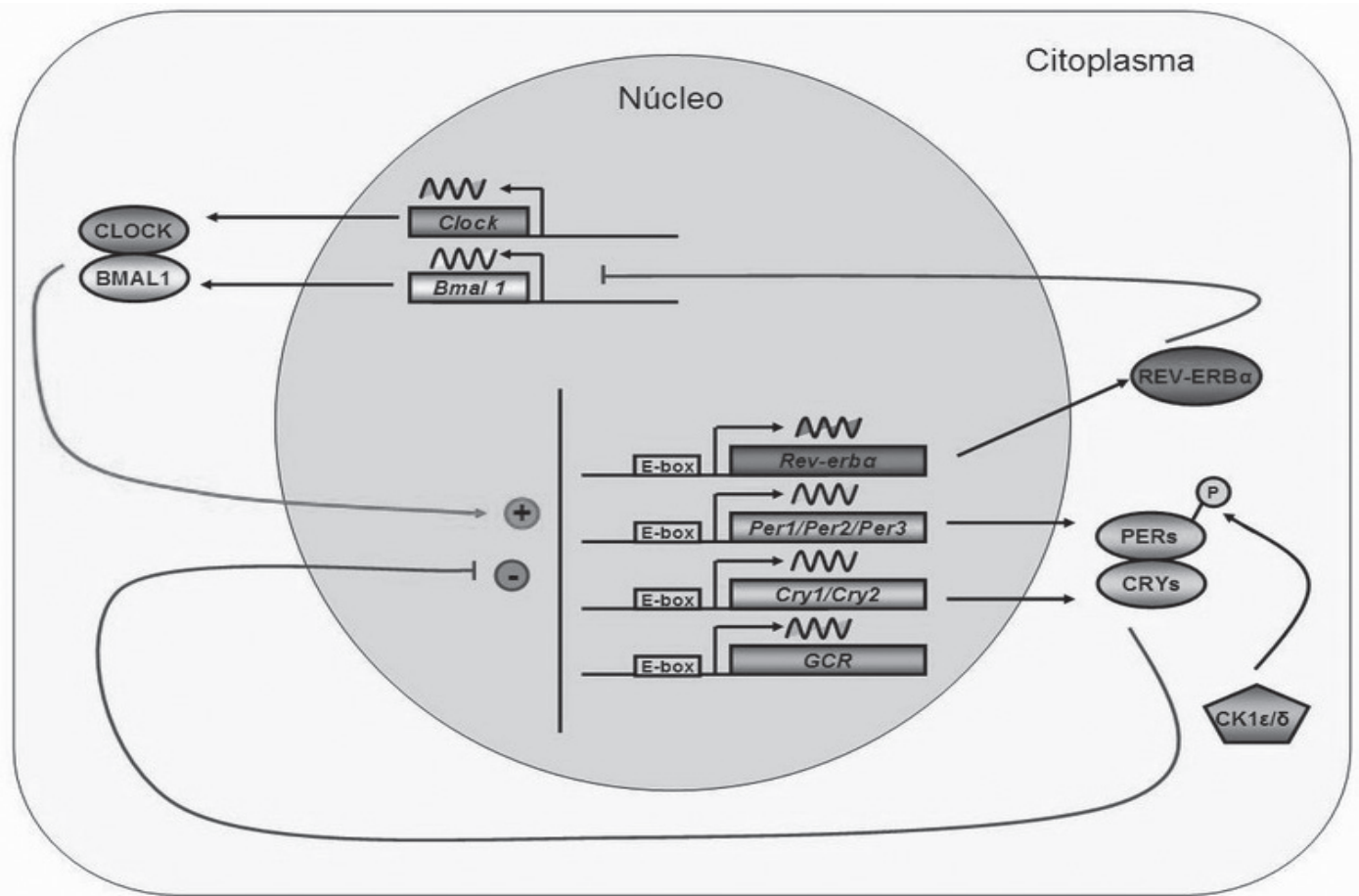
La homeostasis de glucosa debe estar muy bien regulada para asegurar las demandas de energía durante los ciclos ayuno/alimentación en los animales. En este contexto, es bien sabido que la GNG hepática es la vía metabólica principal que mantiene normales los niveles de glucosa en sangre durante períodos prolongados de ayuno.

Varias funciones biológicas en los mamíferos, incluida la alimentación, son controladas por el reloj circadiano, localizado en el núcleo supraquiasmático (NSQ) hipotalámico. El NSQ coordina a los relojes periféricos ubicados en diversos órganos, como el hígado, a través de señales nerviosas, sinápticas y humorales. La ritmicidad circadiana se sustenta en un mecanismo molecular presente en cada una de las células del organismo, donde se involucran asas de retroalimentación transcripción-traducción de una familia de genes denominados reloj (Fig. 4).

Los ritmos circadianos y el estado energético en el organismo están íntimamente ligados, lo cual se ha evidenciado por el descubrimiento de que el receptor hormonal nuclear huérfano (NRH) alfa erb

reverso (*REV-ERB- $\alpha$* ) y los receptores huérfanos de ácido retinoico (*ROR  $\alpha$*  y  *$\beta$* ) constituyen un asa de retroalimentación corta que controla la transcripción de *Bmal1* (brain and muscle aryl hydrocarbon nuclear translocator like) (9) (Fig. 4). Tanto *PPAR $\alpha$*  como *PGC1 $\alpha$* , modulan la transcripción de *Bmal1* a través de la misma asa, indicando que *REV-ERB- $\alpha$*  es un punto esencial para la entrada metabólica en el reloj molecular. En este sentido, la GNG se ve abolida por la delección de *Bmal1* y se atenúa en los ratones mutantes del gen *Clock* (10). Además, la proteína *CRY* regula los cambios circadianos de la GNG hepática al inhibir la producción de AMPc estimulado por el glucagón, lo cual posiblemente es debido a la interacción con la subunidad *G $\alpha$*  de una proteína G (11) (Fig. 5).

Otros estudios han demostrado que la dieta tiene un gran impacto en la fisiología de los relojes periféricos. Damiola y col. (12) reportaron que cambios en la alimentación cambian el patrón circadiano de expresión génica en el hígado, pero no en el NSQ. Los nutrientes de la dieta, y la forma de tener acceso al alimento, son estímulos que repercuten directamente en los relojes periféricos. Estudios en humanos que siguieron un protocolo



**Figura 4.** Mecanismo molecular del reloj circadiano. Se conforma por un asa de retroalimentación positiva, integrada por los genes *Clock* y *Bmal1* y 2 asas de retroalimentación negativa. Una de las cuáles se integra por los genes *Period* (*Per*) y *Cryptochrome* (*Cry*) y la otra por el gen *Rev-erb α*, respectivamente. Una vez que los genes *Clock* y *Bmal1* son transcritos y traducidos, sus proteínas en el citoplasma forman un heterodímero que se transloca al núcleo y autorregula de manera positiva su propia transcripción. Por otro lado, los genes *Per* y *Cry*, cuyas proteínas en el citoplasma se heterodimerizan entre sí y se activan por la caseína cinasa épsilon (*CKε*), se translocan al núcleo e inhiben su propia transcripción. Además, la proteína *REV-ERB α* cuya proteína en el citoplasma se transloca al núcleo, regula negativamente la transcripción de los genes reloj *Clock* y *Bmal1*. Adaptado de referencia 9.

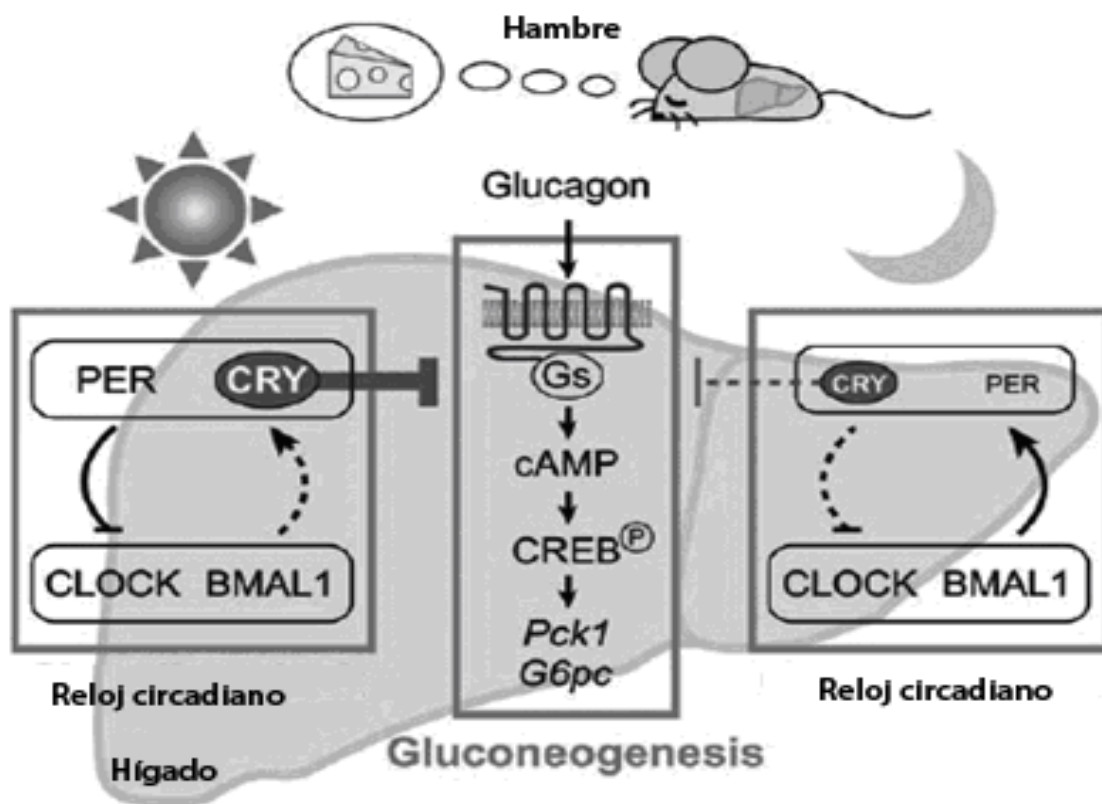
de alimentación con restricción calórica, mostraron una modificación del metabolismo hepático con un incremento de la GNG y cetogénesis. Estas acciones se asociaron a un aumento en la disponibilidad de sustratos gluconeogénicos como el lactato y aminoácidos, así como a un estímulo en la  $\beta$ -oxidación mitocondrial. Estos experimentos demostraron que la composición dietética, el tamaño de la ración de alimento, y la hora en la que se come, pueden impactar la regulación circadiana del control metabólico.

## VII) REGULACIÓN CELULAR Y ZONAL

El hígado es el órgano central del metabolismo, y en apariencia su histología parece ser homogénea. Sin embargo, diversos estudios histoquímicos y

bioquímicos han mostrado diferencias entre los hepatocitos que integran la unidad anatómica y funcional del hígado –el lóbulo o acino hepático– (Fig. 6). Dichas diferencias incluyen tanto la presencia como la concentración de diversas enzimas implicadas en varias vías metabólicas. A este fenómeno se la ha denominado zonación metabólica o heterogeneidad funcional (13).

El acino hepático se divide en 3 regiones: i) una zona externa denominada región periportal (PP) o zona 1, integrada por la población de hepatocitos que rodea a la triada portal, compuesta por una ramificación de la arteria hepática (HA), por la vena porta (PV) y por un conducto biliar (BD); ii) una zona intermedia o zona 2, la cual es una región de transición entre la zona más externa y la más interna y iii) una zona interna, llamada re-



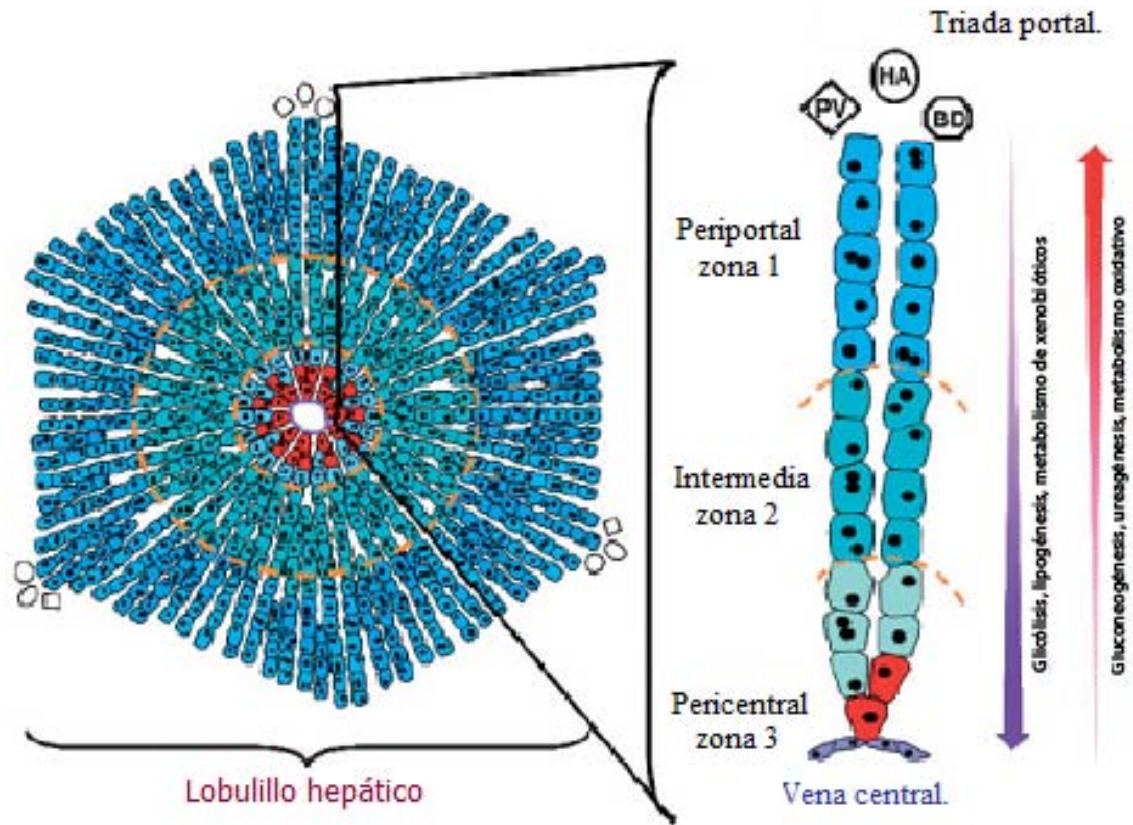
**Figura 5.** La proteína reloj CRY regula la gluconeogénesis en el hígado. Las asas de retroalimentación circadianas (recuadros laterales) están constituidas de los activadores transcripcionales CLOCK y BMAL1 y los represores PER y CRY. En el hígado de ratones, el heterodímero CLOCK-BMAL1 activa la expresión de los genes *Per* y *Cry* en la noche temprana (recuadro derecho). Una vez traducidas, las proteínas PER y CRY inhiben la actividad de CLOCK-BMAL1 por la mañana (recuadro izquierdo) formando un asa de retroalimentación negativa que presenta un ciclo por día. La señal de hambre induce la gluconeogénesis a través de la activación de la señal de cAMP/CREB –unión del elemento de respuesta a cAMP– (recuadro central). CRY inhibe la producción de cAMP estimulada por glucagón, a través de la interacción de este con la subunidad  $G_s$  de una proteína G. La ritmicidad circadiana de los niveles de CRY da pie al programa gluconeogénico con el ayuno. Por la mañana cuando los niveles de CRY son elevados, la respuesta es discreta (recuadro izquierdo), mientras que en la noche temprana cuando los niveles de CRY son bajos y los ratones normalmente empiezan a comer, la respuesta es elevada (recuadro derecho). Adaptado de referencia 11.

gión pericentral (PC) o zona 3, conformada por los hepatocitos que circundan a la vena central (Fig. 6). Estas características anatómicas permiten un mayor aporte de oxígeno, nutrientes, sustratos metabólicos y hormonas a la zona PP, respecto a la zona PC. Esta situación determina un gradiente enzimático a lo largo del acino que permite a determinadas vías metabólicas llevarse a cabo de manera preponderante en una u otra región del eje portal-venoso. De esta forma, se sabe que la glucólisis, lipogénesis y metabolismo de xenobióticos son mayoritarios en la zona PC, mientras que la GNG, ureagénesis y metabolismo oxidativo se realizan primordialmente en la zona PP (Fig. 6). Es de suma importancia mencionar que la zonación metabólica es dinámica más que estática, lo que permite al hígado adaptarse a alguna alteración metabólica, tal como el ayuno prolongado.

Durante la fase post-absortiva entre las comidas, el glucógeno es primeramente degradado a glucosa en la zona PP; posteriormente la glucosa se oxida a lactato en la zona PC. El lactato es liberado a la circulación y transportado a la zona PP, donde se utiliza para la GNG. En la fase absortiva después de las comidas, la glucosa pasa por alto a los hepatocitos PP y es capturada por los hepatocitos PC y ahí se convierte en glucógeno. Cuando las reservas de glucógeno están al límite en los hepatocitos PC, la glucosa es degradada a lactato, el cual deja el hígado, recircula al área PP y es capturado y convertido vía GNG a glucosa y eventualmente a glucógeno (13).

Rajas y col. (14) observaron por inmunohistoquímica la distribución de las enzimas gluconeogénicas PEPCK y G6Pasa en el acino hepático, en animales con alimentación *ad libitum* y en animales con ayuno de 48 h. Encontraron que en los animales *ad libitum*,





**Figura 6.** Diagrama de la unidad microanatómica del hígado. El lóbulo o acino hepático. A lo largo del eje portavenoso, los hepatocitos se dividen en 3 zonas: periportal, intermedia y pericentral, cada una alrededor de referencias anatómicas específicas como la triada portal (conformada por la vena portal, una ramificación de la arteria hepática y un conducto biliar) y la vena central. Tal disposición, les confiere gradientes enzimáticos de diversas vías metabólicas. Adaptado de referencia 15.

la enzima G6Pasa se presenta con muy baja concentración en la zona PP, incrementando su expresión en la misma zona durante el ayuno y extendiéndose sutilmente en la zona PC. En tanto, la PEPCK presentó una evidente zonación PP tanto en los animales *ad libitum*, como en los ayunados, pero en éstos se hace también muy evidente también en la zona PC. Lo anterior, refleja un gradiente enzimático de la zona PP a la PC, en el que la zona gluconeogénica no solo se intensifica, sino que se amplía a lo largo del acino, cuando se incrementa la capacidad gluconeogénica del hígado en periodos de ayuno.

Las poblaciones de hepatocitos en el acino hepático también muestran una heterogeneidad estructural al ser examinados bajo el microscopio electrónico. Estas diferencias se manifiestan en el tamaño de las células hepáticas en cada región zonal, así como en el tamaño y cantidad de organelos en cada población: en los hepatocitos PP las mitocondrias son más grandes que en los hepatocitos PC, mientras que hay una mayor proporción de retículo endoplásmico liso y lisosomas en los hepatocitos PC (Tabla 1).

Estas diferencias son muy importantes, ya que algunas enzimas de la GNG tienen una localización subcelular específica. Tal es el caso de la PEPCK que cataliza, como ya se mencionó, la conversión de oxalacetato a fosfoenolpiruvato. Existen 2 formas de la PEPCK, la citosólica y la mitocondrial, codificadas por 2 diferentes genes nucleares. Se ha propuesto que la PEPCK mitocondrial lleva a cabo la GNG a partir de oxaloacetato; mientras que la PEPCK citosólica lleva a cabo la GNG a partir de aminoácidos glucogénicos como la alanina (5).

Además, algunos coactivadores transcripcionales como el PGC-1 $\alpha$ , que regula los genes implicados en el metabolismo energético mitocondrial, se ha relacionado con la regulación en la producción de glucosa hepática. En animales ayunados se induce su expresión en el hígado, propiciando una regulación a la alta de las 2 enzimas, PEPCK y G6Pasa (16).

Por lo anterior, podemos concluir que la zonación hepática optimiza la actividad metabólica y el uso de la energía celular al hacer posible la separación

parcial de procesos antagónicos en diferentes células, como la GNG y la glucólisis.

### VIII) IMPLICACIONES CLÍNICAS Y PERSPECTIVAS

Se reconoce una extensa variedad de afecciones de carácter metabólico en las que existe GNG alterada. Entidades patológicas como la obesidad, la diabetes y el llamado síndrome metabólico, se caracterizan por promover niveles elevados de glucosa sanguínea, aún en estados de ayuno. Esta circunstancia que conlleva a graves implicaciones al estado de salud general, y que se convierte en un factor de pronóstico reservado, se asocia a un incremento de la GNG hepática, así como de la actividad glucogenolítica (hidrólisis del glucógeno hepático). Por supuesto, el aumento de GNG se asocia a una desregulación de la vía, ya sea por una pérdida de sensibilidad a la señalización por insulina, o a una exacerbación de la señalización por glucagon. Entre los múltiples blancos farmacológicos que se han visualizado en los últimos años para disminuir o mitigar la producción de glucosa por el hígado, se encuentran inhibidores de las enzimas gluconeogénicas fructuosa 1,6-bisfosfatasa y glucosa 6-fosfatasa (1).

Otra situación que eventualmente puede favorecer el aumento de la GNG en estados alterados de salud, es el incremento de sustratos gluconeogénicos que acompañan ciertos padecimientos. En esta categoría se encuentra la actividad lipolítica elevada, que se traduce en un incremento en el glicerol circulante, además de una mayor disponibilidad de ácidos grasos libres cuya oxidación en el hígado favorece la GNG. Condiciones que favorecen la liberación de aminoácidos del tejido muscular como la fatiga excesiva y estados de caquexia, aumentan la disponibilidad de alanina que también

sirve como sustrato gluconeogénico.

Se ha reconocido en los últimos años una cascada de respuestas transcripcionales que se inician en el retículo endoplásmico (mediadas por factores tales como PERK, ATF4 y ATF6, entre otros) en situaciones de estrés metabólico, que se conoce como respuesta reticular. La respuesta reticular en el hígado se ha asociado con el desarrollo de la diabetes y la obesidad. Recientemente se reportó una conexión directa entre la respuesta reticular y un incremento en la GNG, mediada por una disminución en la actividad de la cinasa dependiente de AMP (AMPK) y un aumento simultáneo en la actividad y expresión del factor C/EBP $\beta$ . El conjunto de ambas acciones resulta en un incremento de la transcripción de las enzimas gluconeogénicas (17). Estos eventos forman parte de algunas de las alteraciones propias del estado diabético y de la ganancia incrementada de peso corporal que repercuten en la señalización intracelular responsable del incremento en la producción de glucosa por parte del hígado en estas condiciones patológicas.


La ingesta de etanol tiene un efecto inhibitorio sobre la GNG. El mecanismo de acción del etanol para ejercer esta acción es consecuencia de su metabolismo, ya que al servir de sustrato a la enzima alcohol deshidrogenasa genera un desbalance en el equilibrio redox, tanto citosólico como mitocondrial. El estado redox altamente reducido (aumento de NADH en los 2 compartimentos) promovido por el etanol incide sobre el equilibrio de reacciones que favorecen la transformación de intermediarios gluconeogénicos hacia otros metabolitos. Por ejemplo, el piruvato se convierte en lactato y el oxaloacetato en malato. El resultado final es un decremento en la actividad de la GNG, que coadyuva a la hipoglicemia que frecuentemente caracteriza a los consumidores de bebidas etílicas. 

TABLA 1  
Heterogenidad morfológica de las células hepáticas.

Zona periportal (PP) o zona 1		Zona pericentral (PC) o zona 3	
Hepatocitos	pequeños	Hepatocitos	grandes
Mitocondria	grandes	Mitocondria	pequeñas
Membrana del Golgi	↑	Membrana del Golgi	↓
Glicógeno del Golgi	↑	Glicógeno del Golgi	↓
Retículo endoplásmico liso	↓	Retículo endoplásmico liso	↑
Lisosomas	↓	Lisosomas	↑

La flecha hacia arriba ( ↑ ) indica una cantidad mayor del organelo o componente. La flecha hacia abajo ( ↓ ) indica una cantidad menor del organelo o componente.

## REFERENCIAS

1. Nuttall FQ, Ngo A, Gannon MC (2008) Regulation of hepatic glucose production and the role of gluconeogenesis in humans: is the rate of gluconeogenesis constant? *Diabetes Metab Res Rev* 24: 438-458.
2. Fuchs G (2011) Alternative pathways of carbon dioxide fixation: insights into the early evolution of life? *Annu Rev Microbiol* 65: 631-658.
3. Chakravarty K, Cassuto H, Reshef L, Hanson RW (2005) Factors that control the tissue-specific transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase-c. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 40: 129-154.
4. Chakravarty K, Hanson RW (2008) Insulin regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase-C gene transcription: The Role of Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c. *Nut Rev* 65: S47-S56.
5. Zhang EE, Liu Y, Dentin R, Pongsawakul PY, Liu AC, Hirota T, Nusinow DA, Sun X, Landais S, Kodama Y, Brenner DA, Montminy M, Kay SA (2010) Cryptochrome mediates circadian regulation of cAMP signaling and hepatic gluconeogenesis. *Nat Med* 16: 1152-1156.
6. Yin L, Wu N, Lazar MA (2010) Nuclear receptor Rev-erba: a heme receptor that coordinates circadian rhythm and metabolism. *NRS* 8: 1-6.
7. Yabaluri N, Bashyam MD (2010) Hormonal regulation of gluconeogenic gene transcription in the liver. *J Biosci* 35: 473-484.
8. Xu C, Chakravarty K, Kong X, Tuy TT, Arinze IJ, 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. *J Nutr* 137: 554-559.
9. Bass J, Takahashi JS (2010) Circadian integration of metabolism and energetics. *Science* 330: 1349-1354.
10. Kennaway DJ, Owens JA, Voultsios A, Boden MJ, Varcoe TJ (2007) Metabolic homeostasis in mice with disrupted Clock gene expression in peripheral tissues. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: 1528-1537.
11. Hatori M, Panda S (2010) CRY links the circadian clock and CREB-mediated gluconeogenesis. *Cell Res* 20: 1285-1288.
12. 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 Dev* 14(23): 2950-61.
13. Katz NR (1992) Metabolic heterogeneity of hepatocytes across the liver acinus. *J Nutr* 122: 843-849.
14. Rajas F, Jourdan-Pineau H, Stefanutti A, Mrad EA, Iynedjian PB, Mithieux G. (2007) Immunocytochemical localization of glucose 6-phosphatase and cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase in gluconeogenic tissues reveals unsuspected metabolic zonation. *Histochem Cell Biol* 127(5): 567.
15. Burke ZD, Tosh D (2006) The Wnt/ $\beta$ -catenin pathway: master regulator of liver zonation? *BioEssays* 28: 1072-1077.
16. Hanson RW, Reshef L (1997) Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annu Rev Biochem* 66: 581-611.
17. Choudhury M, Qadri I, Rahman SM, Schroeder-Gloeckler J, Janssen RC, Friedman JE (2011) C/EBP $\beta$  is a AMP kinase sensitive and up-regulates PEPCK in response to ER stress in hepatoma cells. *Mol Cell Endocrinol* 331: 102-108.