



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**CARACTERIZACIÓN CIRCADINA Y FUNCIONAL DEL SISTEMA SEROTONINÉRGICO EN
HÍGADO DE RATA DURANTE LA EXPRESIÓN DEL OSCILADOR SINCRONIZADO POR EL
ALIMENTO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. MARLEN VALDÉS FUENTES

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR: Dr. JOSÉ JESÚS GARCÍA COLUNGA

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

Dr. ALBERTO MANUEL ÁNGELES CASTELLANOS

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, D.F. FEBRERO, 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**CARACTERIZACIÓN CIRCADINA Y FUNCIONAL DEL SISTEMA
SEROTONINÉRGICO EN HÍGADO DE RATA DURANTE LA EXPRESIÓN
DEL OSCILADOR SINCRONIZADO POR EL ALIMENTO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. MARLEN VALDÉS FUENTES

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR: Dr. JOSÉ JESÚS GARCÍA COLUNGA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

Dr. ALBERTO MANUEL ÁNGELES CASTELLANOS
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, D.F. FEBRERO, 2016.



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/027/16

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **12 de octubre de 2015**, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** del (la) alumno (a) **VALDÉS FUENTES MARLEN** con número de cuenta **96277490** con la tesis titulada: "**Caracterización circadiana y funcional del sistema serotoninérgico en hígado de rata durante la expresión del oscilador sincronizado por el alimento**", realizada bajo la dirección del (la) **DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ**:

Presidente:	DRA. VICTORIA EUGENIA CHAGOYA HAZAS
Vocal:	DRA. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ
Secretario:	DR. ALBERTO MANUEL ANGELES CASTELLANOS
Suplente:	DR. MANUEL MIRANDA ANAYA
Suplente	DR. JOSÉ JESÚS GARCÍA COLUNGA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 14 de enero de 2016.

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al Consejo Nacional de la Ciencia y la Tecnología (CONACyT) por el otorgamiento de la beca 210560, a los programas de Apoyo PAPIIT-UNAM (IN-202412) y CONACyT (12-511) por el financiamiento del proyecto de investigación y al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP-UNAM) por el otorgamiento de apoyos económicos para asistencia a congresos, cursos y materiales de laboratorio.

A mi Tutor Principal el Dr. Mauricio Díaz Muñoz y a los miembros del comité Tutor, Dr. José Jesús García Colunga y Dr. Alberto Manuel Ángeles Castellanos por su asesoría académica y apoyo durante el doctorado.

.

Agradecimientos

A la H. Universidad Nacional Autónoma de México así como al Instituto de Neurobiología, campus Juriquilla en Querétaro.

A la Dra. María Luisa Fanjul de Moles, por participar y enriquecer el proyecto durante un periodo como parte del comité Tutor.

Al comité de Sinodales, Dra. Victoria Eugenia Chagoya Hazas, Dra. Ana Brigida Clorinda Arias Álvarez, Dr. Manuel Miranda Anaya, Dr. José Jesús García Colunga y Dr. Alberto Manuel Ángeles Castellanos, por la revisión final de la tesis, sus valiosas observaciones, críticas y sugerencias a la versión final de la tesis.

Al personal del Instituto de Neurobiología, Dra. Gabriela Vera Rivera, Dra. Isabel Méndez, Nut. Fernando López Barrera, Dra. Elizabeth Vázquez Gómez, Dr. Dorothy Pless, Dra. Olivia Vázquez Martínez, E. Nydia Hernández Ríos, Raúl Calderón Aguilera y MVZ Martín García por el apoyo técnico otorgado.

A los integrantes del Laboratorio de Fisiología Celular por su apoyo técnico y logístico durante los cuatro años de permanencia en el laboratorio B-11.

A la Dra. Elsa Escamilla Chimal y los miembros del laboratorio de Neurofisiología Comparada de la Facultad de Ciencias, UNAM, por el apoyo técnico otorgado.

Agradezco el cariño de mi familia, especialmente a mi mamá y a mi papá (que siempre estará junto a mi) quienes me han estado a mi lado apoyándome, los amo.

A mis amigos de la vida, Elsa, Everardo, Siomara, Sandra, Libo, Rafa y Alex, mucha gracias por compartir momentos inolvidables de mi vida, su amistad es invaluable, los quiero mucho.

A mis hermanitas de laboratorio Bianca, Rosy y Magally que han estado conmigo desde mis inicios en la Facultad y han seguido muy de cerca mis pasos.

A todas y cada una de las personas que me han motivado de alguna forma, a los cuatros Iván, Caro, Gina, Mariana, Ale, Daniel y Erika. Mis amigos de Querétaro, Asu, Héctor, Erika, Fernando y Adrián. A mis defechos queridos, Héctor Merino, Tere, Anayetzin, Raúl, Jorge, Elena y Samuel, los quiero mucho.

A todos esos amigos que he podido conocer durante mi vida, que siguen y seguirán apoyando cada uno de mis proyectos, muchas gracias.

A los que llegaron y se fueron en el camino, siempre les deseo lo mejor.

Dedicatoria

A la memoria de mi padre Felipe Valdés, el amor de mi vida

A mi madre Margarita,

A mis hermanos Felipe, Erika

A los pequeños más amados de mi casa,

Lisander, Chiquis y Camilita.

Índice

Lista de figuras y tablas	8
Lista de Abreviaturas	9
Resumen	10
ABSTRACT	12
Introducción	14
Ritmos biológicos	14
Generalidades	14
El reloj circadiano de los mamíferos.....	17
La maquinaria molecular del reloj circadiano	19
El horario de alimentación como un sincronizador en relojes periféricos	21
Oscilador Sincronizado por el Alimento (OSA).....	22
Actividad locomotora anticipatoria al Alimento (AAA)	23
El hígado y su participación en la sincronización por alimento	25
La serotonina (5HT).....	27
Síntesis y degradación.....	28
Receptores	30
Antecedentes.....	33
Hipótesis.....	35
Objetivos	35
Métodos.....	36
Animales	36
Diseño Experimental	36
Fraccionamiento subcelular.....	37
RT-qPCR	38
Inmunohistoquímica	40

Resultados.....	45
Presencia de la TRIPTOFANO HIDROXILASA-1 y serotonina en hígado de rata.....	46
Cuantificación del L-triptofano, 5-hidroxitriptofano y serotonina en hígado.....	46
Triptófano hidroxilasa-1 en el hígado, expresión, cantidad y actividad enzimática.....	53
La proteína MAO-A presenta un ritmo diario	58
Serotonina circulante, diferencias entre suero y plasma.....	62
Receptores de serotonina 5-HT _{1A} y 5-HT _{2C} en el hígado.....	66
Discusión.....	73
La restricción de alimento redujo la concentración de triptófano y serotonina en el hígado.	73
El protocolo HRA reduce la cantidad y la actividad de TPH-1 hepática.	75
El papel de las plaquetas y la serotonina circulante	75
La serotonina se sintetiza en el hígado.....	77
La serotonina y su participación en sincronización circadiana en el hígado y los alimentos.....	81
CONCLUSIÓN.....	84
Literatura citada.....	85
ANEXO.....	91

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Elementos de un ritmo biológico bajo sincronización y libre corrimiento.	16
Figura 2. Maquinaria molecular del oscilador circadiano en los vertebrados..	20
Figura 3. Registro representativo de la actividad locomotriz de rata.	24
Figura 4. Acrofase de algunos parámetros metabólicos en sangre e hígado.	26
Figura 5. Síntesis de serotonina.	29
Figura 6. Variación diaria del L-triptófano hepático.	47
Figura 7. Variación de 5-HTP hepático.	50
Figura 8. Variación diaria de la 5-HT hepática.	52
Figura 9. Variaciones diarias del mRNA de la TPH-1 en el hígado.	53
Figura 10. Variaciones diarias de la actividad de la TPH.	55
Figura 11. Variación diaria de la proteína TPH-1.	56
Figura 12. Inmunohistoquímica de la proteína TPH-1.	57
Figura 13. Perfil de expresión del RNAm de MAO-A.	59
Figura 14. Variación diaria de la abundancia relativa de la proteína MAO-A.	61
Figura 15. Concentración de 5-HT en sangre.	64
Figura 16. Conteo de plaquetas.	65
Figura 17 . Perfil temporal del receptor 5-HT _{1A}	67
Figura 18. Variación diaria del recetor 5-HT _{1A} en la fracción citosólica.	68
Figura 19. Variación diaria del receptor 5-HT _{2C} en homogenado de hígado.	69
Figura 20. Variación diaria del receptor 5-HT _{2C}	70
Figura 21. Inmunofluorescencia para los receptores 5HT _{1A} y 5HT _{2C}	72
Figura 22. Parámetros del metabolismo de la serotonina y transporte.	80

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
5-HTP	5-hidroxitriptofano
AAA	Actividad locomotora Anticipatoria al Alimento
AL	<i>ad libitum</i>
AY	Ayuno
Ay-Re	Ayuno- realimentado
FEO	Food Entrainment Oscillator
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GI	gastrointestinal
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta eficacia)
HRA	Horario de Restricción de Alimento
L-Trp	L-triptofano
MAO	monoamino oxidasa
MAO-A	monoamino oxidase isoforma A
MW	Molecular weight
NSQ	Núcleo supraquiasmático
OSA	Oscilador Sincronizado por el Alimento
PACAP	Péptido Activador de la Adenilato Ciclasa Hipofisiaria
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
TBST	Tris-BUFFER Saline and Tween 20
TPH	triptófano hidroxilasa
TPH-1	triptófano hidroxilasa isoforma 1
TPH-2	triptófano hidroxilasa isoforma 2
WB	Western-blot assay

RESUMEN

Los ritmos biológicos son fenómenos que ocurren en periodos de tiempo regular. Además del núcleo supraquiasmático, estructura considerada como el reloj central, existen relojes alternativos que se encuentran en diferentes tejidos periféricos u órganos, como el tejido adiposo o el hígado. Estos osciladores periféricos se pueden sincronizar al acceso de alimento. Los organismos requieren cambios fisiológicos y conductuales que les permiten anticipar los períodos de alimentación. En este contexto, el hígado se convierte en un órgano crucial para la administración de los recursos energéticos que subyacen a la ritmicidad circadiana durante los horarios de alimentación restringida. El oscilador sincronizado por el alimento (OSA) permite una administración óptima de los nutrientes y temporiza al sistema cuando se restringe el acceso del alimento. Una clave para la comprensión de los mecanismos fisiológicos que subyacen a estos cambios es el estudio de los transmisores químicos como el glutamato y la serotonina. La serotonina es una amina biogénica con funciones múltiples en diversos órganos, como neurotransmisor en el sistema nervioso central y como hormona en los tejidos periféricos. En el hígado, la presencia de la serotonina se ha relacionado con la contracción de los vasos sanguíneos, la regeneración y algunos procesos inflamatorios. El objetivo de este estudio fue caracterizar el sistema serotoninérgico en el hígado de la rata durante la expresión del OSA. Nuestro protocolo experimental incluyó cuatro grupos de ratas donde se cuantificó la serotonina, el triptófano y el 5-hidroxitriptofano por HPLC; además, la expresión del RNAm, cantidad y actividad de la proteína triptófano hidroxilasa-1 fueron estudiadas mediante técnicas bioquímicas y moleculares. Así como la cantidad y la expresión de dos receptores (5HT_{1A} y 5HT_{2C}). Los resultados mostraron

que la presencia de la serotonina en hígado y sangre es similar en el grupo *ad libitum*; donde se encuentran cantidades altas durante el periodo de luz y bajan durante la fase de oscuridad. En contraste, durante la expresión del OSA los patrones de serotonina en sangre e hígado son notoriamente diferentes, en su mayoría pierden esa ritmicidad y los valores son más bajos. El mismo fenómeno se produjo con la cantidad y la actividad de la triptófano hidroxilasa. Mientras que la cantidad de los receptores 5HT_{1A} como 5HT_{2C}, muestran una clara variación diaria contraria a los parámetros antes descritos. Lo que sugiere mecanismos de regulación y señalización intracelular en ambas condiciones. Estos resultados indican que: 1) la serotonina es sintetizada dentro del hígado y muestra fluctuaciones diarias en su metabolismo, 2) el triptófano, la presencia de la serotonina, la actividad enzimática de la TPH-1, así como la presencia de serotonina en suero, plasma y los receptores de serotonina muestran una variación coordinada durante las 24-h en el grupo con alimentación *ad libitum* y 3) las oscilaciones diarias se pierden y / o atenúan en el protocolo de alimentación / expresión del OSA. Estos datos concluyen que existe un sistema serotoninérgico en el hígado que se regula de forma diaria; además de que existen adaptaciones en el metabolismo y manejo de la serotonina asociados con la fisiología del OSA.

ABSTRACT

Biological rhythms are phenomena that occur in regular time periods. Besides the suprachiasmatic nucleus, structure considered as the master clock, there are alternative clocks found in various peripheral tissues or organs such as adipose tissue or liver. These peripheral oscillators can be synchronized to access food. Organisms require physiological and behavioral changes that allow them to anticipate feeding periods. In this context, the liver becomes crucial for the management of energy resources that underlie circadian rhythmicity during times of restricted feeding organ. Food Entrainment Oscillator (FEO) allows optimum nutrient management and timed access to the system when food is restricted. A key to the understanding of the physiological mechanisms underlying these changes is the study of chemical transmitters such as glutamate and serotonin. Serotonin is a biogenic amine with multiple functions in various organs, as a neurotransmitter in the central nervous system and as a hormone in peripheral tissues. In the liver, the presence of serotonin has been linked with the contraction of blood vessels, regeneration, and certain inflammatory processes. The objective of this study was to characterize the serotonergic system in the rat liver during expression of FEO. Our experimental protocol included four groups of rats was measured where serotonin, tryptophan and 5-hydroxytryptophan by HPLC; Additional mRNA expression, amount and activity of tryptophan hydroxylase-1 protein were studied using biochemical and molecular techniques, as the amount and expression of two receptors (5HT_{1A} and 5HT_{2C}). The results showed that the presence of serotonin in blood and liver is similar in the *ad libitum* group; high during the light period and down in the dark phase. In contrast, the expression of FEO showed patterns of serotonin in blood and liver clearly different,

mostly lose the rhythmicity and values are lower. The same phenomenon occurred with the amount and activity of tryptophan hydroxylase. While the amount of 5HT_{1A} and 5HT_{2C}, showed a clear daily variation contrary to the parameters described above. Suggesting mechanisms of regulation and intracellular signaling in both conditions. These results indicate that: 1) serotonin is synthesized in the liver and shows daily fluctuations in metabolism, 2) tryptophan, the presence of serotonin, the enzymatic activity of the TPH-1 and the presence of serotonin in serum, plasma and serotonin receptors show a variation coordinated of 24-h in the group fed *ad libitum* and 3) daily variations are lost and / or attenuated in a feeding protocol / expression of FEO. This data concludes that there is a serotonin system in the liver and is regulated on a daily basis; besides there adaptations in metabolism and handling serotonin physiology associated with FEO.

INTRODUCCIÓN

RITMOS BIOLÓGICOS

GENERALIDADES

Debido a la rotación de la tierra, los organismos estamos sujetos a cambios en la exposición de la luz durante el día. Existen oscilaciones periódicas, llamadas ritmos biológicos, que permiten a los animales responder de forma cíclica y están sincronizados con los cambios de luz además de otras señales externas. Estos ritmos se encuentran en múltiples organismos, desde los unicelulares hasta los organismos más complejos [Roenneberg y Merrow, 2001]. El ritmo obvio es el de sueño-vigilia, que se traduce en un patrón de actividad locomotriz específico para diferentes animales. Sin embargo los relojes biológicos ofrecen la ventaja adaptativa de ajustar ciertas respuestas metabólicas y fisiológicas mediante la preparación y anticipación del organismo para adaptarse a los cambios del ambiente.

Un ritmo biológico se define como un fenómeno que ocurre de manera cíclica a intervalos regulares de tiempo [Moore-Ede et al., 1982]. Los ritmos biológicos se pueden clasificar de acuerdo a la frecuencia con la que se presentan, y pueden ser llamados ultradianos, circadianos e infradianos, si la frecuencia es mayor, cercana o inferior a las 24 h respectivamente. Sin embargo cuando se estudian en condiciones constantes, tales ritmos biológicos se presentan con una frecuencia cercana a la del ciclo ambiental [Schulz y Steimer, 2009].

Los ritmos circadianos se han estudiado con mayor detalle y se han demostrado las principales características de estos, y son: 1) son endógenos y programados genéticamente, 2) al ser endógenos persisten en oscilación espontánea en ausencia de señales externas, 3) son susceptibles de ser sincronizados, 4) son capaces de compensar cambios de temperatura y 5) se amortiguan y gradualmente desaparecen bajo luz intensa constante [Moore-Ede et al., 1982].

Los ritmos biológicos al ser oscilaciones presentan ciertas características, como el periodo, la amplitud y la fase, pueden ser medidas y cuantificar un ritmo. El periodo (τ) representa el tiempo requerido para completar el ciclo, este tiene un intervalo desde los milisegundos hasta más de un año. La amplitud es la magnitud de la variable desde la línea basal hasta el valor más alto, también se puede obtener usando un modelo matemático y la fase puede ser cualquier punto que se repita en cada ciclo [Koukkari y Sothorn, 2006] (Figura 1).

Un sincronizador o *Zeitgeber* (palabra alemana que significa “dador de tiempo”) son señales externas que permiten sincronizar al ritmo biológico, el sincronizador principal de los ritmos circadianos es la luz, sin embargo existen otros sincronizadores como la humedad, el alimento, algunas sustancias químicas, y en algunos animales las señales sociales [Koukkari y Sothorn, 2006; Moore-Ede et al., 1982].

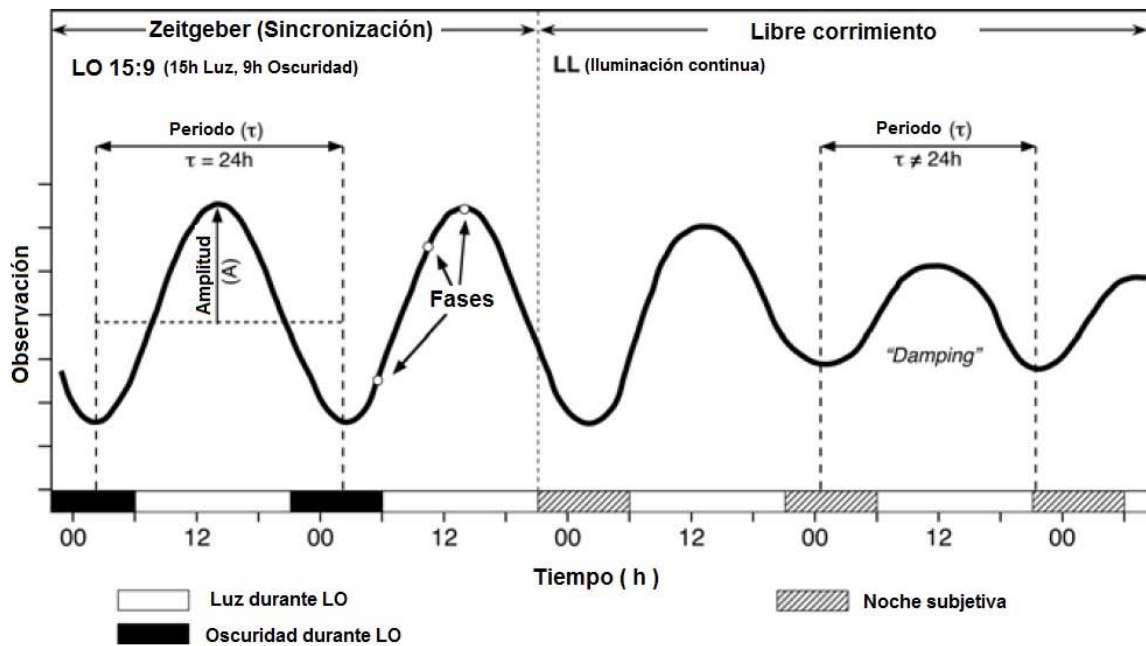


Figura 1. Elementos de un ritmo biológico bajo sincronización y libre corrimiento. La variable estudiada es representada en el eje de las ordenadas, las horas del día en el eje de las abscisas. Las características principales de un ritmo son la amplitud, la fase y el periodo. El “damping” o amortiguamiento se presenta en condiciones de luz constante (Modificado de Koukkari y Sothorn, 2006).

Al estudiar diversos ritmos biológicos en diferentes organismos se presentaron evidencias de la existencia de un reloj interno, que provee información del tiempo del día. En 1814, el francés Julien-Joseph Virey, reportó un ciclo diario en humanos y lo llamó como “reloj viviente”. Posteriormente Pittendrigh, un científico británico pionero en las investigaciones sobre los ritmos biológicos, comenzó a utilizar el término de “reloj biológico”. El control de la frecuencia y la fase requieren de un reloj interno que sea sensible a una señal externa, de esta forma los animales presentan diferencias en sus variaciones fisiológicas, metabólicas y

conductuales [Daan, 2010]. Pittendrigh en 1937, introdujo el concepto de oscilador endógeno auto-sostenido haciendo la analogía de un fenómeno biológico con la acción de una oscilación física, que también era entendida matemáticamente. En términos físicos, en un sistema con dos péndulos que tienen una oscilación determinada se sincronizan uno con otro. De esta forma una oscilación biológica puede sincronizarse por otro oscilador si están acopladas las fuerzas y la magnitud de sus frecuencias no están alejadas una de otra [Daan, 2010].

EL RELOJ CIRCADIANO DE LOS MAMÍFEROS

En la búsqueda por encontrar al reloj “maestro” que regula los ritmos biológicos, se han estudiado diferentes modelos, desde invertebrados como *Drosophila melanogaster* hasta los mamíferos, principalmente roedores. En mamíferos este reloj se localiza en una estructura cerebral llamada núcleo supraquiasmático (NSQ). Es una estructura que se encuentra en el hipotálamo y se sincroniza por luz [Foster y Kreitzman, 2014]. El núcleo supraquiasmático está constituido por varios miles de neuronas y células gliales, se localiza en la línea media del cerebro, en la porción ventral del hipotálamo anterior y dorsal al quiasma óptico [Schulz y Steimer, 2009]. Una de las principales aferencias al núcleo supraquiasmático es la vía retinohipotalámica, que son proyecciones de la retina al núcleo supraquiasmático. Esta vía utiliza ciertos neurotransmisores como el glutamato y el PACAP que participan en la salida de algunos ritmos biológicos tales como la actividad locomotriz y la secreción de hormonas [Cermakian y

Sassone-Corsi, 2002]. Otra vía aferente al núcleo supraquiasmático es el tracto genículo-hipotalámico; recibe inervación directa de tipo circadiano de tipo no luminosa de la retina. Esta vía tiene como neurotransmisor principal al GABA, aunque también se comunica mediante el neuropéptido Y. Por último, se encuentran las proyecciones serotoninérgicas que van desde los núcleos del rafe medio y dorsal e inervan prácticamente todo el cerebro, participando en la modulación de señales tanto luminosas como no luminosas del sistema circadiano [Challet y Pevet, 2003; Morin, 2013]. Además del NSQ, se acepta que también existen relojes biológicos en órganos o tejidos periféricos, tales como el hígado, que puede ser sincronizado por otras señales como el alimento [Challet, 2007; Schulz y Steimer, 2009].

Como se mencionó anteriormente, los ritmos circadianos son procesos cíclicos y endógenos que ocurren con una periodicidad de aproximadamente 24 h. En los mamíferos existen muchos procesos fisiológicos que se encuentran bajo control circadiano ya sea bajo la influencia del NSQ y/o de los osciladores periféricos [Ripperger y Schibler, 2001]. El control temporal de procesos metabólicos permite a las células y a los organismos separar procesos bioquímicos opuestos, por ejemplo, reacciones redox y respuestas anabólicas y las catabólicas [Johnston, 2014].

LA MAQUINARIA MOLECULAR DEL RELOJ CIRCADIANO

En los mamíferos, además del núcleo supraquiasmático la retina fue uno de los órganos en los que se comenzaron a identificar oscilaciones independientes, pues al mantenerlas en cultivo se mantenía un patrón rítmico de secreción de melatonina [Tosini y Menaker, 1996]. Seguida de una serie de clonaciones de ciertos genes, se demostró que existían genes que participan en la regulación temporal de los ritmos biológicos, a los que llamaron “genes reloj”. [Yamazaki et al., 2000]. Sin embargo, el mecanismo molecular de los relojes circadianos, tanto en el núcleo supraquiasmático como en órganos periféricos, involucra la interacción de señales positivas y negativas que regulan la actividad transcripcional-traduccional de estos genes reloj. Estas señales positivas o asas de activación, son reguladores de la activación de la transcripción de sus propios genes. Los elementos negativos o asas de represión por su parte, detienen la transcripción de los genes y los componentes moleculares se acoplan para tener una modulación coordinada [Alberts et al., 2013].

En los osciladores periféricos, se ha documentado que la fase de los genes reloj pueden cambiar y adaptarse a retos fisiológicos como la disponibilidad de alimento y no influir en el reloj central en el núcleo supraquiasmático [Ripperger y Schibler, 2001]. En los mamíferos la proteína BMAL1/2 dimeriza con CLOCK o con NPAS2, que conducen a la transcripción de *Period (Per1-3)* y *Cryptochrome (Cry1/2)* uniéndose a cajas *E* de los elementos promotores. Las proteínas PER y CRY forman un complejo a nivel citoplasmático que migran al núcleo donde inhiben la

acción de las proteínas BMAL y CLOCK, y por consecuencia la transcripción de PER y CRY. El complejo PER y CRY es degradado en el proteosoma seguida de una fosforilación por la CKI ϵ y la ubiquitinación, que remueven la inhibición sobre CLOCK y BMAL, permitiendo que el asa de retroalimentación se restablezca y comience 24 h después [Sosniyenko et al., 2010]. El sistema es finamente regulado por interacciones complejas con otras asas de retroalimentación, como REV-ERB α/β y ROR α uniéndose a los promotores de *Bmal1* e inhibir o promover la transcripción. Así las oscilaciones en la transcripción de REV-ERB α/β y ROR α y el complejo BMAL1/CLOCK actúan directamente sobre el gen REV-ERB α , en una asa de retroalimentación accesoria (Figura 2) [Robinson y Reddy, 2014].

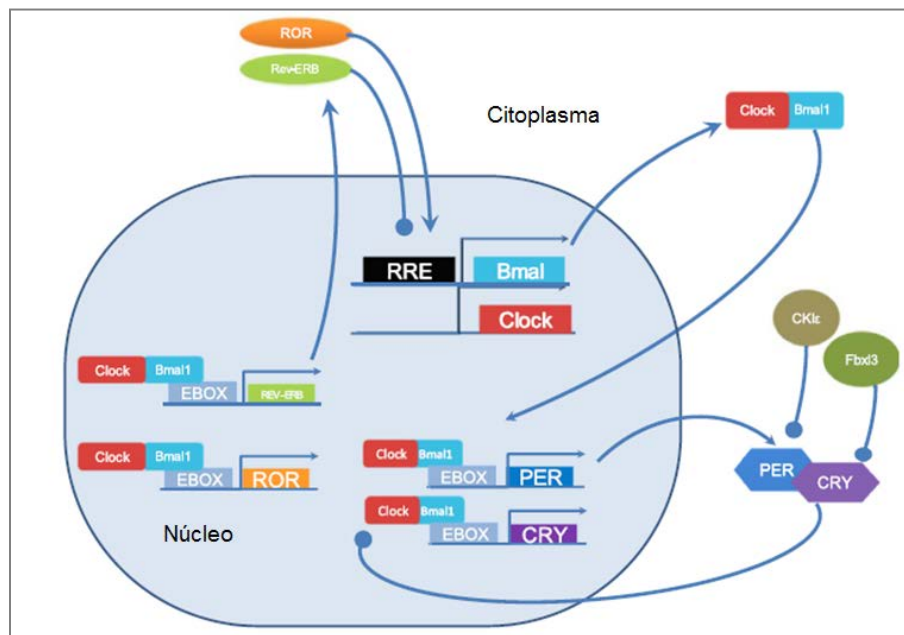


Figura 2. Maquinaria molecular del oscilador circadiano en los vertebrados. Se representan las asas de retroalimentación de los elementos negativos y positivos que regulan la transcripción – traducción de elementos moleculares del reloj biológico (Modificada de Robinson y Reddy, 2014).

EL HORARIO DE ALIMENTACIÓN COMO UN SINCRONIZADOR EN RELOJES PERIFÉRICOS

Existen algunas vías a través de las cuales el núcleo supraquiasmático puede sincronizar a los tejidos periféricos. La secreción de hormonas, como los glucocorticoides y las procedentes del sistema nervioso autónomo forman parte de ciertas vías, que son una influencia temporal de algunos elementos, como el alimento [Stephan, 2002]. En modelos animales se sabe que existe expresión rítmica de genes reloj en tejidos y/o células que involucran la fisiología nutricional y el metabolismo, como el hígado, el páncreas, el tracto gastrointestinal el tejido adiposo y el músculo esquelético [Cagampang y Bruce, 2012]. Así, cambios en la regulación de procesos metabólicos importantes, como la glucólisis y la homeostasis de los lípidos, entre otros, permiten una exploración de estos genes o sus mecanismos. Sin embargo se ha comprobado que la alimentación, es un sincronizador no fotónico para osciladores circadianos periféricos. Diversos estudios han documentado la presencia de un patrón alternativo de ritmicidad en ciertos ritmos, metabólicos y conductuales, cuando se tiene el acceso restringido de alimento a ciertas horas del día, lo que permite una nueva configuración temporal del sistema circadiano [Aguilar-Roblero y Díaz-Muñoz, 2009; Stephan et al., 1979]. Este fenómeno persiste aun cuando el núcleo supraquiasmático sea abolido completamente y se considera como un oscilador independiente, este es conocido como oscilador sincronizado por el alimento (OSA) [Boulos et al., 1980; Marchant y Mistlberger, 1997].

OSCILADOR SINCRONIZADO POR EL ALIMENTO (OSA)

Los osciladores periféricos son células con un mecanismo molecular circadiano autónomo y se encuentran presentes en diversos tejidos en muchos organismos [Glossop y Hardin, 2002].

La mayoría de los organismos muestra una serie de cambios fisiológicos y de comportamiento que les permiten “anticipar” los periodos de alimentación. Algunos de estos cambios incluyen un aumento en la temperatura corporal, actividad locomotora anticipada y un aumento en la secreción de ciertas hormonas que se controlan de manera circadiana [Mistlberger, 1994; Stephan, 2002]. La restricción diaria de alimento, a un par de horas al día, incrementa la actividad simpática, disparando el uso de reservas energéticas y con ello el estado metabólico del organismo, a un estado catabólico [Díaz-Muñoz et al., 2000], así que una vez que se somete a un periodo diario de alimentación restringida se observan adaptaciones fisiológicas y conductuales en los organismos.

En el OSA, aunque no se ha identificado un sustrato anatómico, se sabe que la actividad locomotriz anticipatoria a la llegada del alimento (AAA) es una manifestación directa y por lo tanto deriva en cambios fisiológicos y conductuales como, un aumento en la temperatura corporal, ingesta del alimento y consumo de agua, además de aumento de ácidos grasos libres [Martínez-Merlos et al., 2004], y hormonas, como la corticosterona. Otra adaptación, se observa a nivel molecular, donde la disponibilidad de alimento limitada invierte la fase de la expresión de genes del reloj molecular y de los genes controlados por el reloj en algunos

órganos, como el hígado, sin que se afecte la función del reloj en el NSQ [Damiola et al., 2000].

ACTIVIDAD LOCOMOTORA ANTICIPATORIA AL ALIMENTO (AAA)

En 1922, Ritcher observó que ratas alimentadas con un protocolo de restricción de acceso al alimento únicamente durante el día, presentaban un notable incremento en la actividad locomotora dos horas antes de la llegada del alimento (Figura 3) [Mistlberger, 1994]. Posteriormente resultados similares se observaron en ratas con lesiones del NSQ, demostrando la existencia de un oscilador circadiano alternativo [Boulos et al., 1980]. Aunque el mecanismo directo para esta anticipación no ha sido bien dilucidado, se propone que el OSA es una propiedad emergente; donde el control temporal del organismo está basado en una interacción entre el reloj molecular y las redes metabólicas [Aguilar-Roblero y Díaz-Muñoz, 2009; Stephan, 2002]. La actividad anticipatoria pese a que no está relacionada directamente con el núcleo supraquiasmático se asocia con la expresión de un oscilador circadiano. Se han realizado lesiones completas del núcleo supraquiasmático y lesiones en numerosos sitios del pros encéfalo, sin embargo no se ha podido abolir completamente la actividad anticipatoria. El único sitio donde se ha podido interrumpir esta actividad anticipatoria, utilizando lesiones químicas y eléctricas, es en la región parabránquial en el cerebro posterior en ratas [Davidson et al., 2000]. La conclusión de estos hallazgos permitió a los autores demostrar la pérdida de comunicación entre el sistema digestivo y el cerebro, más que la localización del OSA en el núcleo supraquiasmático,

sugiriendo fuertemente que al menos parte de este oscilador se encuentra a nivel de órganos o tejidos periféricos [Davidson, 2006; Davidson et al., 2003], cuya función estaría en optimizar la ingesta de alimento en función del tiempo.

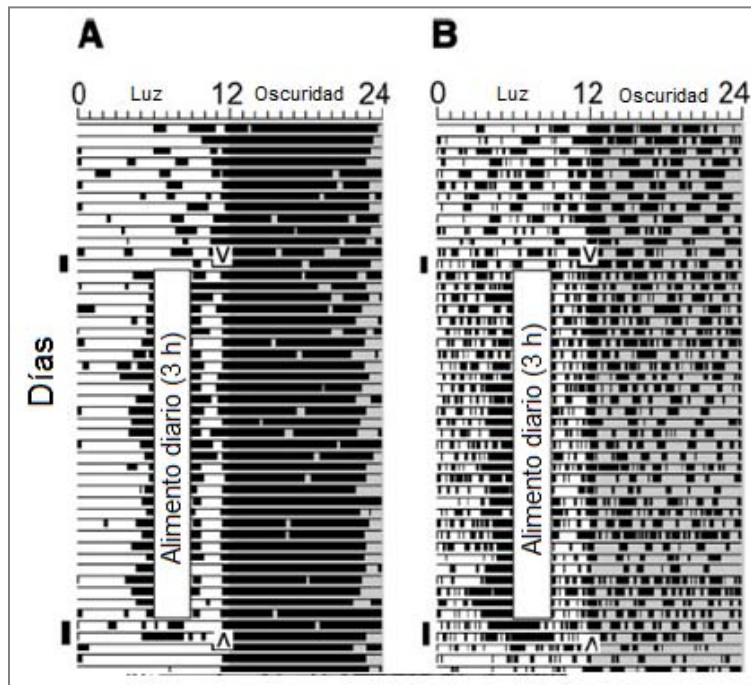


Figura 3. Registro representativo de la actividad locomotriz de rata. En condiciones del LD 12:12, bajo una alimentación *ad libitum* y después bajo un esquema de alimento restringida de tres horas (V); en ratas sin lesión (A) y ratas con lesión a nivel del NSQ (B) El recuadro blanco representa el horario de alimentación (Modificado de Landry et al., 2006)

EL HÍGADO Y SU PARTICIPACIÓN EN LA SINCRONIZACIÓN POR ALIMENTO

El hígado participa activamente en funciones metabólicas muy importantes para el organismo tales como el procesamiento de alimento, el estado energético, la síntesis de proteínas, el almacén de vitaminas y hierro, en la regulación de aminoácidos y el metabolismo de las toxinas y fármacos [Challet, 2013; Davidson et al., 2004].

Una evidencia importante para proponer al hígado como un posible elemento del OSA fue el cambio en la fase de genes reloj [Damiola et al., 2000], durante la actividad anticipatoria además de que la energía hepática se concentra en la oxidación de lípidos más que el catabolismo de los carbohidratos [Baez-Ruiz et al., 2005; Luna-Moreno et al., 2007]. Además de presentar cambios de fase durante la expresión del OSA [Diaz-Muñoz et al., 2000], en hormonas como la insulina, el glucagón, la corticosterona [Escobar et al., 1998], la leptina [Martinez-Merlos et al., 2004], el aumento en los triacilglicéridos, los cuerpos cetónicos y los ácidos grasos [Diaz-Munoz et al., 2010; Diaz-Muñoz et al., 2000; Rivera-Zavala et al., 2011]. Otro parámetro importante del hígado y su función en el OSA es que se muestran cambios en la síntesis de ATP así como el manejo de los reductores NADH, NADPH y el consumo mitocondrial [Baez-Ruiz et al., 2005] (Figura 4). Sin embargo no está bien definida la forma exacta en la que el hígado se sincroniza por el alimento.

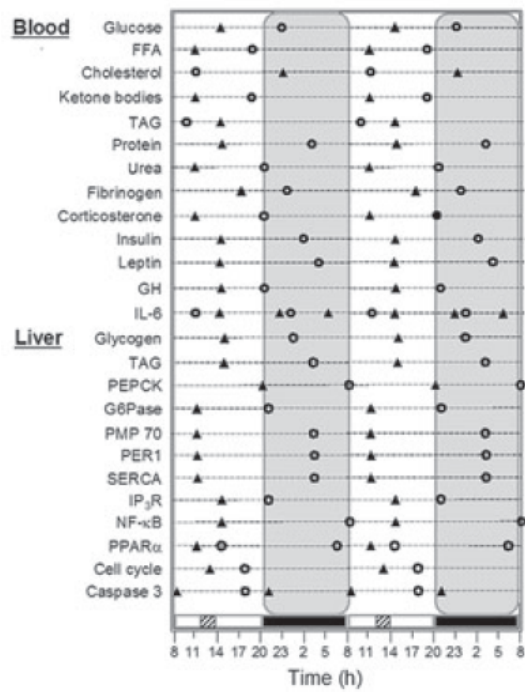


Figura 4. Acrofase de algunos parámetros metabólicos en sangre e hígado. Los círculos abiertos representan animales con alimentación *ad libitum*, y los triángulos animales con un periodo de alimentación restringida a dos horas durante la fase de luz (Tomado de Aguilar-Roblero and Díaz-Muñoz, 2010)

LA SEROTONINA (5HT)

La serotonina (5-hidroxitriptamina) fue descubierta por el Erspamer en 1935 en células enterocromafines y fue nombrada como enteramina, por su característica de contraer el intestino. Una década después el grupo de Rapport utilizaron el término de serotonina cuando fue descubierta en suero y fue caracterizada como un vasoconstrictor arterial [Rapport et al., 1948]. Actualmente se acepta que la 5-HT actúa diferencialmente en distintos órganos y tejidos. La serotonina es una amina biogénica que participa en múltiples funciones tales como los estados de alerta, el sueño, la locomoción, la alimentación, en situaciones de estrés, reproducción, el control de la temperatura corporal, frecuencia cardiaca, en una variedad de desórdenes y enfermedades psiquiátricas, así como en procesos celulares como la división celular, el desarrollo embrionario, la movilidad del intestino y como vasoconstrictor en vasos sanguíneos [Berumen et al., 2012; Jonnakuty y Gragnoli, 2008; Mawe y Hoffman, 2013; Nakamura et al., 2008; Watts et al., 2012]. La serotonina es sintetizada principalmente por las células enterocromafines (cerca del ~90-95%), que se encuentran distribuidas a lo largo de la mucosa gastrointestinal. El resto es sintetizado en el sistema nervioso central (~5%) y en otros órganos periféricos (menos del ~1%) [Furness y Costa, 1982; Papadimas et al., 2012]. En las células enterocromafines es liberada para posteriormente ser captada y transportada principalmente por las plaquetas. En las plaquetas es capturada por un transportador de serotonina o 5-HTT o por

SERT y es almacenado, en gránulos densos, y llevada a diferentes tipos celulares para cumplir diversas funciones en el organismo [Rendu y Brohard-Bohn, 2001].

SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN

El precursor de la 5-HT es el triptófano, un aminoácido esencial, que es hidroxilado por la enzima triptófano hidroxilasa (TPH, EC 1.14.16.4). La TPH es una enzima de ~56 kD, que cataliza la reacción en el triptófano, oxígeno y tetrahidrobiopterina para producir 5-hidroxitriptofano (5-HTP) y 4 α -hidroxitetrahidrobiopterina. Este es el primer paso limitante en la biosíntesis de la serotonina [Berger et al., 2009]. Aunque es producto de un solo gen, se sabe que existen dos isoformas de la enzima TPH. La TPH1 se encuentra en la glándula pineal y en tejidos periféricos, como el tracto digestivo, mientras que la TPH2 se expresa selectivamente en cerebro [Boadle-Biber, 1993]. El 5-hidroxitriptofano es convertido a serotonina por la enzima L-aminoácido carboxilasa (Figura 5). Son necesarios algunos cofactores para que se lleve a cabo la reacción, tales como la vitamina B6 (fosfato de piridoxal), la vitamina B3 (niacina) y el magnesio. La serotonina es impermeable a la barrera hematoencefálica pero no el 5-HTP. Sin embargo, la cantidad de serotonina que se produce es dependiente de la cantidad de triptófano disponible en la periferia y éste puede cruzar la barrera sin problema [Yuwiler et al., 1977].

La serotonina es catabolizada por la monoamino oxidasa (MAO EC. 1.4.3.4). Son flavoenzimas mitocondriales que catalizan la oxidación de diversas aminas

incluyendo los neurotransmisores dopamina, norepinefrina, tiramina, 2-feniletilamina y aminas exógenas incluyendo la neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropirimina. La MAO está presente en la mayor parte de los tejidos de los organismos y lleva a cabo procesos de desintoxicación en el hígado. Existen dos isoformas que degradan preferentemente algún tipo de amina, la isoforma A degrada serotonina principalmente [Kalgutkar et al., 2001; Slopien et al., 2012].

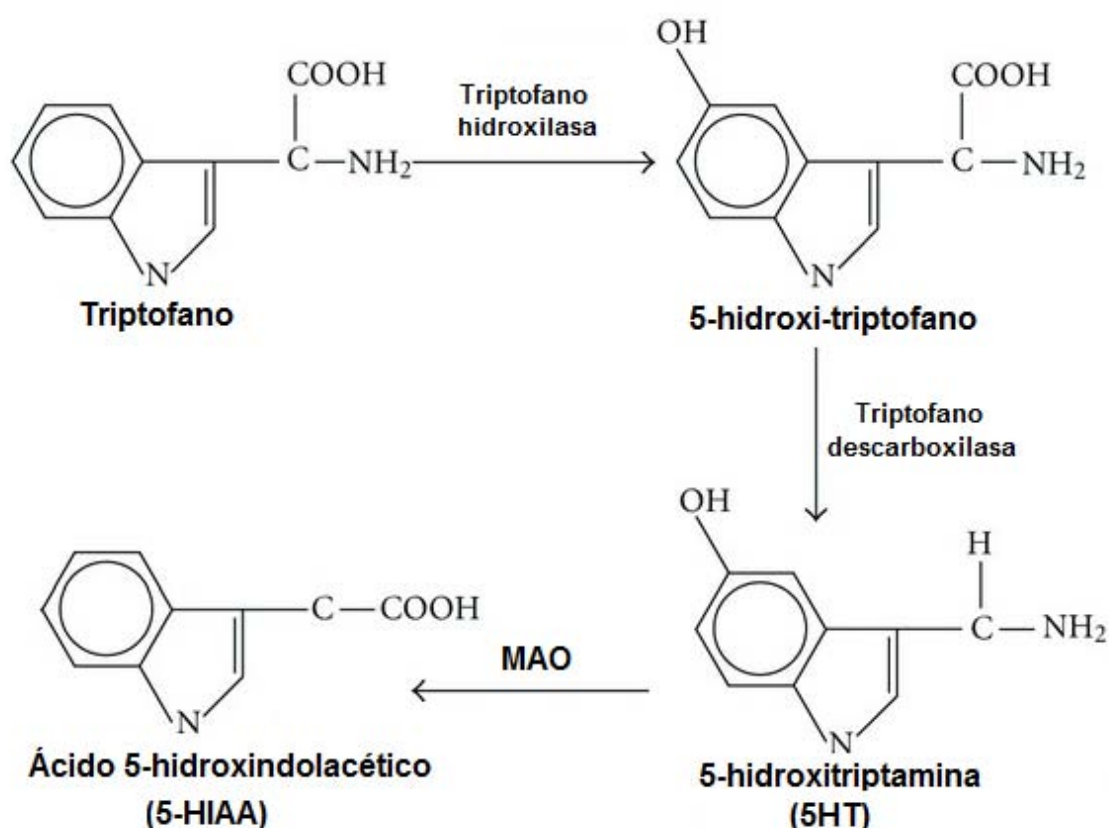


Figura 5. Síntesis de serotonina. El triptófano es metabolizado por la TPH, enzima limitante, utilizando como cofactor al O₂ + BH₄ para formar 5-HTP, como producto intermediario que es convertido, por la enzima AADC, en serotonina o 5-hidroxitriptamina y la degradación se da por la MAO formando ácido 5-hidroxiindolacético. (Modificado de Slopien et al., 2012).

RECEPTORES

La serotonina es una de las moléculas señalizadoras más antiguas en la evolución, por lo tanto no es de extrañarse que los receptores se encuentren localizados en diversas especies, desde los platelmintos, pasando por invertebrados más complejos como *Drosophila* y todos los vertebrados [Hannon y Hoyer, 2008]. Derivado de diversos estudios basados en la biología molecular de los receptores, se han identificado siete familias de receptores, agrupándose en clases y subclases dependiendo de la farmacología y el acoplamiento con un segundo mensajero [Hoyer et al., 1994]. Seis de estos subtipos involucran a un receptor de membrana acoplado a una proteína G. El receptor 5HT₃, es el único que está ligado a un canal de Na⁺/K⁺ estructuralmente similar al del GABA. Los receptores 5HT₁ y 5HT₅ son acoplados negativamente con la adenilato ciclasa, es decir, la activación de estos receptores regula a la baja el AMPc. El receptor 5HT₂ se asocia a la generación de inositol trifosfato y diacilglicerol provocando una liberación de Ca²⁺ intracelular. Los receptores 5HT₄ y 5HT₇, aumentan la actividad de la adenilato ciclasa, y finalmente los receptores 5-HT₃, se asocian con canales de Na⁺/K⁺, activados por la despolarización de la membrana plasmática [Mohammad-Zadeh et al., 2008].

La familia de los receptores 5HT_{1A}, está compuesta de los receptores 5HT_{1A}, 5HT_{1B}, 5HT_{1D}, y 5HT_{1E}. Esta clase de receptores está acoplado a una proteína G de tipo inhibitorio, Gi: El mecanismo de transducción inhibe la vía de la adenilato ciclasa, aunque algunos reportes hablan de la existencia de subtipos para este

receptor, ya que en células LZD-7 se presenta una producción de IP₃, por la actividad de la fosfolipasa C [Liu y Albert, 1991]. El receptor 5HT_{1A} a nivel neuronal, se encuentra como un auto-receptor, ubicado en los cuerpos celulares en la neuronas del rafe así como en astrocitos y células ependimales. La activación de este autorreceptor resulta en una inhibición de la frecuencia de disparo [Sandyk, 2006]. Los receptores 5HT_{1A} son expresados a nivel de sistema nervioso central en neuronas piramidales corticales donde participan en el control de la excitabilidad y propagación de información y también participan en la modulación de neuronas glutamatérgicas [Czyrak et al., 2003]. La familia de los receptores 5-HT₂ comprende a los receptores 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C}, que están asociados a receptores metabotrópicos ligados a una proteína G de tipo G_q. Requieren para su activación la estimulación de la fosfolipasa C para incrementar el metabolismo fosfoinositídico y causar un aumento transitorio en el calcio libre intracelular [Martin y Humphrey, 1994]. El receptor 5HT_{2C}, se ha localizado principalmente en neuronas piramidales así como en interneuronas excitadoras de tipo glutamatérgicas

La distribución de los receptores en el organismo es muy amplia, y se ha documentado ampliamente en el sistema nervioso central sin embargo en tejidos periféricos estos receptores se encuentran presentes en neuronas del sistema entérico, células enterocromafines, células del músculo liso del tracto gastrointestinal, ovocitos y tejido inmune [Bonhaus et al., 1995; Lesurtel et al., 2008]. Los receptores 5HT_{1A} participan en la distensión de tejido en el tracto

gastrointestinal, mientras que el receptor 5HT₂, participa en la estimulación del transporte de electrolitos [Lesurtel et al., 2008].

Serotonina e hígado

La presencia de la serotonina en el hígado se ha delimitado a inervaciones directas del sistema nervioso autónomo tanto del nervio vago como del ganglio celiaco. Su función se centra en procesos de regeneración celular, flujo circulatorio y apoptosis [Ruddell et al., 2008]. También existe evidencia de que la serotonina está involucrada en algunas condiciones patológicas en el hígado. Se sabe que las especies reactivas de oxígeno generadas por la degradación de serotonina contribuyen a la esteatohepatitis. En la hepatitis viral interviene a nivel de la microcirculación y en la fibrosis hepática hay una progresión significativa así como en carcinoma hepático (Lesurtel *et al.*, 2012). Pero a nivel local la presencia de una maquinaria de síntesis y degradación en el hígado todavía no ha sido reportada.

ANTEDECENTES

Los organismos requieren cambios fisiológicos y conductuales que les permite anticipar los periodos de alimentación. Dichos cambios son regulados por relojes alternativos al núcleo supraquiasmático, que se encuentran en tejidos u órganos, como el hígado. El hígado es un órgano crucial para la administración de los recursos energéticos que subyacen a la ritmicidad circadiana y en protocolos de alimentación restringida que manifiestan el OSA se observa una administración óptima de los nutrientes. Un aspecto importante en la comprensión de los mecanismos fisiológicos que subyacen a esos cambios es el estudio de los transmisores químicos, que permitan la comunicación entre los componentes del sistema. Por lo tanto la serotonina, ya que presenta funciones múltiples en diversos órganos y participa en procesos relacionados con la alimentación se vuelve un transmisor clave. La presencia de la serotonina en el hígado se ha relacionado principalmente con la contracción de los vasos sanguíneos, la regeneración y algunos procesos inflamatorios. Un estudio de microarreglos realizado por Báez-Ruiz *et al* (datos no publicados) detectó la variación significativa de RNAm de receptores de serotonina y enzimas que intervienen en el metabolismo de este transmisor en el hígado de ratas sometidas a restricción alimenticia. Estos datos apoyaron la hipótesis de que el sistema serotoninérgico está participando en la manifestación de este oscilador. Por lo tanto la caracterización de componentes esenciales para el sistema de síntesis y

degradación de la serotonina en el hígado, mantenidas con un protocolo de alimentación restringida y comparadas con ratas en alimentación *ad libitum*.

El análisis se hizo mediante técnicas bioquímicas y moleculares; se cuantifico la expresión, la cantidad y la actividad de la TPH1, así como la concentración de L-triptófano, el 5-hidroxitriptofano y la serotonina, en hígado y en sangre. Además, se estudió la cantidad y abundancia de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2C}; receptores que participan en la alimentación a nivel metabólico y conductual. De esta forma se hizo un primer acercamiento para conocer el sistema serotoninérgico y en condiciones *ad libitum* y durante la restricción de alimento / expresión del OSA.

HIPÓTESIS

La actividad de la maquinaria enzimática, anabólica y catabólica, la cantidad de los receptores 5HT_{A1} y 5HT_{2C} y los metabolitos asociados a la serotonina en el hígado tendrán una variación diaria y se verán modificados durante la expresión del OSA.

OBJETIVOS

General

- Demostrar la presencia de células serotoninérgicas en el hígado de ratas, independientemente de las terminaciones nerviosas, así como describir si existen cambios diarios de las enzimas de síntesis y de degradación de serotonina durante la alimentación *ad libitum* y durante la expresión del OSA.

Particulares

- Evaluar la variación diaria de la concentración de serotonina, 5-hidroxitriptófano y L-Triptófano en el hígado, así como de serotonina y plaquetas en sangre.

- Determinar la abundancia y presencia diaria de los receptores de serotonina 5HT_{2C} y 5HT_{1A} en el hígado.

MÉTODOS

ANIMALES

Se utilizaron ratas macho Wistar con un peso de 200 ± 20 g. Las ratas fueron sincronizadas a ciclos de luz-oscuridad 12 h: 12 h (encendido a las 08:00 h) y temperatura ambiente $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Las ratas fueron mantenidas en cajas de acrílico, en grupos de 4 con alimento (Purina Chow) y agua disponible, excepto durante las condiciones de restricción de alimento (HRA), el ayuno agudo (AY) y el ayuno agudo seguido por realimentación (AY-RE). Los animales fueron tratados de acuerdo con las normas éticas estipuladas en los reglamentos respectivos del Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología, UNAM y conforme a los estándares éticos internacionales [Portaluppi et al., 2010].

DISEÑO EXPERIMENTAL

Los animales se asignaron en cuatro grupos experimentales: 1) Ratas con alimentación *ad libitum* (AL) durante 3 semanas, 2) ratas expuestas a un a restricción de alimento diario (HRA), con acceso de alimento únicamente de 12:00 a 14:00 h durante 3 semanas, 3) ratas con un protocolo de alimento *ad libitum* y después con un ayuno de 24 h (Ay) y 4) ratas realimentadas por 2 h después de

un periodo de ayuno agudo de 24 h (Ay-Re). Las ratas fueron sacrificadas por decapitación a las 08:00, 11:00, 14:00, 17:00, 20:00, 23:00, 02:00 y 05:00 h. Los controles de alimentación Ay y Ay.Re, fueron sacrificados a las 11:00 y 14:00 h respectivamente. Inmediatamente después del sacrificio, se colectó el hígado y fue homogenizado y/o congelado a -80 °C para su análisis posterior. La sangre colectada fue ocupada para las muestras de suero en tubos Vacutainer ® y centrifugadas a 5,000 rpm por 5 min. Para las muestras de plasma, la sangre fue colectada en tubos BD Vacutainer ® con K₂-EDTA y centrifugadas a 3,500 rpm por 10 min.

FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR

Una muestra de 2 g de hígado fue homogenizado en 15 ml de buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 225 mM sacarosa, 0.2% BSA, 0.3 M EGTA). Los homogenados fueron centrifugados a 1,500 g por 15 min y el sobrenadante fue centrifugado a 10,000 g por 15 min para sedimentar la fracción mitocondrial, que fue resuspendido en buffer de fosfatos. El segundo sobrenadante fue centrifugado a 100,000 g por 1 h para obtener la fracción citosólica. Todas las centrifugaciones fueron realizadas a 4 °C y fueron alicuotadas y conservadas a -80 °C.

RT-qPCR

La expresión de los genes TPH1, TPH2 y MAO-A, fue evaluada por aislamiento total del RNA en tejido de hígado (20-30 mg) usando un kit de extracción (SV Total RNA Isolation System, Promega, WI, USA). La cantidad y calidad del RNA fue estimada por espectrofotometría a 260 / 280 nm y una cantidad constante de RNA (2µg) se utilizó para obtener cDNA usando la transcriptasa reversa (SuperScript™), el primer Oligo (dT)₁₂₋₁₈, un inhibidor de ribonucleasa (RNasaOUT) y un set de dNTP (Invitrogen, CA, USA). La amplificación fue realizada por triplicado en un PCR tiempo real (CFX96™, Bio-Rad, CA, USA). Los oligonucleótidos usados para la amplificación fueron sintetizados por Sigma-Aldrich Co. (MO, USA) y las secuencias correspondientes para cada gen se indican en la tabla 1. Las amplificaciones se corrieron con una mezcla de SYBR Green (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) en un volumen final de reacción de 10 µl conteniendo cDNA (1/100 y 1/20) y 0.5µM de cada par de oligonucleótidos en Master Mix Green siguiendo el siguiente protocolo: activación de la DNA - Taq polimerasa y desnaturalización del DNA a 95 °C por 10 min, seguida por 40 ciclos de amplificación de 10s a 95 °C, 30 s a 60 °C y 30 s a 72 °C. Los datos del qPCR fueron analizados por el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ y normalizados contra el gen constitutivo Rps 18 para calcular los niveles del RNAm de todos los genes analizados.

Tabla 1. Secuencias de Oligonucleótidos utilizados para el qPCR en hígado de rata.

Nombre	Secuencia
Tryptophan hydroxylase 1 (Tph1)	Sense gCTgAACAAACTCTACCCAAC Antisense CTTCCCgATAgCCACAgTATT
Tryptophan hydroxylase 2 (Tph2)	Sense gggTTACTTTCCTCCATCggA Antisense AAgCAggTTgTCTTCgggTC
Monoamine oxidase A (Maoa)	Sense gCCAggAACggAAATTTgTA Antisense TCTCAggTggAAgCTCTggT
Rps18 sense	Sense: TTCAgCACATCCTgCgAgTA Antisense: TTggTgAggTCAATgTCTgC

ENSAYO DE WESTERN BLOT

Las proteínas del homogenado de hígado y las fracciones subcelulares fueron separadas bajo condiciones reductoras en geles SDS-PAGE del 12 y 15%, transferidas a membranas de nitrocelulosa y bloqueadas por 1 h en buffer TBST (20 mM Tris, pH 7.5, 500 mM NaCl, 0.5% Tween 20) con leche baja en grasa al 5%. La concentración de proteínas se determinó usando el método de Bradford y se usaron 40 µg de proteína por carga. Las membranas una vez transferidas fueron lavadas e incubadas en presencia del anticuerpo Anti-TPH-1 (ab52954, Abcam, UK), anti- MAOa (sc-20156, Santa Cruz Biotechnology, INC), Anti-5HT_{1A}

(ab85615, Abcam, UK) y anti-5HT_{2C} (ab137529, Abcam, UK); como controles de carga de los homogenados y la fracción citosólica de hígado se utilizó anti-tubulina (ab 56676 Abcam, UK) y anti-GAPDH (ab181602, Abcam, UK) y para la fracción mitocondrial se utilizó anti-VDAC1/Porina (ab15895; Abcam, UK) en TBST 0.5% toda la noche a 4°C, diluidos 1/1000. Después de tres lavados, las membranas fueron incubadas con anticuerpos secundarios, conjugados a la fosfatasa alcalina (sc2315, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) diluidos 1/5000 o 1/3500. Las bandas fueron reveladas usando un Kit con un sustrato conjugado con AP (Bio-Rad CA, USA). El análisis densitométrico fue realizado en el programa Image Lab Software (versión 3.0, Bio-Rad CA, USA)

INMUNOHISTOQUÍMICA

El tejido de hígado fue fijado por 1 semana en formalina al 10% a 4 °C, con cambios cada dos días. Después de la fijación, el tejido fue incluido en parafina y seccionado en cortes de 7µm. Las laminillas se desparafinaron por 2 h a 60 °C, después los cortes fueron rehidratados en un tren de solventes que incluían xilol 100% (10 min), etanol 100% (5min), etanol 96% (5min), etanol 80% (5min) y agua desionizada (10 min). Posteriormente se bañaron en un buffer de permeabilización (citrato de sodio 3.9 mM, 0.1% Tween 20) por 8 minutos seguida de una incubación de 60 segundos en buffer de citrato de sodio hirviendo (ácido cítrico

10mM, 0.05% Tween 20, pH 6.0). Las secciones fueron bloqueadas con leche libre de grasas al 5% por 1 h. Después de tres lavados con TBST 0.05%, las laminillas se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario. Para anti-TPH-1 (ab52954, Abcam, UK), anti-5HT1A (ab85615, Abcam, UK) y anti-5HT_{2C} (ab137529, Abcam, UK); diluidos 1/50. Al siguiente día las laminillas fueron lavadas 3 x 5 min con TBST 0.05% y se incubaron por 2 h con el anticuerpo secundario Alexa Fluor ®- (Invitrogen, CA, USA) diluido 1/400. Los controles negativos se incubaron con buffer de lavado durante toda la noche a 4 °C, posterior a esto, se incubaron 2 h con el anticuerpo secundario. La fluorescencia fue visualizada usando un microscopio (Olympus CX31) utilizando el software Image-Pro Plus 6.0, así como el microscopio confocal Zeiss Axiovert 200 LSM 510 Meta-Multiphoton y capturadas con el software LSM 510 Meta, Zeiss.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA TRIPTOFANO HIDROXILASA

La actividad fue medida en homogenado de hígado usando ensayo con un isótopo radioactivo [Barbosa et al., 2008], con la siguiente reacción en el medio, Hepes (50 mM, pH 7), catalasa (100 µg/ml), triptofano (50 µM), dithiothreitol (5 mM), Fe (NH₄)₂ (SO₄)₂ (10 µM), 6-Methyl-5-6-7-8-tetrahydropterine dihydrochloride (6-MPH4) (500 µM), y 1 µl de [³H] tryptophan (1 mCi/ml). La muestra fue incubada a 37 °C por 10 min. La reacción fue detenida adicionando carbón activado (7.5% en 1 M HCl) y 200 µl del sobrenadante fueron transferidos a tubos de centelleo, se

agregó líquido de centelleo y la radioactividad fue evaluada con un contador de centelleo Beckman β counter ®

MEDICIÓN DE SEROTONINA, 5HTP Y L-TRIPTÓFANO POR HPLC

La concentración de serotonina y 5-HTP dentro del hígado, plasma libre de plaquetas y plasma rico en plaquetas fue medida usando HPLC. Las muestras de hígado fueron homogenizadas 1/5 (w/v) en 0.1 de HClO₄, filtradas con tubos de centrifuga con un poro de 0.22 μ m de diámetro (Spin-X, Costar®). El sistema de HPLC consistió en una bomba (Solvent Delivery System PM-80), un inyector (BASi Liquid Chromatography CC-SE, 20 μ l loop), una columna de fase reversa C18 (BASi ODS C18, 100 x 3 mm, 3 μ m de tamaño de partícula) y un detector electroquímico (Epsilon) con un electrodo de carbono; el potencial fue ajustado a +600 mV versus el electrodo de referencia (Ag/AgCl). La fase móvil contenía 0.1 M Na₂HPO₄, ácido cítrico 0.05 M, EDTA 0.17 mM, 1 mM KCl, metanol al 2% (v/v), pH 4.5. El rango de flujo fue de 0.6 ml / min a una presión de 2,400 psi. Todos los cromatogramas fueron registrados y analizados usando el software ChromGraph Report v.2.3 (Bioanalytical Systems, Inc).

El triptófano fue medido en homogenado usando HPLC (Dionex, Ultimate 3000, Thermo Scientific®), usando el programa Chromeleon 6.8 para el análisis de los datos. El HPLC con detección de fluorescencia tuvo un rango de excitación y

emisión de 337 y 442 nm respectivamente. Después de la derivatización usando o-phthaldehyde (OPA). La muestra de homogenado se mezcló con 25 µl de OPA en un tubo y después de 2 min la mezcla se inyectó en una columna C18 Synchronis (250 x 4.6 mm, tamaño de la partícula 5 µm, Thermo Scientific®) a 20 °C. Fue usada una fase móvil de 0.1 M acetato de potasio, pH 5.5 ajustada con ácido acético glacial y un gradiente con 25 % metanol, 75 % fase móvil, el flujo se fijó en 2.5 ml / min.

Las concentraciones fueron determinadas utilizando el área bajo la curva usando estándares externos de L-triptofano, 5-HTP y serotonina (Sigma-Aldrich Co., MO, USA).

CONTEO DE PLAQUETAS

Las plaquetas en las muestras de sangre se cuantificaron por procedimientos clínicos estándares usando un contador celular automatizado.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los resultados con curso temporal se expresaron como el promedio \pm error estándar. Los análisis estadísticos se realizaron usando el software GraphPad Prisma (v. 5.0 CA, USA). La distribución normal así como la homogeneidad de varianzas se evaluó por una prueba de Kolmogorov-Smirnov y una prueba de Levene respectivamente. Los diferentes puntos temporales fueron comparados usando una ANOVA de una vía, y los grupos experimentales fueron comparados usando una ANOVA de dos vías en ambos casos se utilizó una prueba *post hoc* de Bonferroni. Todas las comparaciones por pares fueron evaluadas con una prueba de t-student. Las diferencias significativas fueron consideradas con una $P \leq 0.05$. El análisis de ritmos usado fue evaluado con el software COSANA (v 3.1) desarrollado por AA Benedito-Silva, GMDRB, ICB/USP, Brasil.

RESULTADOS

El efecto de la serotonina sobre ciertas funciones del hígado se ha documentado únicamente como efecto de inervaciones específicas del sistema nervioso autónomo [Ruddell et al., 2008], así como de la serotonina secretada de las plaquetas circulantes [Papadimas et al., 2012].

La primer parte de la caracterización del sistema serotoninérgico se basó en estudiar la enzima de síntesis y degradación, así como la presencia del precursor y los metabolitos resultantes. Este trabajo muestra información contundente acerca de la síntesis de serotonina en el hígado y su modificación ante un protocolo de restricción de alimento. En el primer bloque de resultados se presentarán los análisis derivados del estudio de la enzima de síntesis, la TPH-1, el precursor y el metabolito intermediario de la serotonina, así como la serotonina en hígado y sangre. El segundo bloque de resultados corresponde a las abundancias relativas de los receptores 5HT_{1A} y 5HT_{2C}, así como el análisis inmunohistoquímico de ambas proteínas. Y por último una breve descripción de la caracterización de la actividad eléctrica de los hepatocitos en rebanadas de hígado.

PRESENCIA DE LA TRIPTOFANO HIDROXILASA-1 Y SEROTONINA EN HÍGADO DE RATA

CUANTIFICACIÓN DEL L-TRIPTOFANO, 5-HIDROXITRIPTOFANO Y SEROTONINA EN HÍGADO.

El precursor de la serotonina es el aminoácido L-triptofano y las cuantificaciones, obtenidas por la técnica de HPLC de fluorescencia, de este aminoácido se muestran en la Figura 6, en esta se puede apreciar que el triptófano hepático del grupo AL muestra un patrón de tres picos (11:00, 20:00 y 05:00 h) con valles a las 14:00 y 08:00 h. La condición HRA promovió un cambio drástico, a las 17:00 h y niveles altos durante el periodo de oscuridad. Los puntos que presentan una concentración alta en el grupo AL (11:00, 17:00, 20:00 y 05:00 h) fueron estadísticamente significativos comparando con el grupo HRA (ANOVA dos vías $p < 0.05$, $F_{(7,42)} = 18.33$). Otra diferencia clara que está asociada al protocolo HRA fue una reducción significativa de aproximadamente 50% en los niveles promedio durante las 24 h. El análisis de cosinor indica que existe un ajuste del 47% en el grupo AL a un periodo de 8 h, mientras que el grupo HRA ajusta un 56% pero a un periodo de 24 h (Tabla 2). Los grupos de la condición alimenticia (Ay y Ay-Re) mostraron niveles de L-Triptófano similares a los presentados en la condición AL. Significativamente más alto que el que corresponde al grupo HRA, ambos antes del acceso al alimento, aproximadamente 115% a las 11:00 y después del alimento un 82% a las 14:00 h (t-Student $P = 0.0079$ y $P = 0.0096$; $p < 0.05$)

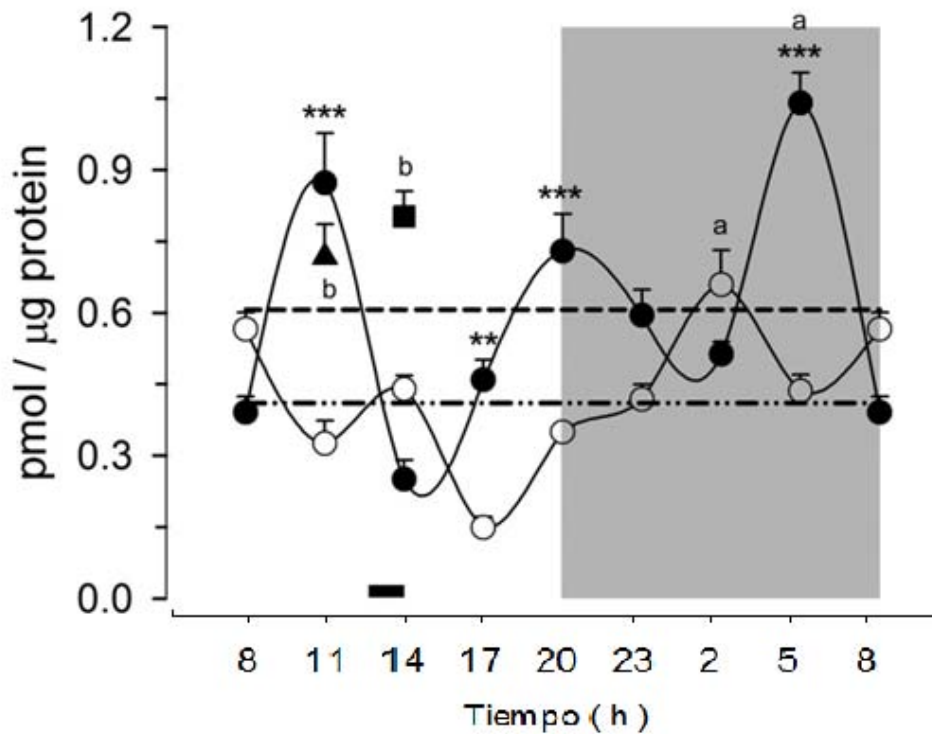


Figura 6. Variación diaria del L-triptófano hepático. El grupo AL muestra un patrón significativo con tres picos (11:00, 20:00 y 05:00 h) y en el grupo HRA promovió un cambio en el patrón, mostrando a las 17:00 h niveles altos durante las últimas horas del periodo de oscuridad. Cada punto representa el promedio \pm error estándar. Acceso al alimento (●) en HRA (12:00 a 14:00 h). (▲) AL, (■) HRA, (○) Ay, (○) Ay-Re, (—) mesor AL, (---) mesor HRA. ANOVA de una (a) y dos vías, la prueba *post hoc* para ambos casos fue Bonferroni. (**) $p < 0.001$, (***) $p < 0.0001$. (b) t- Student test $p < 0.05$. $n = 4$.

Tabla 2. Análisis cronobiológico de algunos parámetros medidos en el hígado y la sangre.

	L-Trp		5-HTP		5-HT		Actividad enzimática TPH		MAO-A mRNA		5-HT Suero		5-HT Plasma		Conteo de plaquetas	
	AL	HRA	AL	HRA	AL	HRA	AL	HRA	AL	HRA	AL	HRA	AL	HRA	AL	HRA
Periodo	8	24	12	12	24	12	24	24	24	24	24	24	24	24	8	24
Amplitud	0.2	0.1	0.2	0.2	0.4	0.2	12	9	1.3	0.6	96	91	6	5	317	197
% Ritmo	47	56	21	50	58	35	50	75	43	54	85	75	60	44	66	48

El 5-hidroxitriptofano es un metabolito intermediario entre la conversión del L-triptófano a serotonina, usando HPLC por el método electroquímico se cuantificó y presentó una variación diaria en el hígado: En la Figura 7 se muestra la cuantificación de este metabolito durante las 24 h. El grupo AL mostro un patrón con dos picos de concentración, uno a las 08:00 y 20:00 h. El pico a las 08:00 h, justo al comenzar el periodo de luz tuvo un cambio gradual hasta las 18:00 h, en contraste con el pico de las 20:00 h, al inicio del periodo de oscuridad, que se presenta mucho más suave y limitado a un punto temporal. El protocolo HRA cambio algunos aspectos del patrón rítmico del 5-HTP, pues también mostró dos picos, uno al inicio del periodo de luz (08:00 h) similar al que se presentó en el grupo AL y el segundo pico se presentó a las 17:00 h, diferente del grupo AL. Otra diferencia fue que en el caso de las ratas con HRA, los dos picos eran menos pronunciados, ya que ambos mostraron aumentos en los niveles de 5-HTP. El patrón diario en las ratas AL se ajustó a un periodo de 12 h pero con baja ritmicidad (~21 %), mientras que las variaciones temporales del 5-HTP en ratas con HRA también se ajustaron a un periodo de 12 h pero con una ritmicidad cercana al 50% (Tabla 2). Diferencias significativas entre los dos grupos experimentales también se detectaron a las 17:00 y a las 20:00 h, sin presentar un cambio significativo entre los promedios de las 14 h entre ambos grupos. (ANOVA de dos vías $p < 0.05$; $F_{(7,42)} = 7.232$). Los niveles de 5HTP no fueron sensibles al ayuno ni al periodo de ayuno con alimentación.

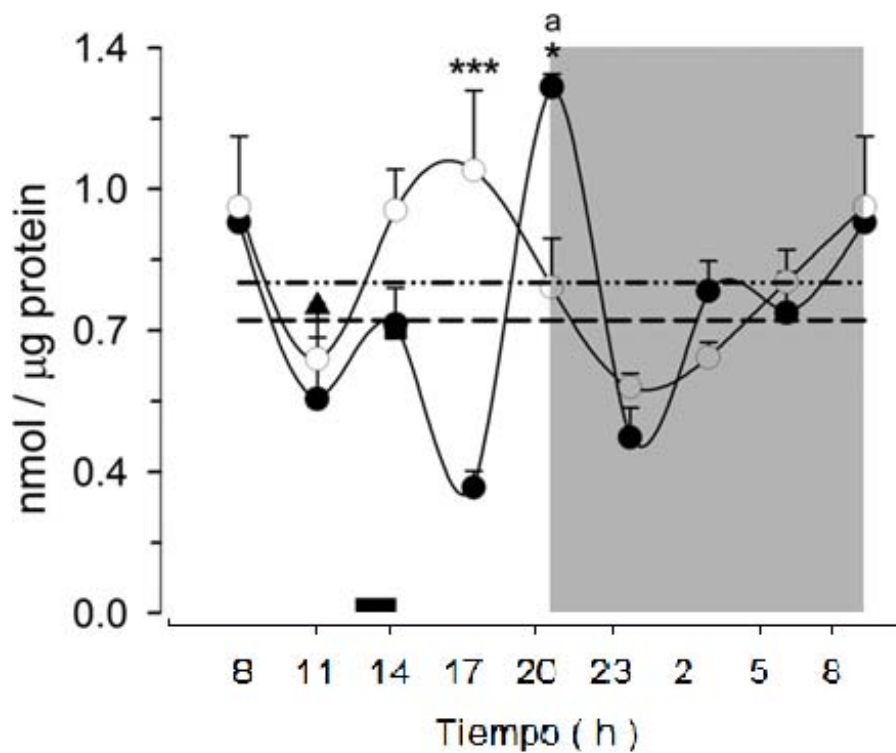


Figura 7. 5-HTP en el grupo AL mostró un patrón con dos picos claros (08:00 y 20:00 h) mientras que en el grupo con restricción HRA cambió su ritmicidad en dos puntos similar al que se muestra en ratas AL. Cada punto representa el promedio \pm error estándar. Acceso al alimento (■) en HRA (12:00 a 14:00 h). (●) AL, (○) HRA, (▲) Fa, (■) Fa-Re (—) mesor AL, (---) mesor HRA, ANOVA de una (a) y dos vías, la prueba *post hoc* para ambos casos fue Bonferroni. (**) $p < 0.001$, (***) $p < 0.0001$. (b) t- Student test $p < 0.05$. $n = 4$.

La cuantificación de serotonina por HPLC se realizó por el método electroquímico de muestras de hígado se muestra en la Figura 8. El grupo AL mostró variaciones diarias contundentes, siendo el periodo de oscuridad la fase donde se presentó una menor concentración y niveles significativamente más altos durante el periodo de luz (ANOVA de una vía ANOVA $p < 0.05$, $F_{(7,24)} = 33.97$, *post hoc* Bonferroni 's test). Un pico de concentración se observó durante las primeras horas de la fase de luz (08:00 h), durante la transición del periodo oscuridad a la luz. Este patrón fue alterado drásticamente por el protocolo HRA, ya que las concentraciones fueron en promedio menores que el grupo AL, aunque no significativas, además de que la concentración en el periodo de luz es menor y aumenta durante el periodo de oscuridad. Se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos a las 08:00, 11:00, 14:00, 02:00 y 05:00 h (ANOVA dos vías $p < 0.05$: $F_{(7, 24)} = 18$; *post hoc* Bonferroni 's test). El grupo AL tuvo un ajuste del 50% de ritmo a un periodo de 24 h, en contraste con el grupo HRA que presentó un ajuste cercano al 36% a un periodo de 12 h (Tabla 2). Los grupos Ay y Ay-Re mostraron valores similares al grupo HRA.

Un aspecto importante de estas determinaciones realizadas en el hígado, es que la concentración del aminoácido precursor, L-triptófano, fue menor que las concentraciones de 5-HTP y serotonina, lo que sugiere que este aminoácido es limitante de la velocidad del metabolismo de la serotonina.

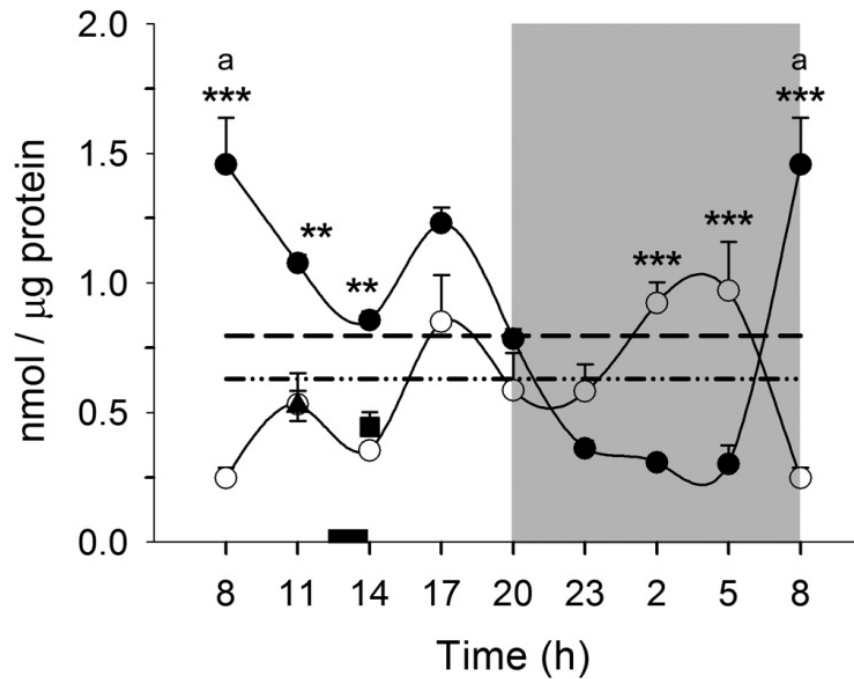


Figura 8. Variación diaria de la 5-HT hepática. En el grupo AL mostró un ciclo bien definido con un mínimo en la concentración durante el periodo de oscuridad y significativamente niveles más grandes durante el periodo de luz, pero este patrón fue alterado por el protocolo de HRA. Cada punto representa el promedio \pm error estándar. Acceso al alimento (■) en HRA (12:00 a 14:00 h). (●) AL, (○) HRA, (▲) Fa, (■) Fa-Re (—) mesor AL, (---) mesor HRA, ANOVA de una (a), prueba *post hoc* Bonferroni. (**) $p < 0.001$, (***) $p < 0.0001$. $n = 4$.

TRIPTÓFANO HIDROXILASA-1 EN EL HÍGADO, EXPRESIÓN, CANTIDAD Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

Esta sección describe el perfil diario de los parámetros bioquímicos de la triptófano hidroxilasa-1, la enzima limitante de la síntesis de la serotonina. La expresión del RNAm de la enzima a pesar de que es muy baja presenta un patrón bimodal con picos durante el periodo de luz (14:00 h) y durante el periodo de oscuridad (23:00 h). El protocolo de HRA promovió que este patrón bimodal se aboliera en el perfil de expresión. También fue notable que el ayuno agudo aumentara significativamente el nivel de expresión del RNAm; efecto que se pierde después del periodo de alimentación (Figura 9). El RNAm para la isoforma TPH-2 no mostró amplificación en las muestras de hígado (datos no mostrados).

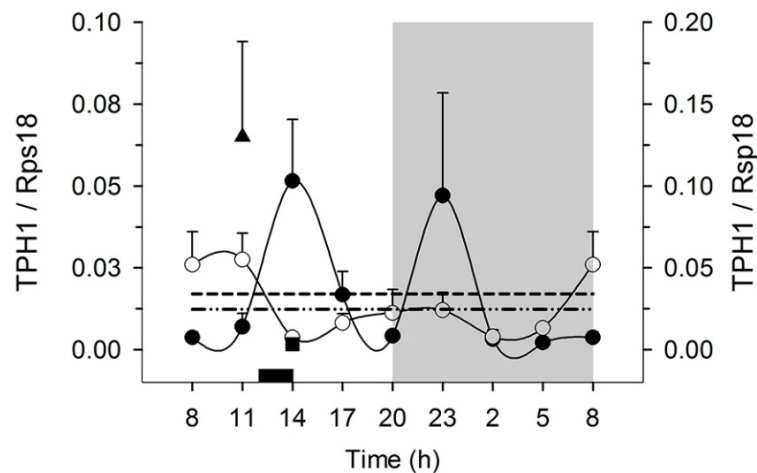


Figura 9. Variaciones diarias del mRNA de la TPH-1 en el hígado. El grupo AL mostró un patrón bimodal y el protocolo HRA inhibió esta ritmicidad. Cada punto representa el promedio \pm error estándar. Acceso al alimento (■) en HRA (12:00 a 14:00 h). (●) AL, (○) HRA, (▲) Fa, (■) Fa-Re (—) mesor AL, (---) mesor HRA. n = 4.

La figura 10 muestra las variaciones diarias de la actividad de la TPH determinada en homogenado de hígado por un ensayo enzimático acoplado. El perfil de 24-h en el grupo AL indicó un ritmo claro con un pico en la transición entre los periodos de luz y oscuridad (8:00 h). Hubo una disminución significativa durante el período de oscuridad (ANOVA de una vía $p < 0,05$, $F_{(7, 22)} = 30.69$, *post hoc* Bonferroni). El perfil del grupo HRA fue similar, con una notable excepción: no se observó el pico de las 08:00 h; así, la actividad TPH fue significativamente menor en las ratas bajo el esquema de HRA. También se detectó otra reducción significativa a las 14:00 h (Kolmogorov-Smirnov de dos vías, $p < 0,05$). En general, el grupo HRA tuvo los valores más altos durante el período de luz (prueba de Kruskal-Wallis = 25.11, $P = 0,0007$, $p < 0,05$). Ambos grupos se ajustaron a un ritmo de 24-h, con una ritmicidad del 50% para el grupo AL y del 75% para el grupo HRA (Tabla 2). Los grupos que representan el control de las condiciones de alimentación mostraron valores significativamente más bajos que los grupos de AL y HRA.

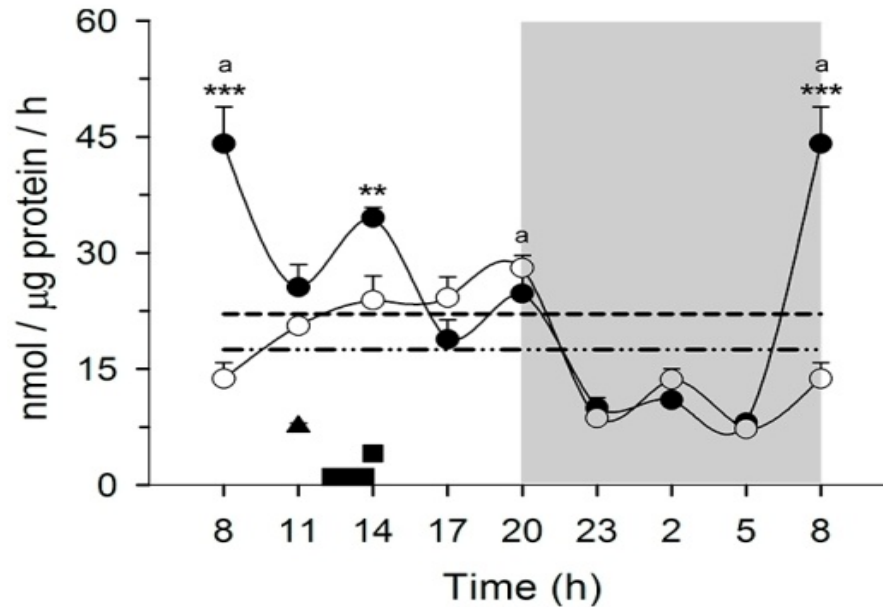


Figura 10. Variaciones diarias de la actividad de la TPH. El grupo AL indica un ritmo claro con un pico a las 08:00 h y el grupo HRA donde el patrón de actividad es similar al en ambos casos. Cada punto representa el promedio \pm error estándar. Acceso al alimento (■) en HRA (12:00 a 14:00 h). (●) AL, (○) HRA, (▲) Fa, (■) Fa-Re (—) mesor AL, (---) mesor HRA. Kolmogorov-Smirnov de dos vías, $p < 0,05$ (a). (**) $p < 0.001$, (***) $p < 0.0001$. $n = 4$.

Las variaciones diarias de la proteína TPH-1 se evaluaron en la fracción citosólica del hígado mediante el ensayo de Western-blot. En la figura 11 el anticuerpo anti-TPH-1 detectó una banda definida con el peso molecular esperado (~ 50 kDa). Al igual que en la actividad de la TPH, el grupo AL mostraron un ritmo bien definido para la cantidad relativa de la proteína TPH-1 hepática, con una elevación a las 08:00 y a las 11:00 h y niveles significativamente más bajos en los otros puntos temporales (desde las 14:00 hasta 05:00 h). El grupo HRA no mostró un patrón rítmico de la proteína TPH-1 citosólica, y los niveles en esta condición estuvieron

presentes más bajos que en el grupo AL durante la primera parte de la fase de luz (08:00-14:00 h) (Kolgomorov-Smirnov de dos vías, $p < 0,05$). La señal de la TPH-1 en el ayuno agudo y el ayuno con el posterior periodo de alimentación mostraron niveles similares a los del grupo HRA, y significativamente más bajos que los de las ratas AL.

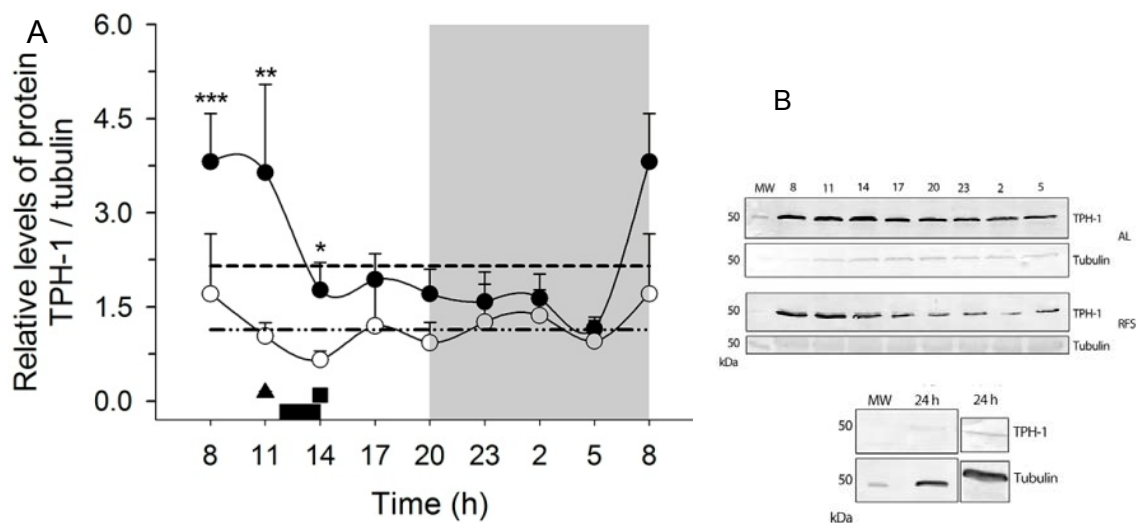


Figura 11. Variación diaria de la proteína TPH-1. A) En el grupo AL es muy similar a la abundancia relativa mostrada en el grupo HRA, sin presentar un patrón rítmico. B) Imagen representativa de la fracción citosólica, se utilizó tubulina como control de carga en todos los casos. Cada punto representa el promedio \pm error estándar. Acceso al alimento (■) en HRA (12:00 a 14:00 h). (●) AL, (○) HRA, (▲) Fa, (■) Fa-Re (—) mesor AL, (---) mesor HRA. Kolgomorov-Smirnov, $p < 0,05$ (a). (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.001$, (***) $p < 0.0001$. $n = 4$.

La presencia de la proteína TPH-1 se estudió por mediante la técnica de inmunohistoquímica. En la figura 12, se presenta la tinción para esta proteína en las dos condiciones. La proteína TPH-1 en el hígado mostró menor intensidad en el grupo HRA que en la condición AL, lo que confirma los resultados observados en WB y ensayos de actividad enzimática.

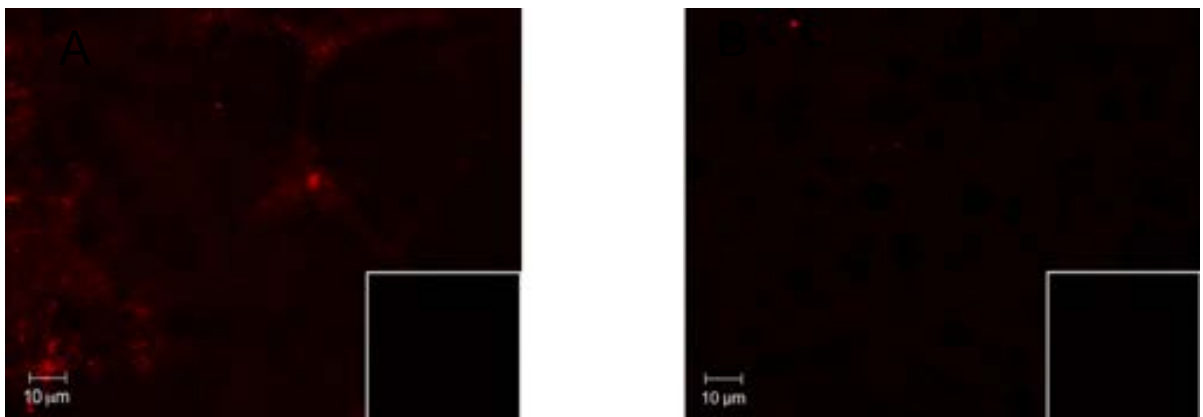


Figura 12. Inmunohistoquímica de la proteína TPH-1. La marca de la proteína en el hígado, se observa más intensa en la condición AL (A) que en el grupo HRA (B).

LA PROTEÍNA MAO-A PRESENTA UN RITMO DIARIO

Una molécula transmisora requiere de un sistema complejo de síntesis y una maquinaria de liberación, sin embargo, también se requiere de un sistema de recaptura o degradación. Por lo que en este proyecto se abordó el estudio de la proteína MAO-A en el hígado, la enzima que preferentemente degrada a la serotonina.

Las variaciones diarias del RNAm de la proteína MAO-A en ratas con alimentación *ad libitum* así como bajo el régimen de alimentación de dos horas se muestran en la figura 13. Las ratas del grupo AL mostraron un ritmo bimodal en la expresión. Se detectaron dos picos principalmente, uno durante el período de luz (14:00-17:00 h) y el segundo durante todo el período de oscuridad (23:00-5:00 h). En contraste, en el grupo HRA se perdió la ritmicidad. No se detectaron diferencias significativas. De la misma manera, el RNAm para MAO-A en los grupos utilizados como control de las condiciones de alimentación no mostró ningún cambio, y fueron similares a los grupos de AL y HRA.

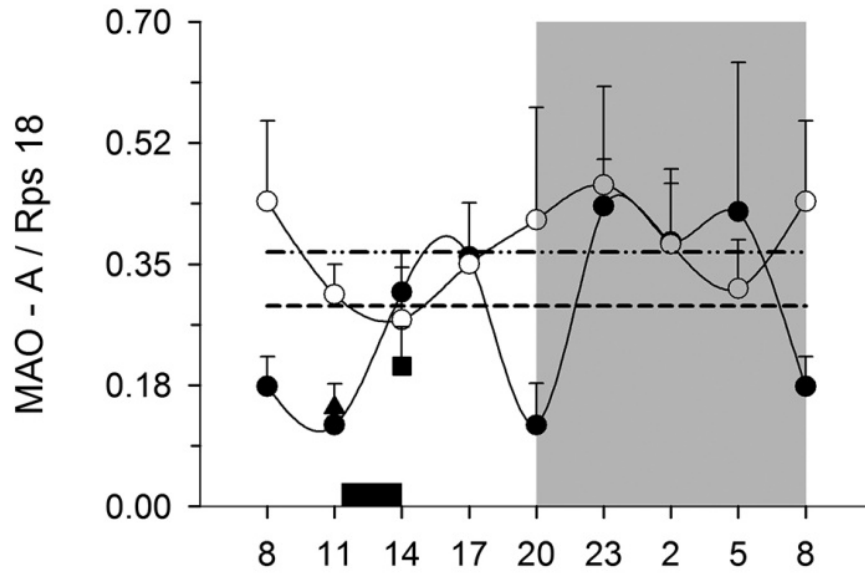


Figura 13. Perfil de expresión del RNAm de MAO-A. Las ratas AL mostraron un ritmo bimodal en la expresión, el grupo HRA pierde este patrón. El ayuno y el ayuno-realimentación no presentan diferencias significativas entre los grupos. Cada punto representa el promedio \pm error estándar. Acceso al alimento (■) en HRA (12:00 a 14:00h). (●) AL, (○) HRA, (▲) Fa, (■) Fa-Re (—) mesor AL, (-·-) mesor HRA. n= 4.

El perfil diario de la proteína MAO-A, analizada por Western-blot de la fracción mitocondrial de hígado se muestra en la figura 14. El grupo AL mostró un ritmo bien definido con un pico a las 08:00 h y una meseta con valores más bajos desde las 11:00 hasta las 5:00 h. El patrón en las ratas HRA fue diferente, ya que la abundancia relativa de la proteína MAO-A fue significativamente menor a lo largo de todo el ciclo de 24 h, y se detectó un único pico en el comienzo de la oscuridad (20:00 - 23:00 h). Ambos grupos fueron significativamente diferentes a las 08:00, 14:00, 02:00 y 05:00 h (Kolmogorov-Smirnov de dos vías $p < 0,05$). El análisis cronobiológico por Cosinor arrojó una ritmicidad similar en ambos grupos: 43% en ratas AL y 54% en ratas HRA (Tabla 2). Por otro lado el ayuno agudo y el ayuno con la subsecuente realimentación mostraron niveles similares de la proteína MAO-A, valores que fueron intermedios entre el AL y el grupo HRA (Mann Whitney $p = 0,0379$).

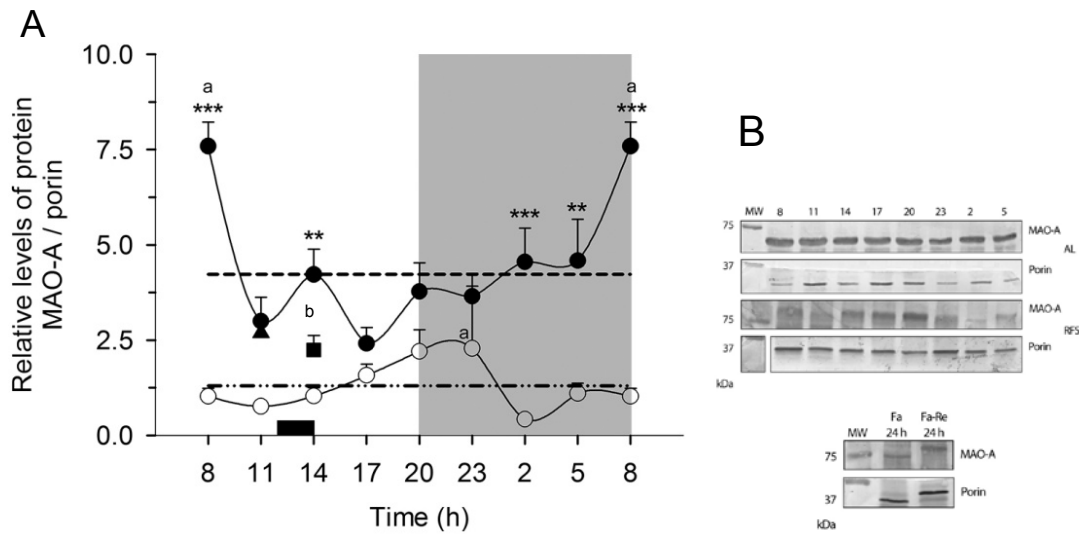


Figura 14. Variación diaria de la abundancia relativa de la proteína MAO-A. A) El WB fue desarrollado en la fracción mitocondrial. El grupo AL mostró una variación bien definida, con un aumento significativo en la primera fase de luz; mientras que en el grupo HRA el patrón fue significativamente más bajo en todo el perfil de las 24-h. B) Imagen representativa del WB analizada en un gel de poliacrilamida del 10% y transferida a una membrana de nitrocelulosa. La proteína porina se utilizó como control de carga para todas las condiciones. Cada punto representa el promedio \pm error estándar. Acceso al alimento (■) en HRA (12:00 a 14:00 h). (●) AL, (○) HRA, (▲) Fa, (■) Fa-Re (—) mesor AL, (- - -) mesor HRA. Kolmogorov-Smirnov, $p < 0,05$ (a). Mann Whitney $p < 0,05$ (b). (**) $p < 0.001$, (***) $p < 0.0001$. $n = 4$.

SEROTONINA CIRCULANTE, DIFERENCIAS ENTRE SUERO Y PLASMA

Se ha mencionado anteriormente que la serotonina es sintetizada preferentemente en las células enterocromafines del tracto gastrointestinal, esta serotonina es liberada y almacenada para su transporte a través de las plaquetas. En estas células se almacenan en vesículas, que forman gránulos densos y son liberadas en los diferentes órganos y tejidos a través de su camino por el sistema circulatorio. Por lo tanto, se cuantificó la serotonina en los componentes sanguíneos, suero y plasma.

Las muestras de sangre analizadas para el plasma fueron pre-tratadas con EDTA. Como se muestra en la figura 15-A los niveles de serotonina en el plasma fueron cuantificados por el método de HPLC electroquímico. Los resultados fueron muy similares en las ratas AL y HRA. Ambos mostraron una variación diaria marcada con una mayor concentración de serotonina durante el período de luz (ANOVA de una vía $p = <0,0001$, $F_{(7, 23)} = 11.66$ y $p = <0,0001$, $F_{(7, 22)} = 8,072$, *post hoc* Bonferroni). El análisis cronobiológico con Cosinor arrojó una ritmicidad del 60% en el grupo AL y del 44% en el grupo HRA (Tabla 2). Por el contrario, el ayuno agudo y el ayuno con la posterior realimentación mostraron valores notablemente más bajos de serotonina (T-test, $p = 0,028$). Este perfil de concentración de serotonina fue notablemente diferente en el suero (Figura 15-B). En el grupo AL, en el suero y el plasma los niveles de serotonina mostraron patrones similares; sin embargo, el protocolo de alimentación o HRA promovió un perfil inverso, es decir,

los valores se mostraron más altos durante el período de oscuridad y los valores más bajos durante el período de luz (ANOVA de una vía, $p < 0,05$, $F_{(7, 24)} = 14.56$ y $F_{(2, 22)} = 11,07$, prueba *post hoc* de Bonferroni $p < 0,05$). Ambos grupos fueron significativamente diferentes en los siete puntos temporales (ANOVA de dos vías, $p < 0,05$, $F_{(7, 24)} = 21.26$, prueba *post hoc* de Bonferroni $p < 0,05$). La concentración de serotonina en el suero fue 10 veces mayores que en el plasma. El análisis cronobiológico ajustó un porcentaje alto de ritmicidad, 85% y 75% para los grupos de AL y HRA, respectivamente. En la fracción del plasma, también se observó una marcada reducción en los valores de serotonina en los grupos de ayuno y ayuno más la realimentación de dos horas, (t-test $p = 0,028$).

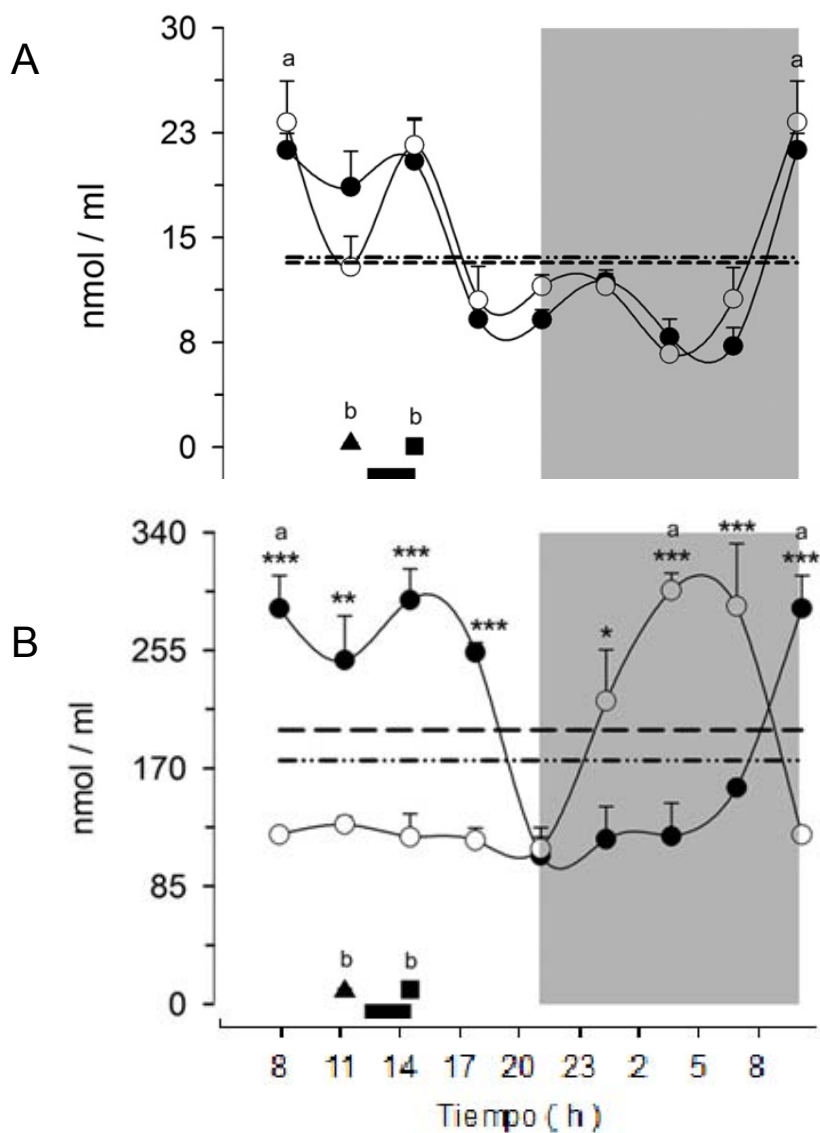


Figura 15. Concentración de 5-HT en sangre. A) Los niveles de 5-HT en el plasma fueron similares en el grupo AL y HRA. B) Los niveles de 5-HT en el suero en el grupo AL mostraron un patrón similar que en plasma, sin embargo, el protocolo de alimentación restringida promovió un patrón inverso, con valores altos durante el periodo de luz y valores más bajos durante la fase de luz. Cada punto representa el promedio \pm error estándar. Acceso al alimento (—) en HRA (12:00 a 14:00 h). (●) AL, (○) HRA, (▲) Fa, (■) Fa-Re (—) mesor AL, (---) mesor HRA. ANOVA de una (a) y dos vías, la prueba *post hoc* para ambos casos fue Bonferroni. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.001$, (***) $p < 0.0001$. (b) t-Student test $p < 0.05$. $n = 4$.

Debido a la variación diaria de la concentración de serotonina en el suero y su relación con el transporte a través de las plaquetas, se evaluó el contenido plaquetario para ambas condiciones (Figura 16). A excepción del temporal de las 08:00 h, donde se presentaron valores más altos de *serotonina* en el grupo HRA, el perfil de ambos tratamientos fue muy similar (ANOVA de una vía $p < 0,05$, $F_{(7, 20)} = 14,60$ y $F_{(7, 20)} = 4,065$, *post hoc* de Bonferroni test). El análisis cronobiológico en el grupo AL mostró un porcentaje de ritmicidad del 66% (período de 8 h), mientras que el grupo HRA ajustó su periodo a un ~ 48% de ritmicidad (periodo de 24 h) (Tabla 2). No se observaron diferencias significativas con los grupos de control de las condiciones de alimentación (Ay y Ay-Re).

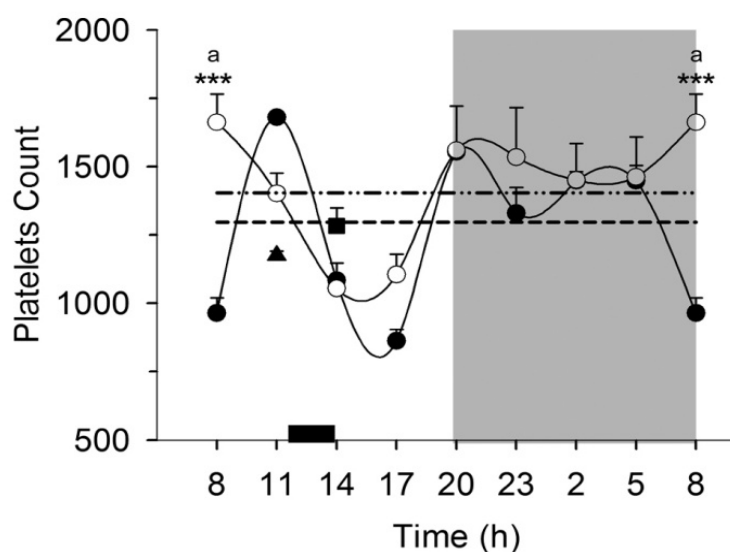


Figura 16. Conteo de plaquetas. Ambos tratamientos presentaron un patrón similar en el número de plaquetas. Cada punto representa el promedio \pm error estándar. Acceso al alimento (■) en HRA (12:00 a 14:00 h). (●) AL, (○) HRA, (▲) Fa, (■) Fa-Re (—) mesor AL, (---) mesor HRA, ANOVA de una vía (a), prueba *post hoc* Bonferroni $p < 0.05$. (***) $p < 0.0001$. $n = 4$.

RECEPTORES DE SEROTONINA 5-HT_{1A} Y 5-HT_{2C} EN EL HÍGADO

Estudios previos de microarreglos realizados en nuestro grupo de trabajo (datos no publicados) revelaron cambios significativos en dos tipos de receptores de serotonina, dichos receptores fueron evaluados en este proyecto por WB e inmunohistoquímica. Los resultados analizados por WB en homogenado, para la proteína 5-HT_{1A} se muestran en la figura 17. El grupo AL presentó una disminución en la abundancia de la proteína, aunque no existe diferencia significativa. En el grupo HRA no se notaron cambios significativos durante las 24-h. Sin embargo, el perfil temporal para ambas condiciones, aunque no es estadísticamente significativo, es muy similar. El efecto del ayuno agudo y el ayuno con el periodo de alimentación no tuvo efectos significativos, aunque tiene una tendencia a disminuir dicha abundancia.

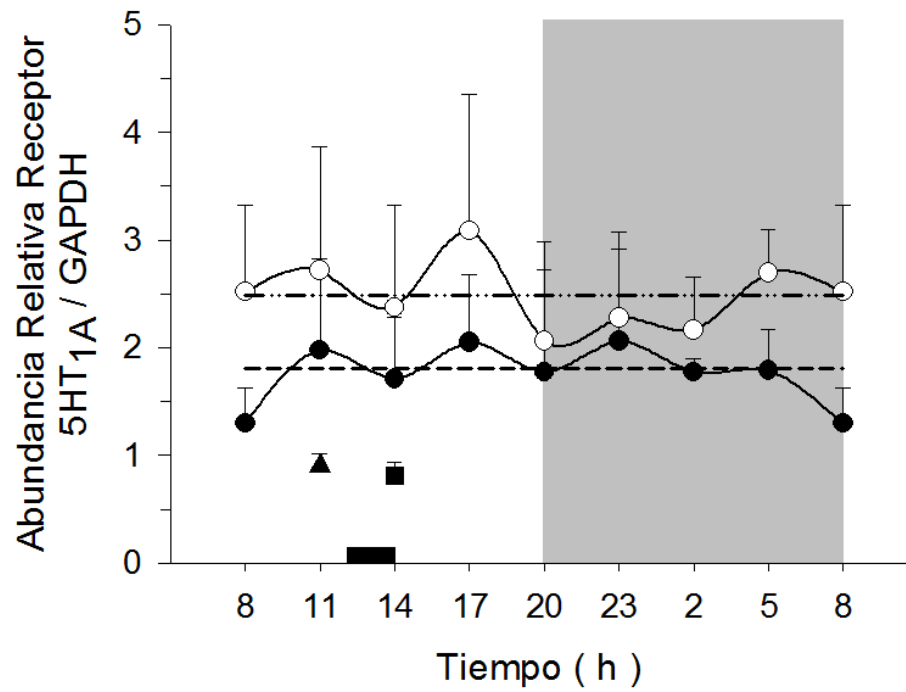


Figura 17 . Perfil temporal del receptor 5-HT_{1A}. El patrón del grupo AL, aunque tuvo una menor abundancia, y el grupo HRA es similar durante las 24-h. Cada punto representa el promedio ± error estándar. Acceso al alimento (▬) en HRA (12:00 a 14:00 h). (●) AL, (○) HRA, (▲) Fa, (■) Fa-Re (—) mesor AL, (---) mesor HRA. n = 4.

Debido a que se ha documentado la presencia de este receptor a nivel citosólico, se estudió la presencia de este receptor en esta fracción del hígado. Los resultados encontrados se muestran en la figura 17. El patrón temporal de ambas condiciones es similar, en ambos casos, aunque la abundancia en el grupo HRA es en promedio menor, se observa un aumento significativo durante la fase de la oscuridad y niveles bajos durante la fase de luz (ANOVA de una vía $p < 0,05$, $F_{(7, 20)} = 14,60$ y $F_{(7, 20)} = 4,065$, *post hoc* de Bonferroni). El control de la condición de alimentación (AY y AY-Re) no presenta cambios significativos ya que los valores son muy similares entre las condiciones.

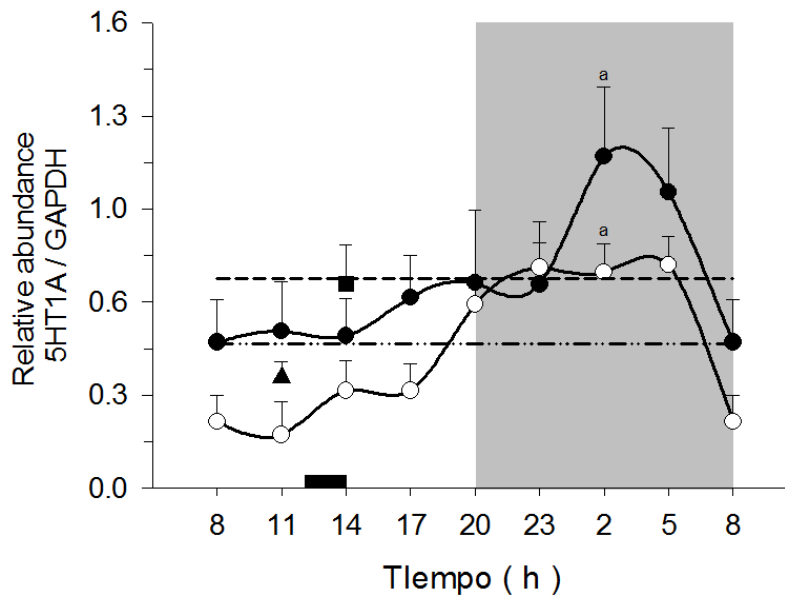


Figura 18. Variación diaria del receptor 5-HT_{1A} en la fracción citosólica. El patrón temporal para ambas condiciones es similar. Sin efecto significativo el ayuno agudo y el ayuno más el periodo de alimentación. Cada punto representa el promedio \pm error estándar. Acceso al alimento (■) en HRA (12:00 a 14:00 h). (●) AL, (○) HRA, (▲) Fa, (■) Fa-Re (—) mesor AL, (---) mesor HRA, ANOVA de una vía (a), prueba *post hoc* Bonferroni. (*) $p < 0.05$ $n = 4$.

La abundancia de la proteína del receptor 5-HT_{2C} en el homogenado del hígado se muestra en la figura 19. El perfil temporal para el grupo AL presenta un aumento significativo durante el periodo de la oscuridad, y una disminución en la fase de luz (ANOVA de una vía $p < 0,05$, $F_{(7, 20)} = 18,60$ y $F_{(7, 20)} = 5,065$, *post hoc* de Bonferroni test). Por otro lado, este receptor en el grupo HRA no mostró cambios significativos durante las 24-h. En promedio se mantuvo constante la abundancia y significativamente menor con respecto al grupo control (t-test, $P = 0.0002$). El ayuno agudo y el ayuno-realimentación presentaron diferencias significativas con respecto al grupo HRA (t- test $P = 0.0049$ y $P = 0.0003$ respectivamente).

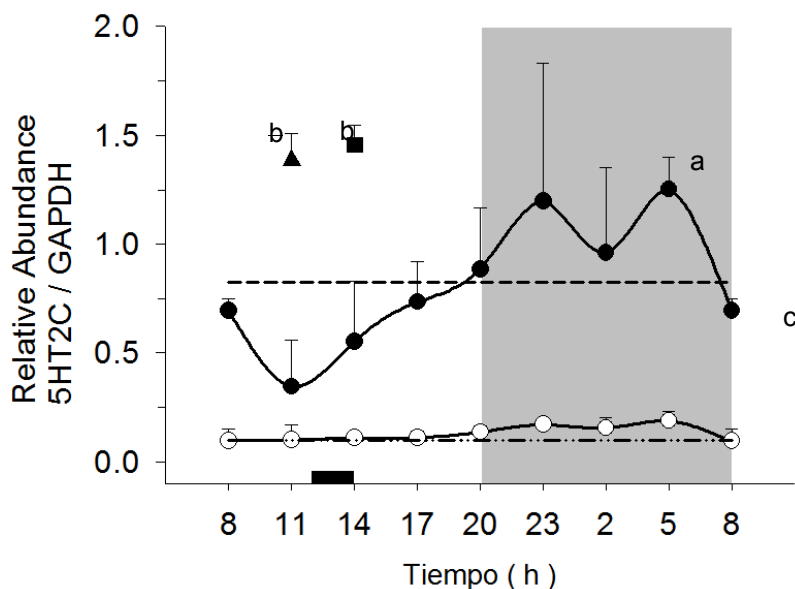


Figura 19. Variación diaria del receptor 5-HT_{2C} en homogenado de hígado. El grupo AL mostró un aumento durante la fase de luz y disminución durante la fase de luz. El grupo HRA no tiene ningún cambio durante las 24-h. Los controles de alimentación presentan en ambos casos, aumentos significativos con respecto al grupo HRA. Cada punto representa el promedio \pm error estándar. Acceso al alimento (■) en HRA (12:00 a 14:00 h). (●) AL, (○) HRA, (▲) Fa, (■) Fa-Re (—) mesor AL, (---) mesor HRA. ANOVA de una vía (a), prueba *post hoc* Bonferroni. (*) $p < 0.05$. t- student $p < 0.05$ (c). $n = 4$.

La abundancia relativa de la proteína del receptor 5HT_{2C} en la fracción citosólica, en el grupo AL se mostró con un perfil temporal similar a la del homogenado. Sin embargo la cantidad relativa entre ambas fracciones fue mayor en la fracción citosolica. El patrón del grupo HRA al igual que en el homogenado se presentó por debajo del promedio del grupo control (t- test, P = 0.0004). El ayuno agudo y el ayuno más el periodo de alimentación no presentaron cambios significativos con respecto al grupo HRA (Figura 20).

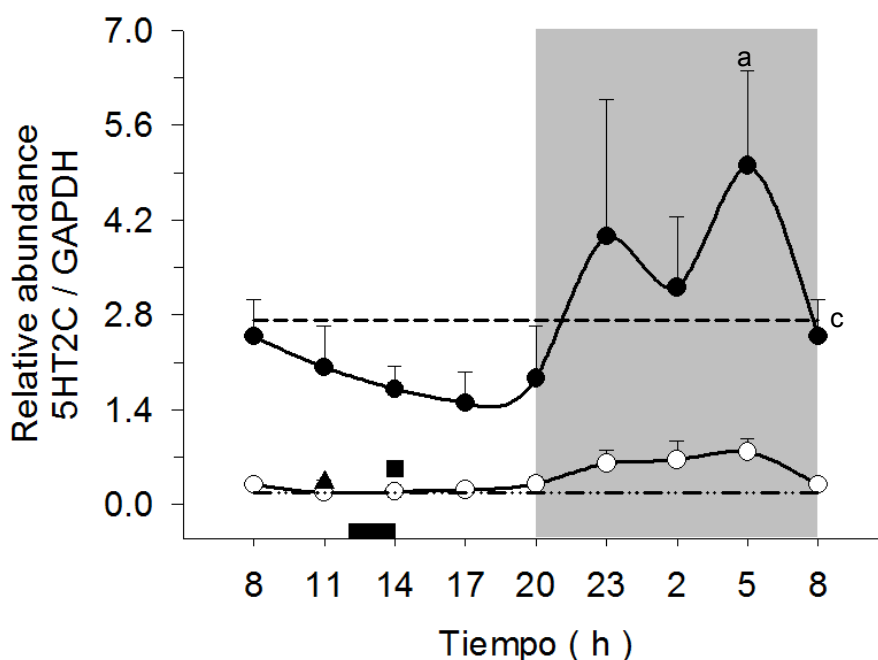


Figura 20. Variación diaria del receptor 5-HT_{2C}. El perfil diario corresponde a la fracción citosólica. El grupo AL presenta un aumento significativo durante la fase de oscuridad y valores bajos durante la fase de luz. El grupo HRA no presenta diferencias durante las 24-h. No hay un cambio significativo en el grupo de alimentación (AY y AY-Re). Cada punto representa el promedio \pm error estándar. Acceso al alimento (▲) en HRA (12:00 a 14:00 h). (●) AL, (○) HRA, (▲) Fa, (■) Fa-Re (—) mesor AL, (-·-) mesor HRA. ANOVA de una vía (a), prueba *post hoc* Bonferroni. (*) $p < 0.05$. t- student $p < 0.05$ (c). $n = 4$.

La inmunofluorescencia para el receptor 5HT_{1A} y 5HT_{2C} se muestran en la figura 21. El grupo AL muestra una tinción menor (Figura 21-A) que la presentada en el grupo HRA (Figura 21-C). Lo que corrobora la abundancia relativa presentada para el homogenado por WB. Sin embargo en la fracción citosólica el grupo AL, muestra un aumento significativo durante la fase de oscuridad, que corresponde con la inmunofluorescencia realizada a las 23:00 h de dicho grupo. En el panel B se observa un marcaje positivo a nivel citoplasmático, corroborando estos datos. Por otro lado el receptor 5HT_{2C} presentó una marca mayor en el grupo AL (Figura 21-D) y esta disminuye en el grupo HRA (Figura 21-F), que corresponde a los resultados observados en el WB para esta proteína. La fracción citosólica en el WB mostró un aumento del receptor durante la fase obscura, que corresponde con el marcaje inmunopositivo. En el panel E, se muestra un corte de las 23:00 h con inmunopositividad a nivel citoplasmático.

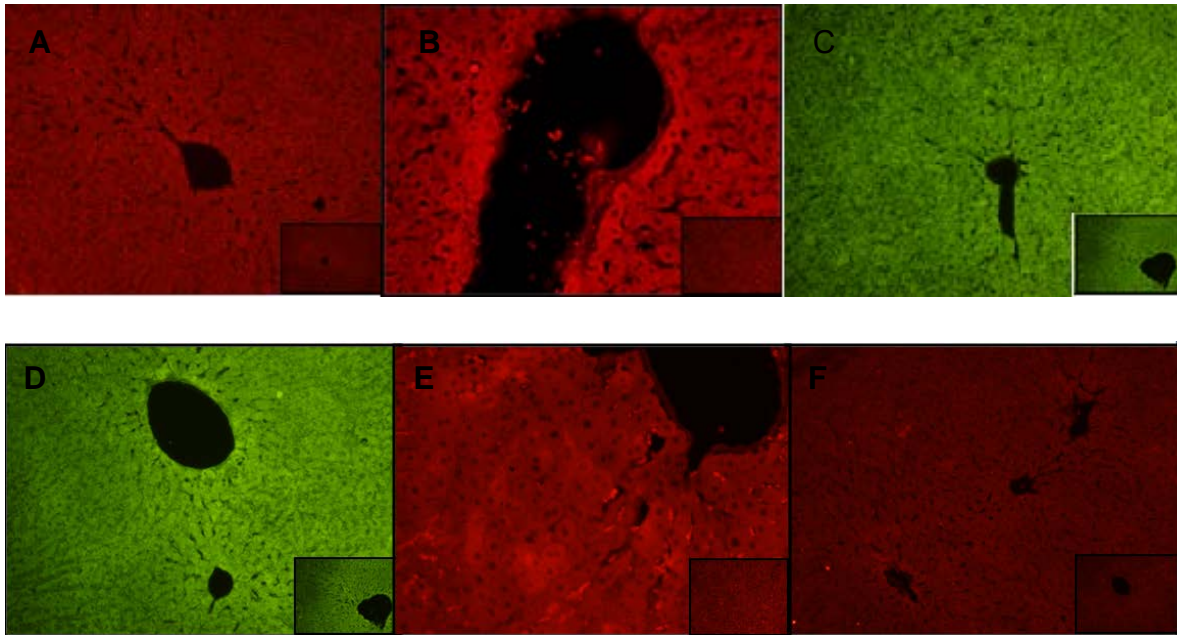


Figura 21. Inmunofluorescencia para los receptores $5HT_{1A}$ y $5HT_{2C}$. En el grupo AL el receptor $5-HT_{1A}$ (A) AL-08:00 h y (B) AL 23:00 h, muestra menor marca en relación al grupo HRA (C) 23:00 h donde la localización de este receptor es más abundante a nivel citoplasmático. La inmunopositividad del receptor $5HT_{2C}$ en el grupo AL es mayor (D) 08:00 h y (E) 23:00 h, que la presentada en el grupo HRA (F) 08:00 h. Las imágenes presentadas en la parte inferior derecha corresponden al control negativo.

DISCUSIÓN

El presente estudio proporciona los primeros datos relacionados con las variaciones diarias de la presencia y la actividad de elementos claves para el metabolismo de la serotonina, además de enzimas metabolizadoras y proteínas receptoras de serotonina en el hígado de rata. La mayoría de los parámetros estudiados mostraron fluctuaciones claras durante el período de 24 h en condiciones de alimentación *ad libitum*. Por otra parte, estos ritmos se amortiguan significativamente bajo el protocolo de alimentación restringida o HRA. Además del perfil rítmico dentro del hígado, la serotonina también mostró fluctuaciones diarias en su transporte en la sangre. Este parámetro fue drásticamente modificado por el protocolo HRA e implica adaptaciones importantes en la capacidad que poseen las plaquetas para manejar la serotonina.

LA RESTRICCIÓN DE ALIMENTO REDUJO LA CONCENTRACIÓN DE TRIPTÓFANO Y SEROTONINA EN EL HÍGADO.

El hígado es un órgano que participa activamente en los procesos de alimentación, en el proceso digestivo y es un integrador de la disponibilidad de nutrientes del organismo [Langhans, 1996]. Se sabe que el aminoácido L-triptófano, precursor para la síntesis de serotonina, es proporcionado en la dieta [Cansev M, 2007] y en el hígado, puede ser incorporado en las proteínas o bien ser transformado en la vía de la quinurenina. Esta vía es responsable de casi el 90% del catabolismo del triptófano, además de actuar como el precursor para la

síntesis de serotonina [Sainio et al., 1996]. Recientemente, se ha documentado que el L-triptófano actúa como precursor de ciertos metabolitos que controlan la expresión de la ciclooxigenasa, una proteína que participa en procesos de inflamación y la tumorigénesis [Wu et al., 2014]. La Figura 6 muestra que los niveles hepáticos de L-triptófano eran ~ 1.000 veces menor que los de 5-HTP y serotonina. Los niveles bajos de L-triptófano en el hígado son indicativos de que la compartimentación y la disponibilidad de este aminoácido podría ser un factor regulador, además de la actividad de sus enzimas metabolizadoras y la presencia de sus cofactores necesarios. En algunos puntos temporales, el horario de restricción promovió una marcada reducción de L-triptófano y serotonina que no se observó en 5-HTP. Hasta el momento no se han reportado funciones fisiológicas claras del 5-HTP en el cerebro, pero en el intestino, se sabe que contribuye al desarrollo de las microvellosidades intestinales [Nakamura y Hasegawa, 2009]. Además, algunas propiedades antioxidantes han sido asociadas con el 5-HTP. Es evidente que la condición HRA induce un nuevo estado de equilibrio en el hígado entre el L-triptófano - serotonina. El nuevo estado metabólico de la L-triptófano y la serotonina en el hígado bajo el protocolo HRA también puede deducirse ante la respuesta que estos metabolitos mostraron en los grupos de ayuno y ayuno más la realimentación (AY y AY-Re), controles de las condiciones de alimentación. Mientras que los niveles de L-Triptófano después del AY y AY-Re fueron similares en las ratas AL, los niveles de serotonina en estos 2 grupos se parecían a los de las ratas bajo el protocolo HRA (Figura 6-8). Lo que podría implicar que el triptófano se utiliza en otras vías.

EL PROTOCOLO HRA REDUCE LA CANTIDAD Y LA ACTIVIDAD DE TPH-1 HEPÁTICA.

En circunstancias normales la concentración de L-triptófano es considerablemente menor que la K_m de TPH; Por lo tanto, la enzima no está saturada con el sustrato [Tyce, 1990]. La isoforma presente en el hígado es exclusivamente de tipo 1; la TPH-2 no se encontró mediante experimentos de qPCR (Figura 9, Tabla 1). Aunque la TPH-1 puede ser regulada por mecanismos de fosforilación [Huang et al., 2008], nuestros resultados mostraron paralelismo entre la cantidad de la proteína y su actividad en ambos grupos, AL y HRA (Figura 10 y 11). Por lo tanto, los datos sugieren que la variación diaria de la actividad de la TPH-1 en el grupo AL y la reducción de la actividad observada en la primera mitad del período de la luz en el grupo HRA reflejan la cantidad de proteína TPH-1. Sin embargo, los niveles de TPH-1 no parecen correlacionarse con la actividad transcripcional ya que el RNAm correspondiente no mostró estos mismos patrones (Figura 10). Por lo tanto, las variaciones de TPH-1 deben estar relacionados con eventos regulatorios post-transcripcional, como los cambios en la estabilidad o la degradación enzimática [Huang et al., 2008].

EL PAPEL DE LAS PLAQUETAS Y LA SEROTONINA CIRCULANTE

Un hallazgo notable de este estudio fue el cambio en los niveles diarios de serotonina en sangre, promovidas por el protocolo HRA (Figura 15 A-B). Considerando que el patrón diario de serotonina libre en las muestras de plasma (serotonina que se encuentra fuera de las plaquetas) en ambos grupos AL y HRA

fue similar (Figura 15-A), se observó un ritmo en antifase en el grupo con el protocolo HRA cuando el contenido de serotonina en el las plaquetas se cuantificó (Figura 15-B). De hecho, los niveles de serotonina en el suero eran mucho más altos que los medidos en el plasma. El patrón diario de suero de serotonina en nuestro grupo AL fue similar a la reportada por Sánchez et al. en 2008 [Sanchez et al., 2008]. Como la cantidad de plaquetas fue similar en el grupo control y las condiciones experimentales (Figura 16), el mecanismo subyacente a la modificación en la variación diaria de serotonina en el grupo HRA debe implicar un cambio en la captación de serotonina y la liberación de ésta por las plaquetas. Se sabe que el transportador de serotonina en la membrana plasmática de la plaqueta es el punto principal de control de la captación de serotonina del plasma sanguíneo [Mercado y Kilic, 2010]. Este punto no se aborda en este estudio, pero es muy probable que los eventos moleculares relacionados con la transferencia de serotonina de células enterocromafines a las plaquetas, así como la liberación sistémica de serotonina de las plaquetas a otros tejidos está influenciada por la adaptaciones metabólicas y fisiológicas asociadas con el protocolo de HRA / expresión del OSA.

LA SEROTONINA SE SINTETIZA EN EL HÍGADO.

La presencia del RNAm de la TPH-1 y la proteína correspondiente, así como su actividad enzimática indican que el tejido hepático tiene la capacidad de generar serotonina a nivel local. La expresión de TPH-1 mRNA en el ayuno fue mayor que en el grupo con la restricción de alimento. Este hecho no se refleja en la cantidad de proteína, lo que sugiere cambios en la traducción del RNAm o en la estabilidad de la proteína. Se ha descrito en el cerebro, una activa participación de la fosforilación de TPH-1 puede aumentar su estabilidad [Nexon et al., 2011]. Los datos de nuestro laboratorio muestran una coincidencia entre el patrón temporal de los glucocorticoides circulantes y la expresión de la TPH-1 durante el protocolo HRA, lo que sugiere un control potencial de la síntesis de la TPH-1 en el hígado por la corticosterona [Luna-Moreno et al., 2012]. El valor más bajo de la actividad de la TPH en el grupo HRA también coincidió con una menor cantidad de la proteína enzimática, lo que sugiere que el efecto asociado con el protocolo HRA es principalmente para estabilizar a la proteína TPH-1. Otro aspecto importante para la actividad enzimática es el sustrato. La concentración de L-triptófano depende de los alimentos ingeridos, que es 30% menor en el grupo HRA que en los animales AL. La actividad de la TPH también depende de BH₄, que actúa como co-sustrato; sin embargo, el mecanismo para mantener el nivel citosólico de BH₄ no se documentado bien [Nakamura y Hasegawa, 2009].

En el hígado, la expresión de mRNA de MAO-A en el grupo HRA es mayor que en el grupo AL (Figura 13). En modelos celulares neuronales se ha demostrado que las hormonas esteroideas y no esteroideas están involucradas en un mecanismo de regulación a la alza o “upregulation” de la expresión del gen MAO, tales como andrógenos y glucocorticoides [Shih et al., 2011]; Por lo tanto, el protocolo HRA podría promover una elevación de la transcripción de la MAO-A, mediante el aumento de la señalización de glucocorticoides [Luna-Moreno et al., 2012; Shih et al., 2011]. Curiosamente, el protocolo HRA redujo significativamente la cantidad de proteína MAO-A mitocondrial, tal como se detectó en los experimentos de Western-blot. Este resultado indica de nuevo un efecto diferencial del protocolo HRA / expresión del OSA, en la expresión de la actividad transcripcional y la estabilidad de la proteína madura.

Por lo tanto, nuestros resultados indican que el hígado es capaz de transformar de manera circadiana el aminoácido L-Triptófano a serotonina,. Además, este patrón rítmico se ve influenciado por el protocolo HRA y potencialmente por la expresión del OSA. Se sabe que el tejido hepático también tiene la capacidad de sintetizar la melatonina [Sanchez-Hidalgo et al., 2009], un factor de señalización derivado de la serotonina.

Para hacer evidente los ritmos coordinados de serotonina en el hígado, suero y plasma, así como los niveles y la actividad de la TPH-1, se graficaron los

parámetros con todos los puntos normalizados a valores correspondientes a las 08:00 h (los picos o acrofases de cada parámetro) (Figura 22). En esta gráfica se observa la sincronización de los cinco perfiles temporales con un pico a las 08:00 h y los valores más altos estarían durante el período de luz. Es interesante observar que el sistema de serotonina en el hígado es más activo sobre todo cuando las ratas están en la primera sección de su sueño / período de descanso. Es durante estas horas que la asimilación de nutrientes es más alta y se tiene un pico en el ciclo celular de los hepatocitos [Tongiani et al., 1982]. Cabe destacar que la coordinación de estos patrones temporales ajustados a un ritmo de 24 h, se pierden con el protocolo HRA. Queda por determinar si esta interrupción es o no asociado a la expresión del OSA, así como a una posible modificación en la fisiología del hígado.

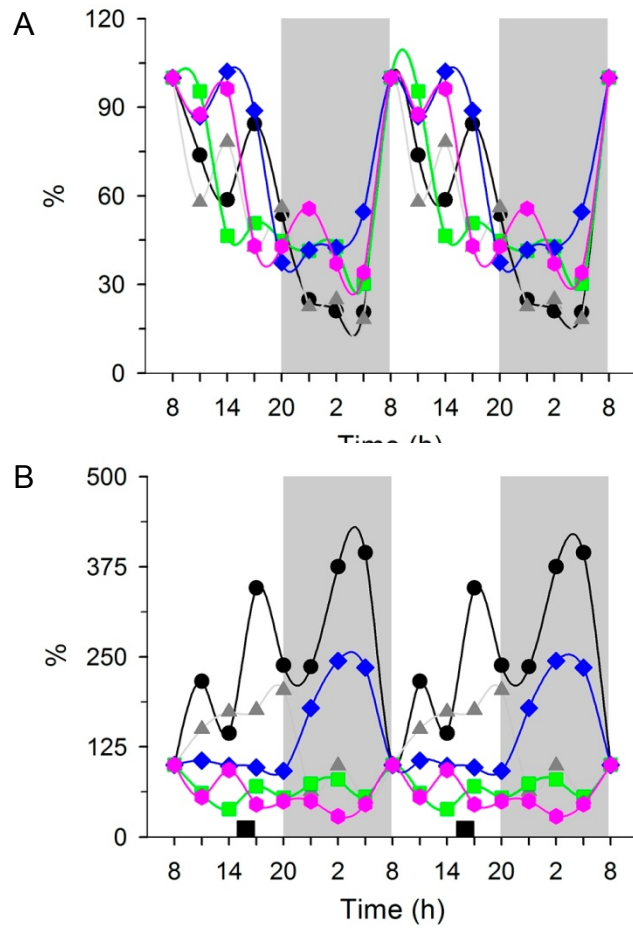


Figura 22. Parámetros del metabolismo de la serotonina y transporte. A) Grupo AL y B) grupo HRA. Cada punto representa el promedio porcentualizado al primer valor de cada punto temporal. . (●) 5-HT en el hígado, (▲) Actividad enzimática de la TPH-1, (■) Niveles relativos de la proteína TPH-1 y (◆) 5-HT en suero y (◆) 5-HT en plasma.

LA SEROTONINA Y SU PARTICIPACIÓN EN SINCRONIZACIÓN CIRCADIANA EN EL HÍGADO Y LOS ALIMENTOS.

Los organismos han desarrollado mecanismos de supervivencia cuando se ven en condiciones adversas de su entorno; estas adaptaciones se manifiestan a través de las fluctuaciones circadianas (~ 24 h) en la concentración y la actividad de una serie de metabolitos y moléculas de señalización [Kirsch y Zieba, 2012]. Está bien documentado que el hígado y otros órganos periféricos actúan como osciladores circadianos en coordinación con el marcapasos central circadiano, el NSQ hipotalámico [Damiola et al., 2000]. La sincronización de los osciladores circadianos periféricos son sensibles a los estímulos no fóticos, tales como los cambios en la disponibilidad de alimento y la temperatura [Yoo et al., 2004]. El protocolo utilizado en este estudio, la alimentación restringida a dos horas del día, está ampliamente aceptado para promover la expresión del OSA [Damiola et al., 2000; Mistlberger, 1994; Mistlberger, 2009]. El hígado es uno de los órganos cuyo rendimiento metabólico se modifica más rápidamente en respuesta al protocolo HRA / expresión del OSA [Baez-Ruiz et al., 2005; Diaz-Muñoz et al., 2000; Vollmers et al., 2009].

Reportes anteriores habían demostrado que la serotonina y la melatonina tenían una clara ritmicidad en la glándula pineal de 24-h [Huang et al., 2008]. Sin embargo, este estudio es el primero en para explorar el ritmo diario de serotonina, las enzimas que la metabolizan y sus metabolitos relacionados y, así como su transporte en la sangre (dentro y fuera de las plaquetas), dos de sus receptores y

la actividad eléctrica espontánea de los hepatocitos. Además, se demostró claramente que el protocolo HRA y la expresión del OSA afectaron a la variación diaria de estos parámetros.

Por otro lado, la cantidad de los receptores 5HT_{1A} y 5HT_{2C}, muestran una clara variación diaria, donde el periodo de oscuridad presenta una abundancia mayor para ambos receptores, tanto en el grupo AL como el grupo HRA. Se ha documentado que el receptor 5HT_{1A} participa como autorreceptor regulando funciones autocrinas además de que se ha localizado a nivel del citoplasma [Sandyk, 2006; Zhou et al., 2013].

Existe una correspondencia entre la cantidad de estos receptores y la presencia de serotonina en las células, ya que en el grupo AL la serotonina muestra niveles altos durante la fase de luz sugiriendo que la señalización intracelular de este receptor impidiendo la salida de serotonina de los hepatocitos, como un mecanismo de regulación celular (Figuras 8 y 18). Aunque este receptor se ha asociado con padecimientos conductuales-psicológicos, se sabe que estos receptores pueden actuar de forma inhibitoria [Sandyk, 2006]. El receptor 5HT_{2C}, está relacionado con trastornos de la alimentación [Werry et al., 2008], entre otros desordenes que están relacionados con el metabolismo. En este estudio se pudo observar un cambio drástico durante el protocolo HRA, la abolición completa de este receptor durante las 24-h, nos sugiere una relación estrecha con el metabolismo celular.

Desde la perspectiva de los ritmos biológicos, nuestros datos contribuyen

en:

Se detectó 1) Una variación coordinada de varios parámetros relacionados con el metabolismo serotonina, receptores y el transporte en condiciones de AL. La mayoría de ellos eran altamente rítmica durante un período de 24 h (Tabla 2). De hecho, se observaron niveles bajos de metabolitos hepáticos, las actividades enzimáticas, y que circula serotonina durante el período oscuro seguido por un pico evidente a las 08:00 h, en el comienzo del período de luz (Figura 22-A), además de un patrón diario de los receptores más alto durante el periodo de oscuridad (Figura 19-21). 2) El patrón coordinado de los parámetros relacionados con el serotonina se vio perturbado por el protocolo HRA (Figura 22-B), lo que sugiere una posible adaptación por el metabolismo del hígado y el transporte de sangre de serotonina promovido por la expresión del OSA. Donde en promedio el grupo AL presentó valores más altos que los mostrados en el protocolo HRA.

CONCLUSIÓN

Nuestros datos muestran que la serotonina se genera dentro del hígado, y su producción se regula durante un período de 24-h. Estos datos podrían tener implicaciones en la capacidad del tejido hepático para ser regenerados, ya que se ha demostrado que la serotonina facilita la recuperación del tejido hepático después de una hepatectomía quirúrgica [Papadimas et al., 2006]. Además, la condición HRA modifica significativamente la forma en que la serotonina se produce en el hígado, así como la forma en que se transporta dentro de las plaquetas circulantes y es señalizada en sus receptores. Es muy probable que estas adaptaciones en el metabolismo y manejo de la serotonina podrían estar asociados con la fisiología del OSA, pero se necesitan ensayos adicionales para apoyar esta idea. En una perspectiva más general, el control diario de la síntesis de la serotonina en el transporte del hígado y la sangre abre la posibilidad de regulación temporal de la serotonina y que pueda participar en otras funciones periféricas tales como la motilidad intestinal e inmune, así como en otros procesos relacionados con la proliferación y diferenciación en tejidos periféricos como el tejido óseo o la homeostasis celular del páncreas, entre otras funciones [Amireault et al., 2013].

LITERATURA CITADA

Aguilar-Roblero R, Díaz-Muñoz M. 2009. Chronostatic adaptations in the liver to restricted feeding: The FEO as an emergent oscillator. *Sleep Biol Rhythms* 9999.

Alberts B, Bray D, Johnson HA, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2013. *Essential cell biology*. New York, NY : Garland Science, 2013

Fourth edition.

Amireault P, Sibon D, Cote F. 2013. Life without peripheral serotonin: insights from tryptophan hydroxylase 1 knockout mice reveal the existence of paracrine/autocrine serotonergic networks. *ACS Chem Neurosci* 4:64-71.

Baez-Ruiz A, Escobar C, Aguilar-Roblero R, Vazquez-Martinez O, Diaz-Munoz M. 2005. Metabolic adaptations of liver mitochondria during restricted feeding schedules. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289:G1015-23.

Barbosa R, Scialfa JH, Terra IM, Cipolla-Neto J, Simonneaux V, Afeche SC. 2008. Tryptophan hydroxylase is modulated by L-type calcium channels in the rat pineal gland. *Life Sci* 82:529-35.

Berger M, Gray JA, Roth BL. 2009. The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med* 60:355-66.

Berumen LC, Rodriguez A, Miledi R, Garcia-Alcocer G. 2012. Serotonin receptors in hippocampus. *ScientificWorldJournal* 2012:823493.

Boadle-Biber MC. 1993. Regulation of serotonin synthesis. *Prog Biophys Mol Biol* 60:1-15.

Bonhaus DW, Bach C, DeSouza A, Salazar FH, Matsuoka BD, Zuppan P, Chan HW, Eglen RM. 1995. The pharmacology and distribution of human 5-hydroxytryptamine_{2B} (5-HT_{2B}) receptor gene products: comparison with 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Br J Pharmacol* 115:622-8.

Boulos Z, Rosenwasser AM, Terman M. 1980. Feeding schedules and the circadian organization of behavior in the rat. *Behav Brain Res* 1:39-65.

Cagampang FR, Bruce KD. 2012. The role of the circadian clock system in nutrition and metabolism. *Br J Nutr* 108:381-92.

Cansev M WRJ. 2007. Aromatic Amino Acids in the Brain. In Abel Lajtha PSSO, Prof. Arne Schousboe, Prof. Pirjo Saransaari editor^editors. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology. Amino Acids and Peptides in the Nervous System*. New York: Springer US, p 59-97.

Cermakian N, Sassone-Corsi P. 2002. Environmental stimulus perception and control of circadian clocks. *Current Opinion in Neurobiology* 12:359-365.

Czyrak A, Czepiel K, Mackowiak M, Chocyk A, Wedzony K. 2003. Serotonin 5-HT_{1A} receptors might control the output of cortical glutamatergic neurons in rat cingulate cortex. *Brain Res* 989:42-51.

Challet E. 2007. Minireview: Entrainment of the suprachiasmatic clockwork in diurnal and nocturnal mammals. *Endocrinology* 148:5648-55.

Challet E. 2013. Circadian clocks, food intake, and metabolism. *Prog Mol Biol Transl Sci* 119:105-35.

Challet E, Pevet P. 2003. Interactions between photic and nonphotic stimuli to synchronize the master circadian clock in mammals. *Front Biosci* 8:s246-57.

Daan S. 2010. A History of Chronobiological Concepts. In Albrecht U, editor^editors. *The Circadian Clock*. New York: Springer, p 1-35.

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* 14:2950-61.

Davidson AJ. 2006. Search for the feeding-entrainable circadian oscillator: a complex proposition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290:R1524-6.

Davidson AJ, Cappendijk SL, Stephan FK. 2000. Feeding-entrained circadian rhythms are attenuated by lesions of the parabrachial region in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278:R1296-304.

Davidson AJ, Castanon-Cervantes O, Stephan FK. 2004. Daily oscillations in liver function: diurnal vs circadian rhythmicity. *Liver Int* 24:179-86.

Davidson AJ, Poole AS, Yamazaki S, Menaker M. 2003. Is the food-entrainable circadian oscillator in the digestive system? *Genes Brain Behav* 2:32-9.

Diaz-Munoz M, Vazquez-Martinez O, Baez-Ruiz A, Martinez-Cabrera G, Soto-Abraham MV, Avila-Casado MC, Larriva-Sahd J. 2010. Daytime food restriction alters liver glycogen, triacylglycerols, and cell size. A histochemical, morphometric, and ultrastructural study. *Comp Hepatol* 9:5.

Diaz-Muñoz M, Vazquez-Martinez O, Aguilar-Roblero R, Escobar C. 2000. Anticipatory changes in liver metabolism and entrainment of insulin, glucagon, and corticosterone in food-restricted rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279:R2048-56.

Escobar C, Diaz-Munoz M, Encinas F, Aguilar-Roblero R. 1998. Persistence of metabolic rhythmicity during fasting and its entrainment by restricted feeding schedules in rats. *Am J Physiol* 274:R1309-16.

Foster RG, Kreitzman L. 2014. The rhythms of life: what your body clock means to you! *Exp Physiol* 99:599-606.

Furness JB, Costa M. 1982. Neurons with 5-hydroxytryptamine-like immunoreactivity in the enteric nervous system: their projections in the guinea-pig small intestine. *Neuroscience* 7:341-9.

Glossop NR, Hardin PE. 2002. Central and peripheral circadian oscillator mechanisms in flies and mammals. *J Cell Sci* 115:3369-77.

- Hannon J, Hoyer D. 2008. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res* 195:198-213.
- Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP. 1994. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev* 46:157-203.
- Huang Z, Liu T, Chattoraj A, Ahmed S, Wang MM, Deng J, Sun X, Borjigin J. 2008. Posttranslational regulation of TPH1 is responsible for the nightly surge of 5-HT output in the rat pineal gland. *Journal of Pineal Research* 45:506-514.
- Johnston JD. 2014. Physiological responses to food intake throughout the day. *Nutr Res Rev* 27:107-18.
- Jonnakuty C, Gragnoli C. 2008. What do we know about serotonin? *J Cell Physiol* 217:301-6.
- Kalgutkar AS, Dalvie DK, Castagnoli N, Taylor TJ. 2001. Interactions of Nitrogen-Containing Xenobiotics with Monoamine Oxidase (MAO) Isozymes A and B: SAR Studies on MAO Substrates and Inhibitors. *Chemical Research in Toxicology* 14:1139-1162.
- Kirsz K, Zieba DA. 2012. A review on the effect of the photoperiod and melatonin on interactions between ghrelin and serotonin. *Gen Comp Endocrinol* 179:248-53.
- Koukari W, Sothorn R. 2006. *Introducing Biological Rhythms*. United States of America: Springer. p 655.
- Langhans W. 1996. Role of the liver in the metabolic control of eating: what we know--and what we do not know. *Neurosci Biobehav Rev* 20:145-53.
- Lesurtel M, Soll C, Graf R, Clavien PA. 2008. Role of serotonin in the hepato-gastrointestinal tract: an old molecule for new perspectives. *Cell Mol Life Sci* 65:940-52.
- Liu YF, Albert PR. 1991. Cell-specific signaling of the 5-HT_{1A} receptor. Modulation by protein kinases C and A. *J Biol Chem* 266:23689-97.
- Luna-Moreno D, Garcia-Ayala B, Diaz-Munoz M. 2012. Daytime restricted feeding modifies 24 h rhythmicity and subcellular distribution of liver glucocorticoid receptor and the urea cycle in rat liver. *Br J Nutr* 108:2002-13.
- Luna-Moreno D, Vazquez-Martinez O, Baez-Ruiz A, Ramirez J, Diaz-Munoz M. 2007. Food restricted schedules promote differential lipoperoxidative activity in rat hepatic subcellular fractions. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 146:632-43.
- Lutz TA, Estermann A, Haag S, Scharrer E. 2001. Depolarization of the liver cell membrane by metformin. *Biochim Biophys Acta* 1513:176-84.
- Marchant EG, Mistlberger RE. 1997. Anticipation and entrainment to feeding time in intact and SCN-ablated C57BL/6j mice. *Brain Res* 765:273-82.
- Martin GR, Humphrey PP. 1994. Receptors for 5-hydroxytryptamine: current perspectives on classification and nomenclature. *Neuropharmacology* 33:261-73.

- Martinez-Merlos MT, Angeles-Castellanos M, Diaz-Munoz M, Aguilar-Roblero R, Mendoza J, Escobar C. 2004. Dissociation between adipose tissue signals, behavior and the food-entrained oscillator. *J Endocrinol* 181:53-63.
- Mawe GM, Hoffman JM. 2013. Serotonin signalling in the gut--functions, dysfunctions and therapeutic targets. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10:473-86.
- Mercado CP, Kilic F. 2010. Molecular mechanisms of SERT in platelets: regulation of plasma serotonin levels. *Mol Interv* 10:231-41.
- Mistlberger RE. 1994. Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev* 18:171-95.
- Mistlberger RE. 2009. Food-anticipatory circadian rhythms: concepts and methods. *Eur J Neurosci* 30:1718-29.
- Mohammad-Zadeh LF, Moses L, Gwaltney-Brant SM. 2008. Serotonin: a review. *J Vet Pharmacol Ther* 31:187-99.
- Moore-Ede M, Sulzman F, Fuller C. 1982. Characteristics of Circadian Clocks. In Moore-Ede M, FM FS, Fuller C, editor^editors. *The clocks that time us. Physiology of the circadian timing system.* London: Harvard University Press, p 300.
- Morin LP. 2013. Neuroanatomy of the extended circadian rhythm system. *Exp Neurol* 243:4-20.
- Nakamura K, Hasegawa H. 2009. Production and Peripheral Roles of 5-HTP, a Precursor of Serotonin. *International Journal of Tryptophan Research* 2:37-43.
- Nakamura K, Sato T, Ohashi A, Tsurui H, Hasegawa H. 2008. Role of a serotonin precursor in development of gut microvilli. *Am J Pathol* 172:333-44.
- Nexon L, Sage D, Pevet P, Raison S. 2011. Glucocorticoid-mediated nycthemeral and photoperiodic regulation of tph2 expression. *Eur J Neurosci* 33:1308-17.
- Papadimas GK, Tzirogiannis KN, Mykoniatis MG, Grypioti AD, Manta GA, Panoutsopoulos GI. 2012. The emerging role of serotonin in liver regeneration. *Swiss Med Wkly* 142:w13548.
- Papadimas GK, Tzirogiannis KN, Panoutsopoulos GI, Demonakou MD, Skaltsas SD, Hereti RI, Papadopoulou-Daifoti Z, Mykoniatis MG. 2006. Effect of serotonin receptor 2 blockage on liver regeneration after partial hepatectomy in the rat liver. *Liver Int* 26:352-61.
- Portaluppi F, Smolensky MH, Touitou Y. 2010. Ethics and methods for biological thym research on animals and human beings. *Chronobiology International* 27:1911-1929.
- Rapport MM, Green AA, Page IH. 1948. Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J Biol Chem* 176:1243-51.
- Rendu F, Brohard-Bohn B. 2001. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* 12:261-73.

Ripperger JA, Schibler U. 2001. Circadian regulation of gene expression in animals. *Curr Opin Cell Biol* 13:357-62.

Rivera-Zavala JB, Baez-Ruiz A, Diaz-Munoz M. 2011. Changes in the 24 h Rhythmicity of Liver PPARs and Peroxisomal Markers When Feeding Is Restricted to Two Daytime Hours. *PPAR Res* 2011:261584.

Robinson I, Reddy AB. 2014. Molecular mechanisms of the circadian clockwork in mammals. *FEBS Lett* 588:2477-83.

Roenneberg T, Mellow M. 2001. Circadian systems: different levels of complexity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356:1687-96.

Ruddell RG, Mann DA, Ramm GA. 2008. The function of serotonin within the liver. *J Hepatol* 48:666-75.

Sainio EL, Pulkki K, Young SN. 1996. L-Tryptophan: Biochemical, nutritional and pharmacological aspects. *Amino Acids* 10:21-47.

Sanchez-Hidalgo M, de la Lastra CA, Carrascosa-Salmoral MP, Naranjo MC, Gomez-Corvera A, Caballero B, Guerrero JM. 2009. Age-related changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues. *Exp Gerontol* 44:328-34.

Sanchez S, Sanchez C, Paredes SD, Cubero J, Rodriguez AB, Barriga C. 2008. Circadian variations of serotonin in plasma and different brain regions of rats. *Mol Cell Biochem* 317:105-11.

Sandyk R. 2006. Serotonergic mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis. *Int J Neurosci* 116:775-826.

Schulz P, Steimer T. 2009. Neurobiology of circadian systems. *CNS Drugs* 23 Suppl 2:3-13.

Shih JC, Wu JB, Chen K. 2011. Transcriptional regulation and multiple functions of MAO genes. *J Neural Transm* 118:979-86.

Slopien R, Slopien A, Rozycka A, Warenik-Szymankiewicz A, Lianeri M, Jagodzinski PP. 2012. The c.1460C>T polymorphism of MAO-A is associated with the risk of depression in postmenopausal women. *ScientificWorldJournal* 2012:194845.

Sosniyenko S, Parkanova D, Illnerova H, Sladek M, Sumova A. 2010. Different mechanisms of adjustment to a change of the photoperiod in the suprachiasmatic and liver circadian clocks. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298:R959-71.

Stephan FK. 2002. The "other" circadian system: food as a Zeitgeber. *J Biol Rhythms* 17:284-92.

Stephan FK, Swann JM, Sisk CL. 1979. Entrainment of circadian rhythms by feeding schedules in rats with suprachiasmatic lesions. *Behav Neural Biol* 25:545-54.

Tongiani R, Chieli E, Malvaldi G. 1982. Circadian rhythm of dry mass and weight-class-pattern of the rat hepatocytes--effects of light-dark and feeding regimens. *Acta Histochem* 70:78-88.

- Tosini G, Menaker M. 1996. Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science* 272:419-21.
- Tyce GM. 1990. Origin and metabolism of serotonin. *J Cardiovasc Pharmacol* 16 Suppl 3:S1-7.
- Vollmers C, Gill S, DiTacchio L, Pulivarthy SR, Le HD, Panda S. 2009. Time of feeding and the intrinsic circadian clock drive rhythms in hepatic gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:21453-8.
- Watts SW, Morrison SF, Davis RP, Barman SM. 2012. Serotonin and blood pressure regulation. *Pharmacol Rev* 64:359-88.
- Werry TD, Loiacono R, Sexton PM, Christopoulos A. 2008. RNA editing of the serotonin 5HT_{2C} receptor and its effects on cell signalling, pharmacology and brain function. *Pharmacol Ther* 119:7-23.
- Wu KK, Cheng HH, Chang TC. 2014. 5-methoxyindole metabolites of L-tryptophan: control of COX-2 expression, inflammation and tumorigenesis. *J Biomed Sci* 21:17.
- Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block GD, Sakaki Y, Menaker M, Tei H. 2000. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 288:682-5.
- Yoo S-H, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH, Buhr ED, Slepka SM, Hong H-K, Oh WJ, Yoo OJ, Menaker M, Takahashi JS. 2004. PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:5339-5346.
- Yuwiler A, Oldendorf WH, Geller E, Braun L. 1977. Effect of albumin binding and amino acid competition on tryptophan uptake into brain. *J Neurochem* 28:1015-23.
- Zhou R, Niwa S, Guillaud L, Tong Y, Hirokawa N. 2013. A molecular motor, KIF13A, controls anxiety by transporting the serotonin type 1A receptor. *Cell Rep* 3:509-19.

ORIGINAL RESEARCH

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

Marlen Valdés-Fuentes¹, Gabriela Vera-Rivera², Dalia De Ita-Pérez³, Isabel Méndez³, María Isabel Miranda² & Mauricio Díaz-Muñoz³

¹ Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Qro., México

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

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

Keywords

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

Correspondence

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

Funding Information

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

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

doi: 10.14814/phy2.12389

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

Abstract

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

Introduction

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

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

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

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

Materials and Methods

Animals

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

Experimental design

The experimental protocol had four groups: (1) Rats fed AL; (2) rats under DRF schedule with mealtime only from 1200 to 1400 h for 3 weeks; (3) rats fasted for 21 h, and (4) rats that were fasted 22 h and refeed for 2 h (from 1200 to 1400 h). Rats were sacrificed by decapitation at 0800, 1100, 1400, 1700, 2000, 2300, 0200, and 0500 h. The controls of feeding condition, Fa and Fa-Re, were sacrificed at 1100 h and 1400 h, respectively. Immediately after sacrifice, livers were homogenized or frozen in dry ice and kept at -80°C until analysis. Two samples of blood were collected. Immediately after decapitation, for serum, blood was collected in Vacutainer[®] (Becton Dickinson, Mexico City, Mexico) tubes and centrifuged at 2500g for 5 min. For plasma, blood was collected in BD Vacutainer[®] (Becton Dickinson) tubes with K₂ Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and centrifuged at 1500g for 10 min.

Subcellular fractionation

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

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

qPCR amplifications

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

Western-blot analysis

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

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

Immunohistochemistry

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

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

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

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

Tryptophan hydroxylase activity

TPH activity was measured in liver homogenates using a radioactive isotope assay (Barbosa et al. 2008) with the following reaction medium: Hepes (50 nmol/L, pH 7), catalase (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), tryptophan (50 $\mu\text{mol}/\text{L}$), dithiothreitol (5 mmol/L), $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$), 6-methyl-5,6,7,8-tetrahydropterine dihydrochloride (6-MPH4) (500 $\mu\text{mol}/\text{L}$), and 1 μL of [³H] tryptophan (1 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$). The sample was incubated at 37°C for 10 min. The reaction was stopped by adding a suspension of activated charcoal (7.5% in 1 mol/L HCl), and 200 μL of the supernatant was transferred to scintillation tubes; scintillation fluid was added, and radioactivity was evaluated with a Beckman β counter.

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

5-HT and 5-HTP concentrations within the liver, platelet-free plasma, and platelet-rich plasma were assayed by high pressure liquid chromatography (HPLC). Liver samples were homogenized 1/5 (w/v) in 0.1 mol/L HClO_4 containing 0.2 mmol/L EDTA, filtered with a centrifuge tube filter (Spin-X, Costar[®], Corning, NY). The HPLC system consisted of a delivery pump (Solvent Delivery System PM-80; Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN), a simple injector (BASi Liquid Chromatography CC-SE, 20 μL loop; Bioanalytical Systems), a C18 reverse phase column (BASi ODS C18, 100 \times 3 mm, 3 μm particle size; Bioanalytical Systems), and an electrochemical detector (Bioanalytical Systems) with a carbon electrode; the potential was adjusted to +600 mV versus the reference electrode (Ag/AgCl). The mobile phase contained 0.1 mol/L Na_2HPO_4 , 0.05 mol/L Citric acid, 0.17 mmol/L EDTA, 1 mmol/L KCl, and 2% methanol (v/v), pH 4.5. The flow rate was 0.6 mL per min at a pressure of 2400 psi. All chromatograms were recorded and analyzed using the ChromGraph Report software 2.3 (Bioanalytical Systems). Tryptophan was measured in homogenates using HPLC (Dionex, Ultimate 3000, Thermo Scientific, Chromleon 6.8 software integrator for data analysis, Waltham, MA) with fluorescence detection (excitation and emission 337 and 442 nm, respectively) after *o*-phthaldehyde (OPA) derivatization. The sample homogenates (25 μL) were mixed with 25 μL

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

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

The protein concentrations are expressed as nmol/ μg protein and pmol/ μg protein in liver homogenates and nmol/mL for blood determinations.

Platelet count

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

Statistical analysis

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

Results

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

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

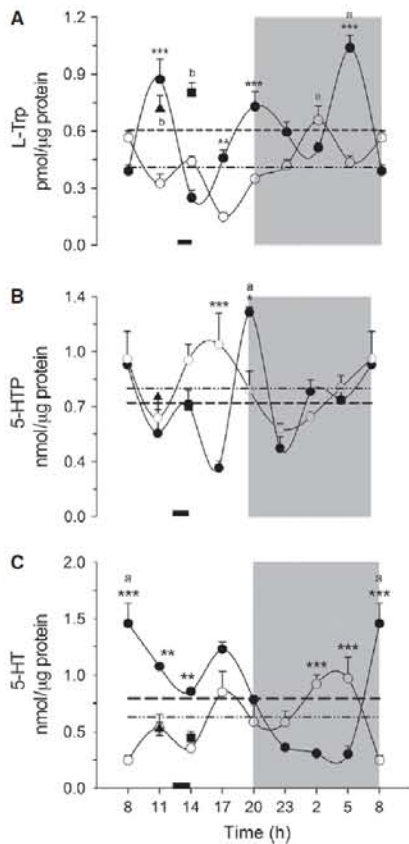


Figure 1. Analysis of the daily variation of L-Trp (A), 5-HTP (B) and 5-HT (C) in rat liver measured by HPLC. Each point represents the mean \pm SEM. Access to food for the DRF group is represented by the black bar (1200–1400 h). AL (●), DRF (○), Fa (▲), Fa-Re (■), mesor AL (○), DRF (○), (a) one-way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

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

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

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

Table 2. Chronobiological analysis of liver and blood samples.

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

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

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

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

Daily variations of liver TPH in rats under DRF

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

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

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

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

Daily variations of MAO-A in rats under DRF

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

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

Circulating 5-HT: differences between plasma and serum measurements

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

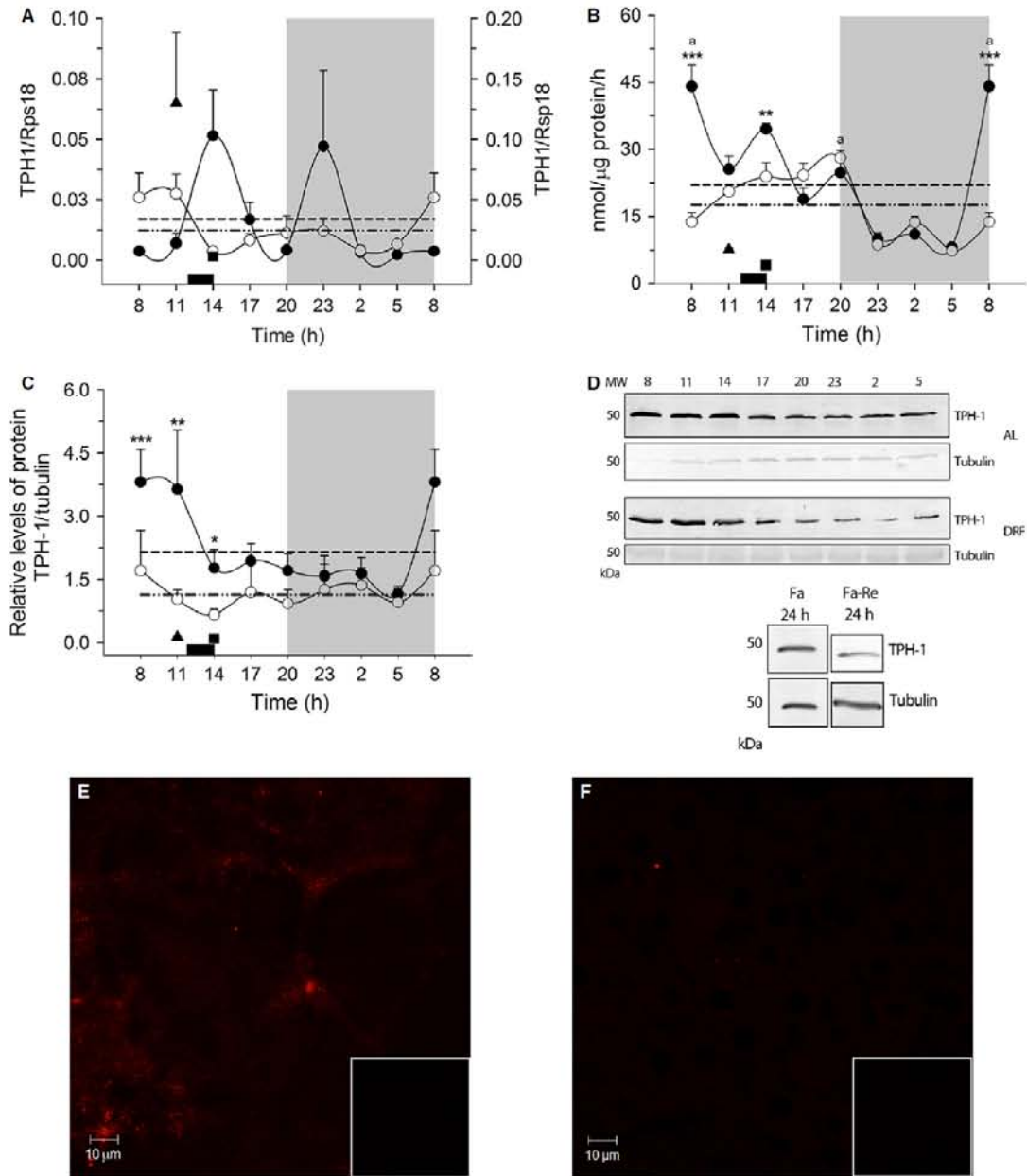


Figure 2. Daily variation in TPH mRNA expression (A) scale at right for Fa value, enzymatic activity (B) protein (C and D), and immunohistochemistry (E and F) in liver. Each point represents the mean ± SEM. Access to food for the DRF group is represented by the black bar (1200–1400 h). AL (●), DRF (○),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

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

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

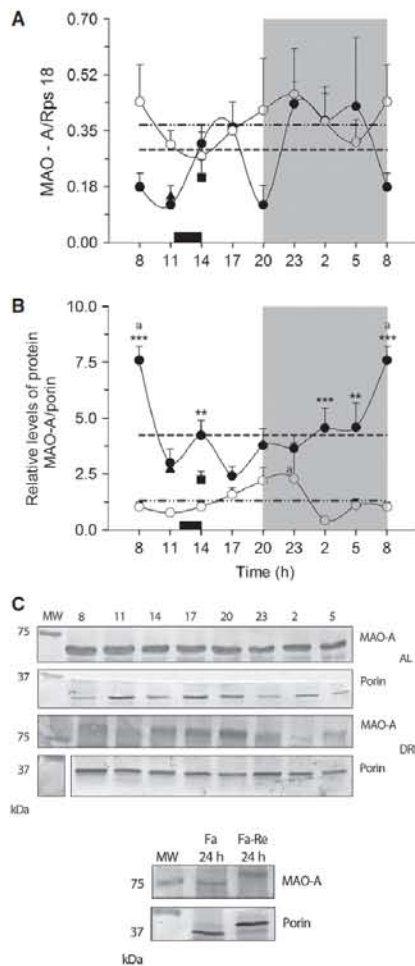


Figure 3. MAO-A in the rat liver. (A) Levels of MAO-A mRNA expression and (B) protein in mitochondria (C) Blot representative sample of representative abundance of MAO-A protein in the different conditions. Each point represents the mean \pm SEM. Access to food for the DRF group is represented by the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

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

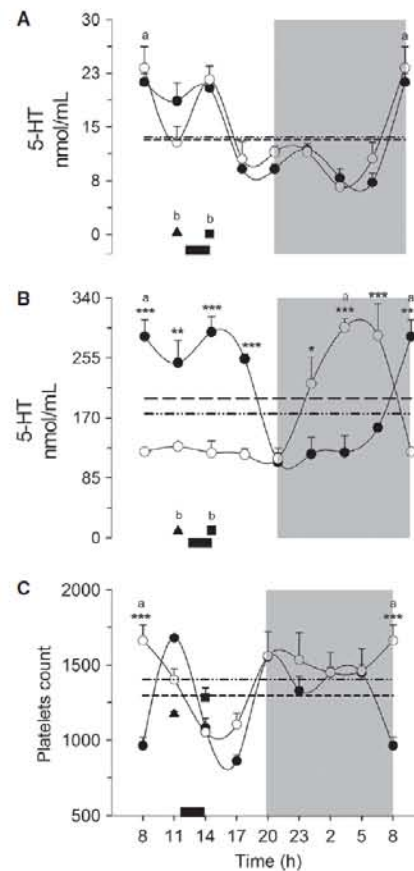


Figure 4. Concentration of 5-HT in blood. Plasma (A), serum (B), and number of platelets (C). Each point represents the mean \pm SEM. Access to food for the DRF group is represented by the black bar (1200–1400 h) AL (●), DRF (○), Fa (▲), Fa-Re (■), mesor AL (—) DRF (—•—), (a) one-way ANOVA, post hoc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

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

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

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

Discussion

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

Restricted food intake reduced the concentration of liver tryptophan and serotonin

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

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

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

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

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

Circulating serotonin: role played by the platelets

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

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

5-HT is synthesized within the liver

The presence of TPH-1 mRNA and the corresponding protein and enzymatic activity indicate that hepatic tissue has the capacity to generate 5-HT locally. The expression of TPH-1 mRNA in fasting liver was higher than in the group with food restriction. This fact was not reflected in the amount of the protein, suggesting changes in the mRNA translation or in protein stability. It has been reported that in brain, phosphorylation of TPH-1 can increase its stability (Nexon et al. 2011). Data from our laboratory show a coincidence between the temporal pattern of circulating glucocorticoids and TPH-1 expression during the DRF protocol, suggesting a potential control of TPH-1 synthesis in the liver by corticosterone (Luna-Moreno et al. 2012). The lower value of TPH activity in the DRF group also coincided with a lower amount of the enzyme protein, suggesting that the effect associated with the DRF protocol is mainly to stabilize the TPH-1 protein. Another important aspect for the enzymatic activity is the substrate. The concentration of L-Trp depends on the ingested food, which is 30% lower in the DRF group than in the AL animals. TPH activity also depends on BH₄, which acts as co-substrate; however, the mechanism for maintaining the cytosolic level of BH₄ is not well understood (Nakamura and Hasegawa 2009).

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

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

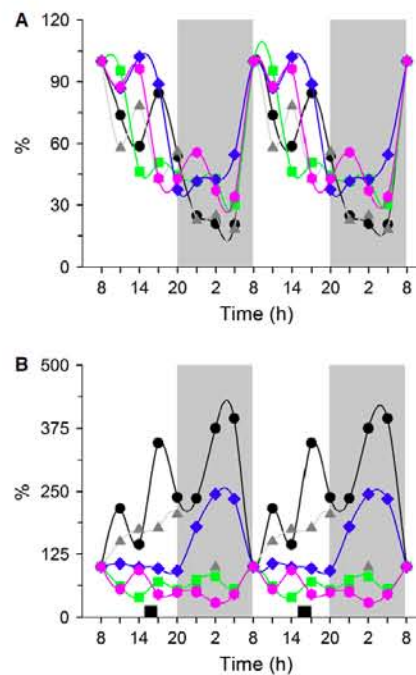


Figure 5. Parameters of serotonin metabolism and transportation. (A) AL and (B) DRF group. Each point represents the average percentage of the value at the first time point, for each parameter analyzed. (●) 5-HT in liver, (▲) Enzymatic activity of TPH-1, (■) Relative level of TPH-1 protein, as well as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

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

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

5-HT in the liver and food circadian synchronization

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

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

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

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

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

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

Acknowledgments

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

Conflict of Interest

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

References

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

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

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