



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**  
**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**Efecto de la restricción de alimento sobre la expresión hepática  
del receptor para hidrocarburos de arilo**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:  
Biol. Oscar Samuel Ávila Rosales

TUTOR  
Dr. Mauricio Díaz Muñoz (INB)

2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



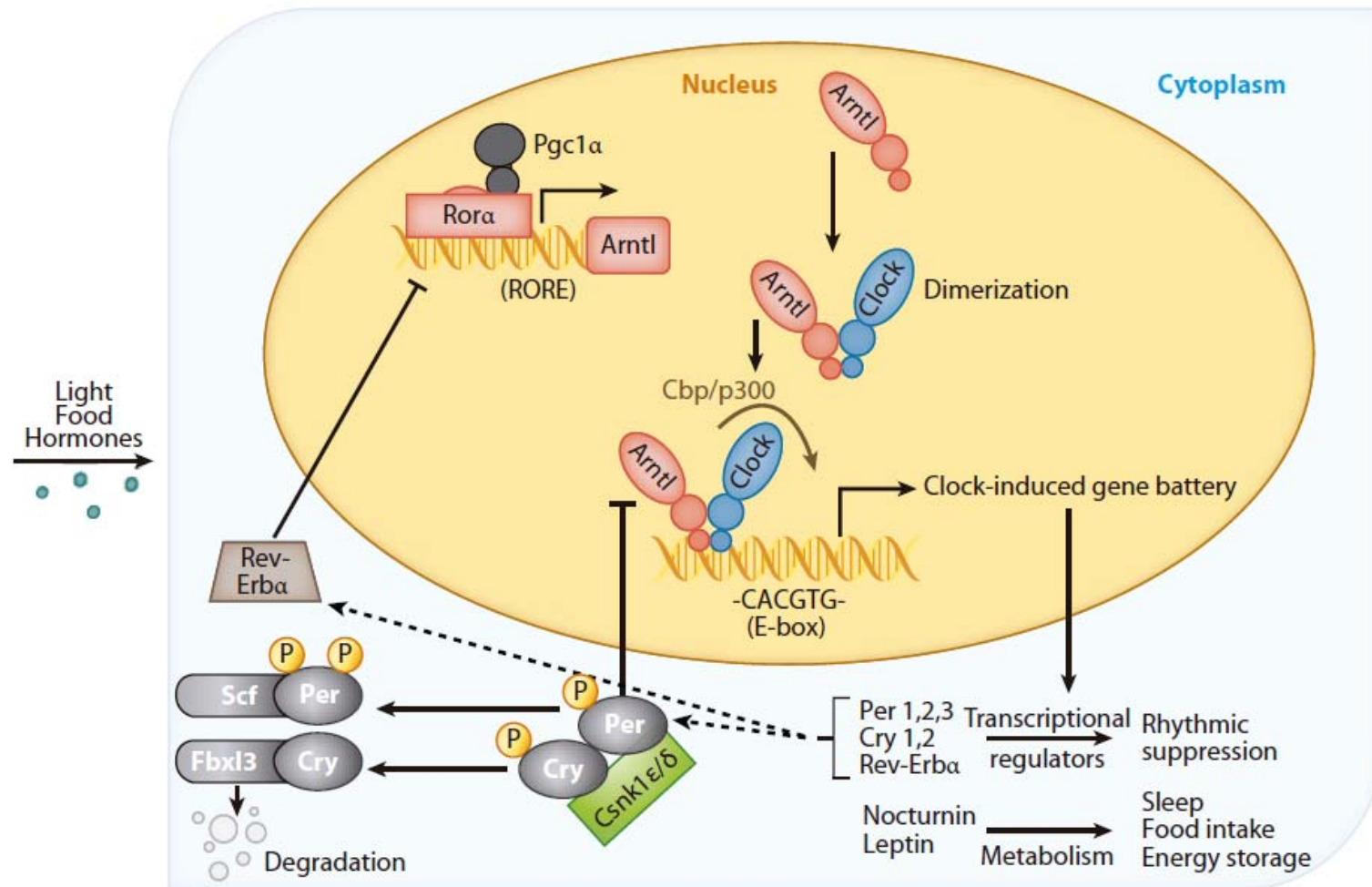
**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

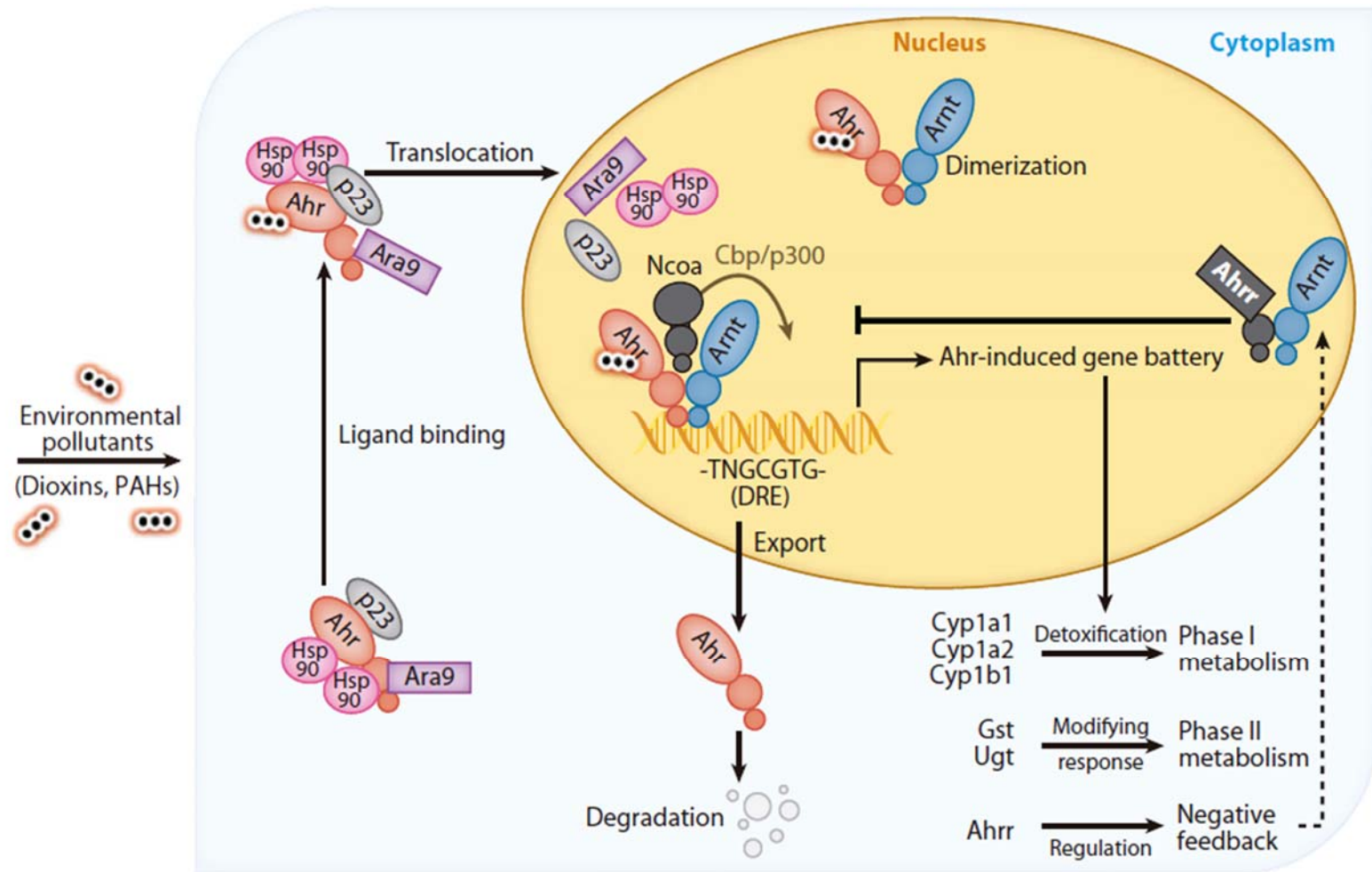
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.

Este trabajo se realizó en el departamento de Biología Molecular del Instituto de Neurobiología, UNAM.  
 Bajo la tutela del Dr. Mauricio Díaz Muñoz.



Este trabajo está dedicado a todos los organismos involucrados  
 en el desarrollo del mismo...  
 y a aquellos que pretenden cambiar el orden de las estrellas.



No creas en algo simplemente por que hayas oído sobre ello.  
No creas en algo solo porque has oído un rumor o algún comentario.  
No creas en algo porque lo hayas encontrado en libro religioso o sagrado.  
No creas en tradiciones simplemente porque han pasado de boca en boca a través de las generaciones. Sino luego de la observación y el análisis cuando encuentres algo que está de acuerdo con la razón, y su puesta en práctica sea beneficiosa para uno y para todos; entonces acéptalo y vive de acuerdo con ello.

Buda.

# Índice

Resumen	i
I Introducción	1
1.1 Receptor para hidrocarburos de arilo	1
1.2 Ligandos de AHR	2
1.3 Vía de transducción de AHR	3
1.4 Cyp1a	4
1.5 Ritmos circadianos	5
1.6 Restricción de alimento	7
II Planteamiento del problema	8
III Hipótesis	9
IV Objetivos	9
4.1 General	9
4.2 Particulares	9
V Material y método	9
5.1 Modelo biológico	9
5.2 Modelo experimental	10
5.3 Extracción de RNA	11
5.4 Síntesis de cDNA	11
5.5 Oligonucleótidos	11

5.6 Reacción de RT-PCR	11
5.7 Homogenado de hígado y fracción microsomal	12
5.8 Cuantificación de proteínas del homogenado y de la fracción microsomal de hígado de rata	13
5.9 Inmunodetección del AHR en homogenado y de Cyp1a1 y Cyp1a2 de la fracción microsomal de hígado	13
5.10 Evaluación de la <i>O</i> -desalquilación de etoxiresorufina (EROD) y metoxiresorufina (MROD) por la fracción microsomal de hígado de rata	14
5.11 Pruebas estadísticas	14
VI Resultados	14
6.1 mRNA de AHR, Arnt, Cyp1a1 y Cyp1a2	15
6.2 inmunodetección de AHR, Cyp1a1 y Cyp1a2	23
6.3 Metabolismo de EROD y MROD por la fracción microsomal de hígado de rata	29
VII Discusión	33
VIII Conclusiones	40
IX Perspectivas	41
X Referencias	41

## Resumen

La vía de señalización del receptor para hidrocarburos de arilo (AHR) tiene un alto impacto a nivel sistémico pues censa un amplio número de xenobióticos nocivos para la salud y modula la expresión de la familia de citocromos P450 Cyp1a (Cyp1a1 y Cyp1a2), proteínas capaces de bioactivar xenobiótico que están asociados a procesos de carcinogénesis. Actualmente se ha asociado la vía de señalización de AHR a procesos en el desarrollo, eritropoyesis y proliferación celular; sugiriendo un papel fisiológico en ausencia de xenobióticos.

Por otro lado, limitar el acceso al alimento en un periodo constante, permite modificar el patrón de expresión/represión de enzimas, sistemas transportadores e incluso receptores nucleares. Como consecuencia, las rutas metabólicas y fisiológicas se acoplan a los periodos de ayuno/realimentación. En este sentido, nos interesó determinar si la restricción de alimento influye en la variación de 24 h de la vía de AHR en hígado de rata. Para esto, se empleó un grupo control el cual tuvo libre acceso a agua y alimento y un grupo con restricción de alimento, el cual solo tuvo acceso al alimento en un periodo de 2 h diarias en la etapa de luz (12 a 14 h) por 21 días.

Los resultados mostraron que después del periodo de restricción de alimento: el transcrito de AHR presenta variación en un periodo de 24 h, pero a nivel de proteína este no presenta patrón temporal. En el caso de los genes blanco, tanto Cyp1a1 como Cyp1a2 presentaron un cambio de fase a nivel de mRNA y de proteína. Por lo anterior se puede concluir que la restricción de alimento no modifica la variación temporal de AHR, pero si modifica el patrón temporal de Cyp1a1 y Cyp1a2.



## I Introducción

### 1.1 Receptor para hidrocarburos de arilo

El receptor para hidrocarburos de arilo (AHR, por sus siglas en inglés) es miembro de la superfamilia de reguladores transcripcionales que presenta en su región *N*-terminal un sitio de unión al DNA del tipo básico hélice-bucle-hélice (bHLH, por sus siglas en inglés), mientras que la región *C*-terminal está formada por una secuencia homóloga a PER/ARNT/SIM (PAS, por sus siglas en inglés) (figura 1) (Kewley *et al.*, 2004; Gu *et al.*, 2000; Furness *et al.*, 2007).

A nivel celular el AHR aparece predominantemente en el citoplasma (Ikuta *et al.*, 2000), unido a un dímero de HSP90, un monómero de XAP2 y otro de p23 (Carver *et al.*, 1994; Whitelaw *et al.*, 1995; Ma y Whitlock, 1997, Carver y Bradfield, 1997; Meyer *et al.*, 1998). La expresión de AHR se ha reportado particularmente en pulmón, hígado, riñón, bazo y placenta (Abel y Haarmann, 2010).

El AHR cumple la función de sensor para un amplio número de moléculas exógenas asociadas a procesos toxicológicos; y como transductor de señales para enzimas involucradas en la biotransformación y disposición de dichos contaminantes (Verma *et al.*, 2012). Además, el AHR está involucrado como un modulador positivo/negativo de la proliferación celular (Murray, 2004), en la adhesión y migración celular (Sadek y Allen-Hoffman, 1994), y en la hematopoyesis (Lindsey y Papoutsakis, 2012).

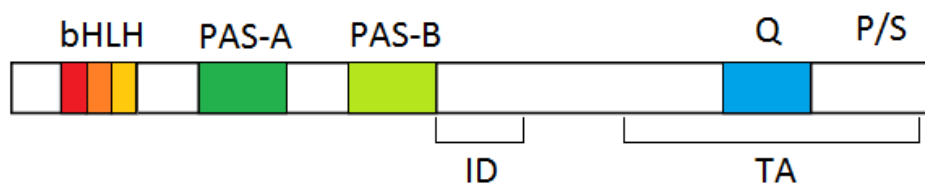


Figura 1. Dominios estructurales de AHR. Sitios de activación de transcripción (TA), dominio inhibitorio (ID), zona rica en glutamina (Q), zona rica en prolina y serina (P/S) (Modificada de Kewley *et al.*, 2004).

## 1.2 Ligandos de AHR

Un ligando se define como una molécula, ion, hormona o compuesto que tenga la capacidad de unirse a otra molécula en un sitio específico (receptor) (Campbell, 2005). Como se mencionó con anterioridad, el AHR cumple la función de sensor para moléculas exógenas; siendo el 2,3,7,8-[<sup>3</sup>H] tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD) el primer ligando descrito para AHR (Poland *et al.*, 1976); posteriormente se derivaron reportes identificando y caracterizando múltiples ligandos para el AHR, que han sido clasificados en clásicos y no clásicos (Figura 2) (Busbee *et al.*, 2013).

Los ligandos clásicos son aquellas moléculas planas con características similares a las del TCDD, como hidrocarburos aromáticos halogenados (dioxinas policlorados y bifenoles), numerosos hidrocarburos policíclicos aromáticos y moléculas similares (benzo [*a*] pireno y 3-metilcolantreno); por lo que las estructuras planas con una dimensión máxima de Van der Waals de 14 x 12 x 5 Å son capaces de ser ligandos de AHR (Denison y Nagy, 2003; Busbee *et al.*, 2013).

Los ligandos no clásicos son aquellas moléculas que tienen características estructurales y fisicoquímicas muy diferentes al TCDD, actualmente se han identificado un amplio número de moléculas de origen vegetal como indoles, flavonoides, alcaloides, tetrapiroles, metabolitos del ácido araquidónico, carotenoides y astaxantinas; además de múltiples moléculas endógenas como lipoxina A<sub>4</sub>, prostaglandinas, metabolitos de leucotrienos y metabolitos del triptófano (Denison y Nagy, 2003; Busbee *et al.*, 2013).

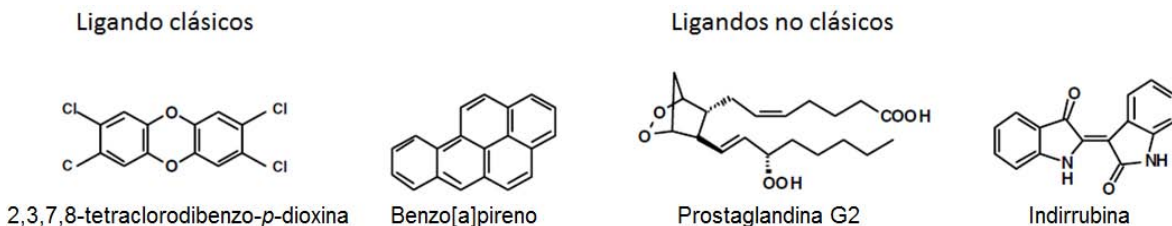


Figura 2. Esquema de ligandos clásicos y no clásicos de AHR (Modificado de Busbee *et al.*, 2013).

### 1.3 Vía de transducción de AHR

El AHR normalmente está en el citoplasma y una vez que el ligando atraviesa la membrana celular se da la unión del ligando al AHR, este pasa por un cambio conformacional, exponiendo la secuencia de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés) (Ikuta *et al.*, 1998; Soshilov y Denison 2008). El complejo ligando-AHR es trasladado al núcleo y ahí el AHR es liberado del complejo de proteínas que lo retenía en el citoplasma (dímero de HSP90, XAP2 y p23) (Pollenz *et al.*, 1994), seguido de la dimerización con el traslocador nuclear del AHR (ARNT, por sus siglas en inglés). La formación del complejo ligando-AHR:ARNT reconoce la secuencia 5'-TNGCGTG-3' (elemento de respuesta a dioxinas, DRE por sus siglas en inglés) (Denison *et al.*, 1988); iniciando la transcripción de una batería de genes formada por *CYP1A*, *CYP1B1*, *CYP2S1*, *UDP-glucoronosil transferasa* (UGT1A6), quinona oxidorreductasa-1 dependiente de NAD(P)H (NQO1), aldehído deshidrogenasa (ALDH3A1), glutatión S-transferasa, glicoproteína-P y proteínas asociadas a resistencia a múltiples drogas (MRPs) (Figura 3) (Fujii-Kuriyama y Mimura, 2005; Kawajiri y Fujii-Kuriyama, 2007).

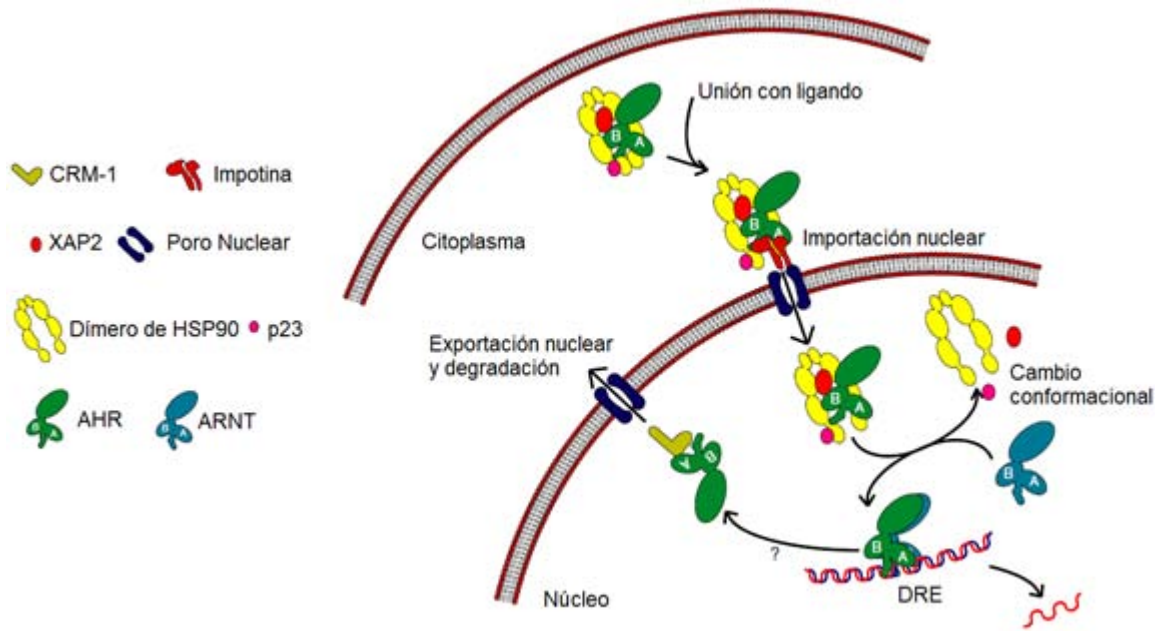


Figura 3. Esquema representativo de la vía de señalización del AHR (Modificado de Furness *et al.*, 2007).

## 1.4 Cyp1a

Los citocromos P450 (Cyp) son una superfamilia de hemoproteínas que catalizan la monooxigenación de diferentes endobióticos y xenobióticos. Existen 57 familias presentes en vertebrados, de la cual la familia Cyp1a se conforma por 2 genes (Cyp1a1 y Cyp1a2) (Operaña *et al.*, 2007).

El Cyp1a1 se encarga del metabolismo de hidrocarburos aromáticos policíclicos como el Benzo [a] Pireno (figura 4), aminas heterocíclicas y aromáticas; los cuales son considerados promutágenos pues sus metabolitos son capaces de formar aductos en el DNA, proceso que está asociado con la iniciación de la carcinogénesis (Witlock, 1999). El Cyp1a1 se expresa principalmente en pulmón, también se ha reportado en hígado fetal pero no de forma constitutiva en hígado de adulto (Shimada *et al.*, 1995).

El Cyp1a2 participa en el metabolismo de *N*-nitrosaminas, aflatoxinas B<sub>1</sub> (Figura 4), hidrocarburos nitropolicíclicos y aminas aromáticas que son reconocidos como promutágenos; además metaboliza fármacos como el acetaminofén, clozapina, fenacetina, tacrina, entre otros (Yamazaki *et al.*, 1992). El Cyp1a2, se expresa constitutivamente en hígado y no se ha detectado en pulmón (Kitada *et al.*, 1991, Shimada *et al.*, 1995).

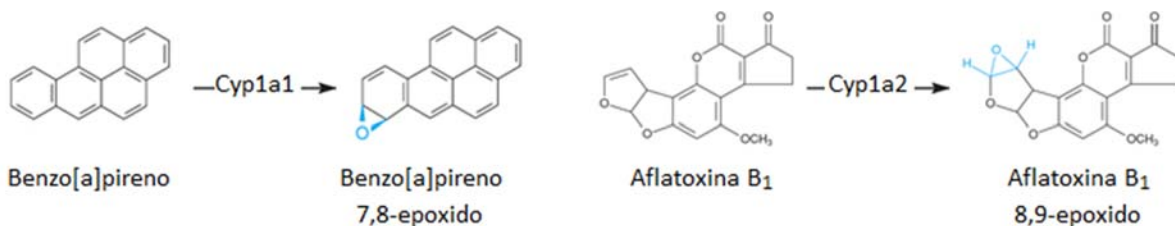


Figura 4. Esquema representativo del metabolismo del Benzo [a] Pireno y la aflatoxina B<sub>1</sub>, por medio de Cyp1a1 y Cyp1a2 respectivamente (Modificado de Zeldin y Seubert, 2008).

## 1.5 Ritmos circadianos

El término “circadiano” deriva del latín *circa* (alrededor) y *dies* (día), por lo que ritmo circadiano se refiere a ciclos de 24 h aproximadamente, promovidos principalmente por la transición luz/oscuridad (Eckel y Sassone, 2013); siendo la luz el principal sincronizador del ritmo circadiano. La luz es percibida por la retina y la señal es transmitida por el tracto retinohipotalámico hacia el núcleo supraquiasmático (SCN, por sus siglas en inglés); estructura que se encarga de interpretar los estímulos luminosos, enviando señales neurales y hormonales hacia los órganos para mantener la ritmicidad de aspectos fisiológicos y conductuales (Figura 5) (Gooley *et al.*, 2001; Panda *et al.*, 2002).

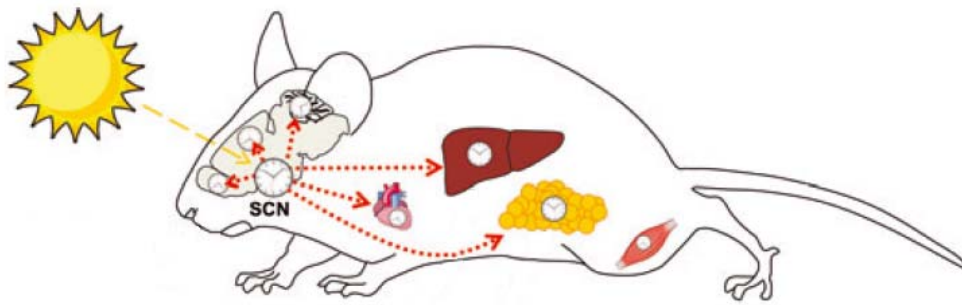


Figura 5. Esquema del efecto de la luz sobre los ritmos circadianos en órganos periféricos (Modificada de Damiola *et al.*, 2000).

El reloj circadiano es un mecanismo molecular que se compone por un complejo activador formado por el disparador de salida de ciclos circadianos del aparato locomotor (CLOCK, por sus siglas en inglés) y la proteína 1 similar a *Arnt* de cerebro y músculo (BMAL1, por sus siglas en inglés), los cuales forman el complejo CLOCK:BMAL1 que reconocen la secuencia 5'-CACGTG- 3' o E-box, presentes en la región promotora de una gran variedad de genes incluyendo al complejo represor formado por periodo (*Per*, por sus siglas en inglés) y criptocromo (*Cry*, por sus siglas en inglés); estos forman un heterodímero (PER:CRY) que inhibe al complejo activador, deteniendo la transcripción (Zheng *et al.*, 2001).

Durante este paso PER y CRY citoplasmáticos son degradados, proceso que disminuye la interacción con el complejo CLOCK:BMAL1, promoviendo que la transcripción sea reactivada (Figura 6). La expresión de estos genes no se limita a las neuronas del SCN; se ha observado que múltiples núcleos cerebrales y órganos como hígado, páncreas intestino, los expresan de forma rítmica; y sus ciclos persisten en ausencia de la influencia del SCN, a través de mecanismos locales para cada órgano, por lo que son considerados como osciladores periféricos (Gekakis *et al.*, 1998; Sangoram *et al.*, 1998; Kume *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 2001).

El ritmo circadiano modula el metabolismo y la homeostasis de la energía en tejidos, a través de la expresión y/o actividad de ciertas enzimas y sistemas transportadores (Hirota y Fukada, 2004; Green *et al.*, 2007; Kohsaka y Bass, 2007; Froy, 2013); así como un vasto número de receptores nucleares involucrados en el metabolismo (Froy, 2013). De la misma forma el AHR presenta un patrón circadiano (Richardson *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2006) y media la expresión de *Cyp1a1* bajo un patrón circadiano (Tanimura *et al.*, 2011). Por otro lado, la activación de AHR afecta directamente al reloj circadiano, pues se ha observado que la respuesta a la luz se ve alterada en ratones que han sido expuestos a TCDD (Mukai *et al.*, 2008), y que la  $\beta$ -naftoflavona, a través de la activación del AHR, puede atenuar la expresión de *per1* inducida por la presencia de luz en los mamíferos (Xu *et al.*, 2013).

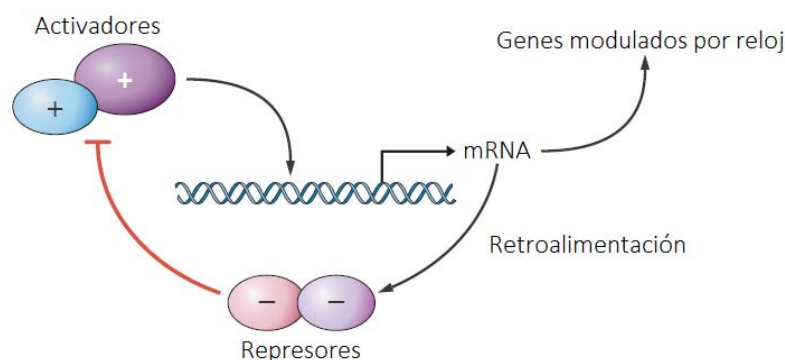


Figura 6. Esquema representativo de la retroalimentación en el reloj molecular (Froy, 2013).

## 1.6 Restricción de alimento

La restricción de alimento se refiere a limitar el tiempo y duración de la disponibilidad de alimento sin una reducción de calorías (Cassone y Stephan, 2002; Hirota y Fukada, 2004). Se ha observado que los animales bajo una restricción de alimento en pocos días se ajustan su conducta al período de alimentación; además, presentando secreción de corticosterona, motilidad gastrointestinal y actividad locomotora aproximadamente 2 h antes del periodo de alimentación (Comperatore y Stephan, 1987; Honma *et al.*, 1983; Saito *et al.*, 1976; Stephan, 2002).

La restricción de alimento afecta las oscilaciones circadianas en órganos como el hígado, riñón, corazón y páncreas, sin afectar el ritmo en el SNC (Figura 7) (Cassone y Stephan, 2002); incluso su efecto oscilatorio se presenta en animales con mutaciones en *clock* y lesiones en el SCN (Horikawa *et al.*, 2005). Se ha observado que actividades fisiológicas como la temperatura corporal, actividad locomotora y ritmo cardíaco se ajustan a los tiempos de acceso al alimento (Boulamery-Velly *et al.*, 2005); pero en cuanto la disponibilidad del alimento regresa a ser *ad libitum*, estas funciones vuelven a ser moduladas por el SCN (Damiola *et al.*, 2000).

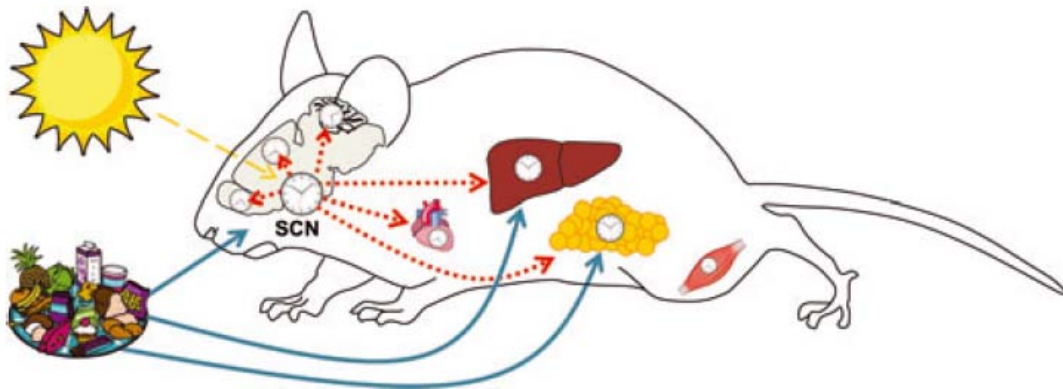


Figura 7. Ilustración del efecto de la luz y el alimento sobre los ritmos circadianos en órganos periféricos (Modificada de Damiola *et al.*, 2000).

Actualmente se ha descrito en protocolos de restricción de alimento cambio en la expresión de *Cyp7a1* y de la citocromo P450 oxidoreductasa (un componente catalítico de la mayoría de los Cyp) (Hirao *et al.*, 2006); sin embargo dentro del mismo trabajo se observa que la abundancia de Cyp totales no cambia con la restricción de alimento, lo que sugiere que la modulación de cada uno de los Cyp es diferente. Dentro de nuestro grupo de trabajo, mediante el uso de la técnica de microarreglos, se observó la disminución en la transcripción de *Cyp1a1* y *Cyp1a2* en el hígado de ratas bajo una restricción de alimento con respecto a los alimentados *ad libitum* (Díaz, *et al.* Inédito).

## II Planteamiento del problema

Actualmente, el estudio de la vía de AHR es amplio a través del enfoque toxicológico, ya que este cumple la función de sensor para un amplio número de xenobióticos nocivos para la salud. Recientemente, se ha observado que el AHR tiene variación circadiana en hígado, además de estar involucrado en procesos endógenos como desarrollo, eritropoyesis y proliferación celular; sugiriendo un papel fisiológico en ausencia de xenobióticos.

La restricción de alimento modifica el patrón de expresión/represión de enzimas, sistemas transportadores e incluso receptores nucleares, por lo que el seguimiento de este protocolo permite ajustar múltiples rutas fisiológicas del organismo a través de periodos de ayuno/realimentación. Recientemente en el laboratorio mediante el uso de la técnica de microarreglos, se observó la disminución en la transcripción de *Cyp1a1* y *Cyp1a2*, en el hígado de ratas bajo una restricción de alimento con respecto al grupo con libre acceso a alimento (Díaz, *et al.* Inédito).

Por lo anterior, el interés de este estudio es determinar si la restricción de alimento influye en la variación de 24 h de la vía de AHR en hígado de rata.



### III Hipótesis

Ya que la restricción de alimento modula la expresión temporal de genes involucrados en el metabolismo, la variación de 24 h de la vía de señalización de AHR presentará un cambio de fase cuando se empleé el modelo de restricción de alimento en *Rattus norvegicus*.

### IV Objetivos

#### General

- Determinar el efecto de la restricción de alimento sobre la variación de 24 h de la vía de señalización de AHR en hígado.

#### Particular

- Determinar si la restricción de alimento modifica la variación de 24 h de AHR hepático a nivel de mRNA y proteína.
- Determinar si la restricción de alimento modifica la variación de 24 h de CYP1A hepático a nivel de mRNA, proteína y actividad enzimática.

### V Material y método

#### 5.1 Modelo biológico

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 180 a 210 g adquiridos del bioterio del INB y mantenidos conforme a la guía institucional para cuidado y uso de animales bajo experimentación biomédica (UNAM). Los animales fueron mantenidos en grupos de 4 en cajas de acrílico transparente (40 x 50 x 20 cm), con un fotoperiodo de 12 h luz-12 oscuridad (las luces se prenden a las 08:00 h) y una temperatura constante de 22 °C. De primera instancia los animales fueron mantenidos con libre acceso a agua y alimento (laboratory rodent diet 5001, Lab Diet).

## 5.2 Modelo experimental

Las ratas fueron colocadas de forma aleatoria en uno de los siguientes grupos y mantenidas bajo esas condiciones durante 3 semanas: grupo control, con acceso libre a agua y alimento; grupo con restricción de alimento, con acceso al alimento limitado manualmente a 2 h diarias (12:00 a 14:00) (figura 8). Adicionalmente se establecieron 2 grupos: grupo ayuno, con acceso libre a agua y alimento durante 3 semanas, en el último día se les retiró el alimento (desde las 14:00 h); mientras que el grupo de realimentación tuvo las mismas condiciones que el grupo de ayuno, con la modificación de que este grupo recibió 2 h de alimento (12:00 a 14:00 h).

Al finalizar el protocolo de alimentación, los grupos fueron sacrificados en intervalos de 3 h en un periodo de 24 h, iniciando este a las 8:00 h; mientras que el grupo de ayuno y realimentación fueron sacrificados a las 11:00 h y 14:00 h, respectivamente. Se extrajo el hígado, del cual se tomó un trozo de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> para la obtención de mRNA total, y el resto se empleó para para la obtención del homogenado y fracción microsomal.



Figura 8. Esquema representativo de los períodos de acceso al alimento. La parte oscura simboliza las 12 h oscuridad y la amarilla las 12 h de luz; mientras que el tiempo de acceso al alimento es representado con la presencia del pellet a lo largo del ciclo de 24 h.

### 5.3 Extracción de RNA

La extracción total de RNA se realizó a partir 30 mg de las muestras de hígado usando el kit SV total RNA isolation system (PROMEGA) de acuerdo a las condiciones del proveedor. El RNA extraído fue disuelto en agua y cuantificado por espectrofotometría en 260 nm en un nanodrop 1000. La relación de A260/280 mayor a 1.8 fue considerada como una medida de pureza de RNA.

### 5.4 Síntesis de cDNA

A partir de 2 µg del RNA total se realizó la transcripción reversa a cDNA en un volumen total de 2 µL empleando el kit thermo Scientific RevetAid first strand cDNA synthesis (thermo Scientific) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Se utilizaron random hexamer primer en la reacción.

### 5.5 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos que se emplearon para amplificar los transcritos del AHR, ARNT, Cyp1a1 y Cyp1a2 se reportaron previamente (Brauze *et al.*, 2006; Katsanou *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2015) y fueron elegidos debido a que el amplicon cruza entre uniones exón-exón evitando amplificaciones de secuencias por contaminación de DNA genómico. La especificidad fue verificada con el alineamiento de BLAST (Tabla 1).

### 5.6 Reacción de RT-PCR

Los fragmentos de cDNA de AHR, Arnt, Cyp1a1 y Cyp1a2 fueron amplificados por RT-PCR en el equipo CFX96 real time system (BIORAD) usando SYBR GREEN como colorante detector. La amplificación se realizó en un volumen de 10 µL durante 40 ciclos usando los siguientes parámetros: 10 min de 95°C, 10 s de 95°C, 30 s de 60°C, 30 s para la T<sub>m</sub> descrita en tabla 1 para cada gen. Adicionalmente, en cada plato se realizó una reacción sin RT como control indicativo de contaminación genómica de DNA.

Los niveles de expresión fueron calculados con el software Bio-Rad CFX manager versión 3.1 y estos normalizados con respecto al gen de la proteína ribosomal S18 (RPS18) empleando el modelo propuesto por Livak y Schmittgen, 2001. Se empleó *RPS18* ya que se ha demostrado que su expresión no se ve afectada por la restricción de alimento (Valdes-Fuentes *et al.*, 2015).

Tabla 1 Oligonucleótidos usados en el RT-PCR

Número de acceso al gen	Secuencia	Tamaño de amplicon (bp)	Tm (°C)
<i>AHR</i> , NM_013149.3	Fw: 5' gggccaagagcttctttgatg 3' Rv: 5' gcaagtctgccagtctctga 3'	104	63°C
<i>Arnt</i> , NM_012780	Fw: 5' agagacttgccagggaaaatcata 3' Rv: 5' ttctgagccagggcactacagg 3'	111	66°C
<i>Cyp1a1</i> , NM_012540.2	Fw: 5' taactcttcctggatgccttcaa 3' Rv: 5' gtcccggatgtggccttctcaaa 3'	109	63°C
<i>Cyp1a2</i> , NM_012541.3	Fw: 5' accctgagtgagaaggtgat 3' Rv: 5' gaggatggctaagaagagga 3'	98	60°C
<i>Rps18</i> , NM_213557.1	Fw: 5' ttcagcacatcctgcgagta 3' Rv: 5' ttggtgaggtcaatgtctgc 3'	136	60°C

### 5.7 Homogenado de hígado y fracción microsomal

El hígado se homogenizó en un amortiguador que contenía Sacarosa 25 mM, Tris-HCl 10 mM, BSA 0.2 %, EGTA 0.3 mM y pH 7.4 en un volumen 1:5. Posteriormente una parte del homogenado se centrifugó a 15 000 g durante 15 min en una centrifuga Beckman Counter Avanti modelo J-301. El sobrenadante se recuperó para ser centrifugado a 7 000 g durante 15 min, y el sobrenadante resultante posteriormente se centrifugó a 100 000 g durante 1 h en la ultracentrífuga Beckman Counter Optima XL 100 K. El precipitado se resuspendió en el amortiguador antes descrito, para obtener la fracción microsomal.

## 5.8 Cuantificación de proteínas del homogenado y de la fracción microsomal de hígado de rata

La cuantificación de las proteínas del homogenado y fracción microsomal se realizó conforme al ensayo original de Bradford en 1976, con modificaciones para su lectura en microplaca. Se emplearon 10 µl de una dilución 1:80 de cada una de las muestras en agua, adicionando 200 µl de una dilución 1:4 del reactivo de Bradford en agua, cuantificando su absorbancia a 595 nm en un lector de microplaca Synergy H4™.

## 5.9 Inmunodetección del AHR en homogenado y de CYP1A1 y CYP1A2 de la fracción microsomal de hígado

Se realizó la electroforesis de 50 µg de proteína del homogenado en un gel de 10% poliacrilamida (SDS-PAGE), en presencia de un sistema discontinuo tris-Base 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 10 %. Se hizo la transferencia a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm (BioRad) a 23 v por 40 min en la presencia de una solución tris-Base 25 mM y glicina 192 mM. La membrana fue bloqueada por 2 h con 10 % de albúmina en un amortiguador TBS, que contenía 0.1 % Tween 20, 10 mM Tris-Base y 150 mM de NaCl (Gallagher *et al.*, 2007).

Posteriormente se incubó la membrana por 2 h con un anticuerpo policlonal para AHR (Abcam ab2770) en una disolución de 1:2500 en TBS al 5 % de albúmina. Se incubó por 60 min a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (Gt IgG H+L HRP) en una dilución 1:4000.

Se empleó el mismo protocolo utilizando 50 µg de la fracción microsomal para la inmunodetección de CYP1A1 y CYP1A2 mediante los anticuerpos sc-20772 y sc-30085, respectivamente, a una dilución 1:2000.

#### 5.10 Evaluación de la O-desalquilación de etoxiresorufina (EROD) y metoxiresorufina (MROD) por la fracción microsomal de hígado de rata

Esta reacción fue medida conforme al protocolo original (Burke *et al.*, 1994), con modificaciones para microplaca en un lector Synergy H4™. En un volumen final de 200 µl que se incubó a 37 °C por 3 min, el cual contenía 150 µl de buffer Tris 50 mM y MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 40 µg de proteína de la fracción microsomal, y 5 µl de EROD de una solución 50 µM. La reacción fue iniciada con la adición de 40 µl de NADPH 5 mM y se realizaron 20 lecturas con intervalos de tiempo de 20 seg. El protocolo anterior se empleó para MROD del cual se usó 0.75 µl de una solución de 500 µM.

#### 5.11 Pruebas estadísticas

Para determinar si los datos obtenidos presentan variación temporal se realizó la prueba de ANOVA de 1 vía; mientras que para identificar si hay diferencias entre en grupo de restricción de alimento y el grupo control del mismo horario se realizó la ANOVA de 2 vías. Todas las pruebas fueron realizadas en el programa IBM SPSS 21<sup>va</sup> versión para Windows. Los datos se muestran como la media del grupo +/- el error estándar (E.E.).

## VI Resultados

Para investigar el efecto de la restricción de alimento sobre la vía de señalización de AHR en el hígado de rata, a un grupo de animales se le limitó el acceso al alimento a 2 h diarias durante la fase luminosa (eliminando la influencia de la conducta habitual de alimentación durante la fase oscura) y libre acceso a agua por 21 días. Adicionalmente se emplearon 2 grupos más, uno con un periodo de ayuno de 22 h y otro con el periodo de ayuno seguido de 2 h de acceso al alimento; esto con el objetivo de evaluar si los cambios reflejados presentados en el grupo de restricción de alimento son derivados del periodo de ayuno-realimentación, o requieren de un mayor tiempo para adaptarse a la nueva condición del alimento.

### 6.1 mRNA de AHR, Arnt, Cyp1a1 y Cyp1a2

La expresión del *AHR* fue analizada por RT-PCR cuantitativo del tejido hepático de ratas de cada grupo. En la figura 9 se presentan los resultados de la expresión relativa de *AHR* normalizados con respecto a *Rps18*. El grupo control presentó variación temporal de 24 h, particularmente un patrón bifásico con un punto máximo en la fase luminosa (14 h) y otro en la fase oscura (23 h); mientras que el patrón temporal de expresión del *AHR* en animales con restricción de alimento presentó cambio en la transcripción a las 8 y 20 h con respecto al grupo control. De misma forma, el grupo de ayuno y de realimentación no presentó cambio con respecto al grupo control; sin embargo, el grupo de realimentación mostró un cambio con respecto al grupo de restricción de alimento.

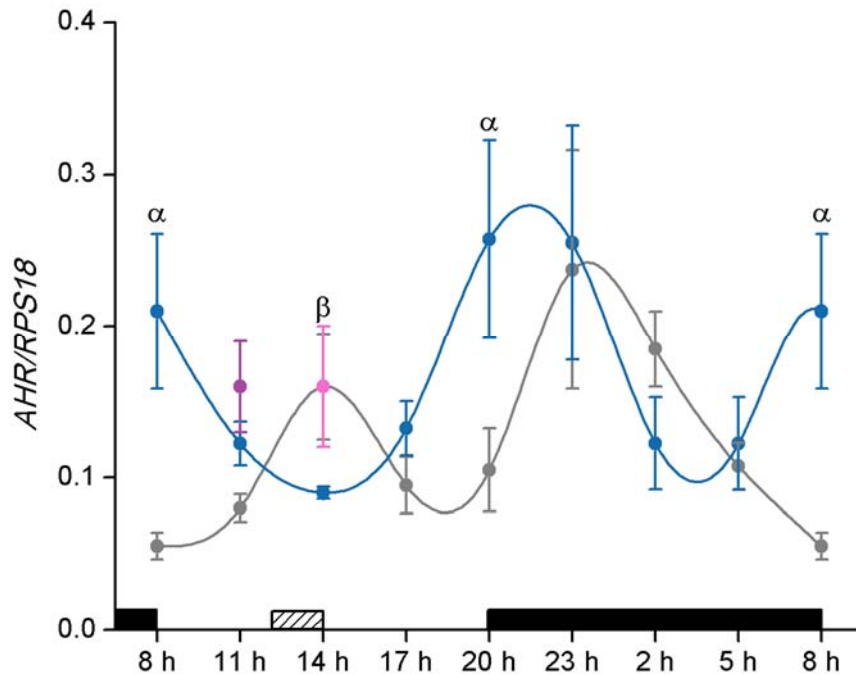


Figura 9. Variación temporal (●) y efecto de la restricción de alimento (●), período de ayuno (●) y realimentación (●) sobre la expresión de mRNA de AHR en de hígado de rata. Las cajas negras indican el intervalo de tiempo que la luz permanencia apagada, mientras que la caja con rayas en diagonal al período de acceso al alimento en el grupo con restricción. Los datos se expresan en veces de incrementos relativos con respecto al gen RPS18.  $\alpha P \leq 0.05$  con respecto al control del mismo horario y  $\beta P \leq 0.05$  con respecto al grupo de restricción del mismo horario. Cada punto corresponde al promedio de tres lecturas de cuatro ratas +/- E.E.

En la figura 10 se presenta la tasa de transcripción de *AHR* en la fase luminosa y oscura del grupo control y del grupo con restricción de alimento; así como la transcripción total de cada grupo. De forma característica se observa una mayor transcripción del *AHR* en la fase oscura en el grupo control; y esta misma tendencia se refleja en el grupo de restricción de alimento. Mientras que la transcripción total de cada grupo no presentó diferencia entre ambos grupos.

Durante la determinación de la transcripción de *AHR* en cada horario se observan cambios en el grupo con restricción de alimento (8 y 20 h), es posible que los picos de transcripción observados en el grupo control (14 y 23 h) hayan presentado un adelanto, pero este al ser bifásico no permite distinguir un cambio en la transcripción total durante las fases. Lo anterior puede ser debido a que el *AHR* presenta en su región promotora una caja GC, la cual se ha asociado a genes de transcripción lenta (Garrison y Denison, 2000); lo que puede explicar su baja respuesta en el grupo con restricción de alimento.

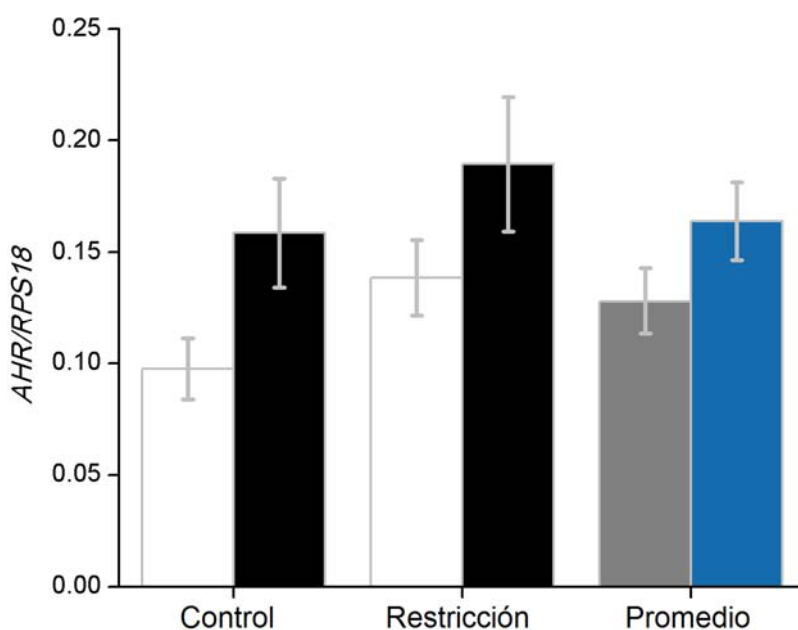


Figura 10. Cada barra corresponde al promedio  $\pm$  E.E. de cada uno de los registros en fase luminosa (barra blanca) y fase oscura (barra negra) de cada grupo; y el promedio de los valores obtenidos en el grupo control (barra gris) y en el grupo de restricción (barra azul).



La expresión del *Arnt* fue analizada por RT-PCR cuantitativo del tejido hepático de ratas de cada grupo. En la figura 11, se presentan los resultados de la expresión relativa de *Arnt* normalizados con respecto a *Rps18*. El grupo control presentó un patrón de variación temporal de 24 h, mostrando un pico máximo a las 23 h para mantener una baja transcripción durante el periodo luminoso. De forma interesante el grupo con restricción de alimento perdió la característica rítmica de la expresión de *Arnt* para tener una mayor transcripción durante la fase luminosa; particularmente a las 23 y 2 h el grupo con restricción de alimento presentó una baja transcripción con respecto al grupo control. Por otro lado, en el grupo de ayuno no se observó diferencias con respecto al grupo control ni al de restricción de alimento; siendo el grupo de realimentación el que presentó un aumento con respecto al grupo control.

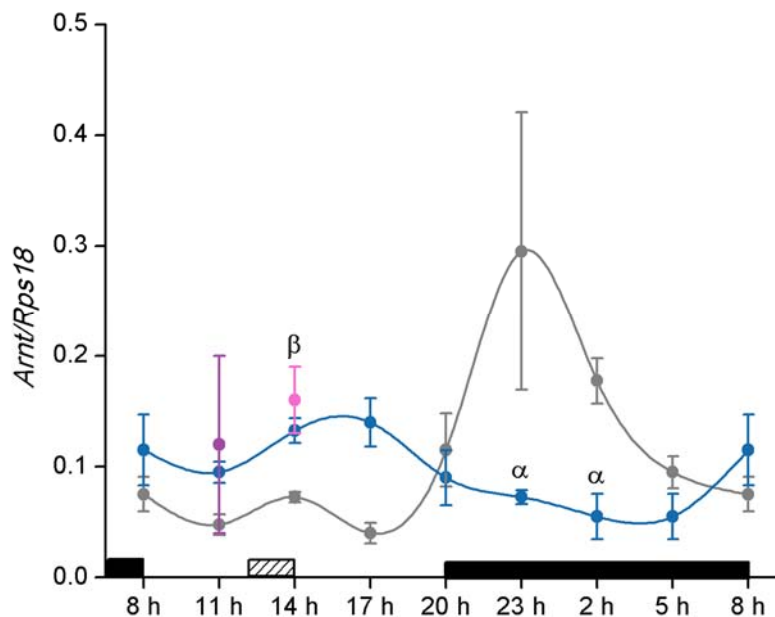


Figura 81. Variación temporal (●) y efecto de la restricción de alimento (●), período de ayuno (●) y realimentación (●) sobre la expresión de mRNA de *Arnt* en de hígado de ratas. Las cajas negras indican el intervalo de tiempo que la luz permaneció apagada, mientras que la caja con rayas en diagonal al período de acceso al alimento en el grupo con restricción. Los datos se expresan en veces de incrementos relativos con respecto al gen *RPS18*. Cada punto corresponde al promedio de tres lecturas de cuatro ratas  $\pm$  E.E.  $\alpha$   $P \leq 0.05$  con respecto al control del mismo horario y  $\beta$   $P \leq 0.05$  con respecto al grupo de restricción del mismo horario.

En la figura 12 se presenta la tasa de transcripción de *Arnt* en la fase luminosa y oscura del grupo control y del grupo con restricción de alimento; así como la transcripción total de cada grupo. En el grupo control se observa una mayor transcripción de *Arnt*, durante la fase oscura, respuesta que se invierte en el grupo con restricción de alimento sugiriendo que la expresión de *Arnt* presentó un cambio de fase; particularmente la transcripción aumentó considerablemente en la fase luminosa, mientras que en la fase oscura mostró una disminución, ambos casos con respecto al grupo control. De forma interesante, la transcripción total grupo control y el de restricción de alimento, no presentaron cambio entre ellos.

Poco está documentado sobre la inducción de *Arnt*, sin embargo, este componente es utilizado por otros miembros de la superfamilia bHLH-PAS, por lo que su cambio en el patrón temporal puede estar asociado a otro proceso que se haya modificado por la restricción de alimento.

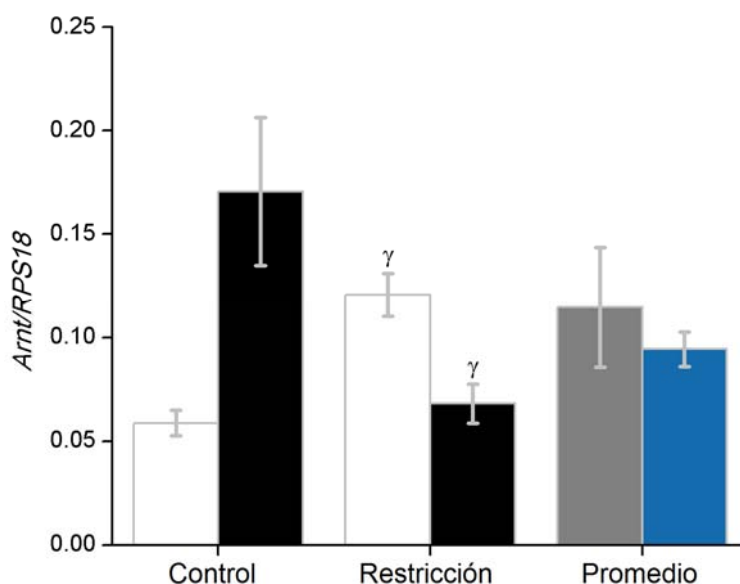


Figura 12. Cada barra corresponde al promedio +/- E.E. de cada uno de los registros en fase luminosa (barra blanca) y fase oscura (barra negra) de cada grupo; y el promedio global de los valores obtenidos en el grupo control (barra gris) y en el grupo de restricción (barra azul).  $\gamma P \leq 0.05$  con respecto al control de la misma fase.

La expresión del *Cyp1a1* fue analizada por RT-PCR cuantitativo del tejido hepático de ratas de cada grupo. En la figura 13, se presentan los resultados de la expresión relativa de *Cyp1a1* normalizados con respecto a *Rps18*. Los niveles de *Cyp1a1* en hígado de rata del grupo control mostraron un patrón de variación temporal de 24 h con los niveles más altos en la fase oscura (20, 23 y 2 h). De forma interesante el patrón temporal de 24 h de *Cyp1a1* en hígado de ratas con acceso al alimento en la fase luminosa mostró los picos más altos en el intervalo de 2 h antes y 2 h después al acceso al alimento (11, 14 y 17 h), siendo significativos con respecto al grupo control. Particularmente las mediciones realizadas en el grupo de ayuno y realimentación no reflejaron cambio con respecto al grupo control, pero si con respecto al grupo de restricción de alimento.

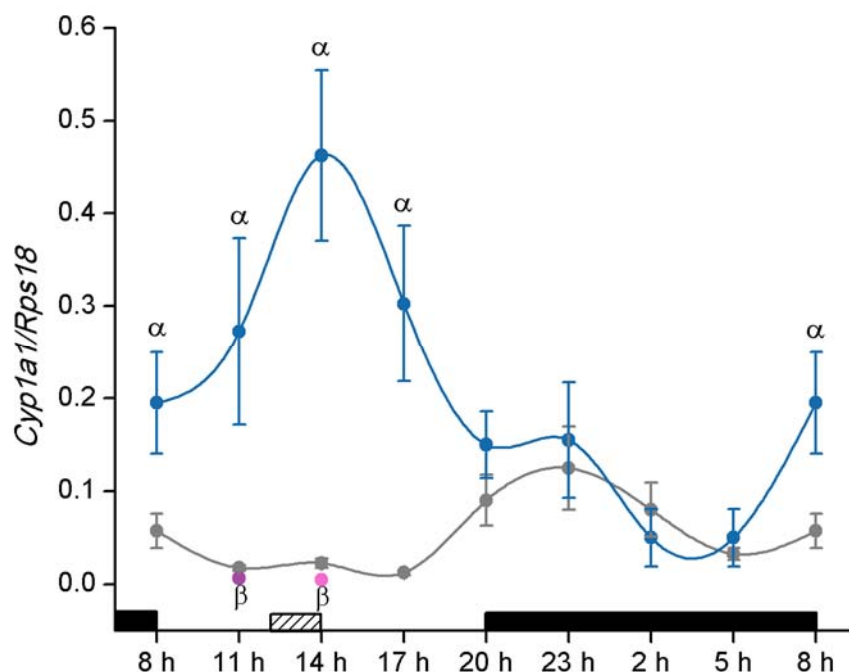


Figura 93. Variación temporal (●) y efecto de la restricción de alimento (●), periodo de ayuno (●) y realimentación (●) sobre la expresión de mRNA de *Cyp1a1* en de hígado de rata. Las cajas negras indican el intervalo de tiempo que la luz permaneció apagada, mientras que la caja con rayas en diagonal al período de acceso al alimento en el grupo con restricción. Los datos se expresan en veces de incrementos relativos con respecto al gen *RPS18*.  $\alpha$   $P \leq 0.05$  con respecto al control del mismo horario y  $\beta$   $P \leq 0.05$  con respecto al grupo de restricción del mismo horario. Cada punto corresponde al promedio de tres lecturas de cuatro ratas  $\pm$  E.E.

En la figura 14 se presenta la tasa de transcripción de *Cyp1a1* en la fase luminosa y oscura del grupo control y del grupo con restricción de alimento; así como la transcripción total de cada grupo. El grupo control mostro una mayor transcripción de *Cyp1a1* en la fase oscura, sin embargo, en el grupo de restricción de alimento se observó mayor transcripción durante el periodo luminoso, sugiriendo que la expresión de *Cyp1a1* presentó un cambio de fase. Al comparar los datos determinados por el grupo control y el de restricción de alimento, se observa un aumento en la transcripción en el grupo con restricción de alimento.

De acuerdo con Kawajiri K. y Fujii-Kuriyama, 2007; *Cyp1a1* presenta 7 DRE en su región promotora, por lo que es considerado un control positivo de activación de AHR; es posible que este aumento en la transcripción en el periodo previo y posterior a la alimentación sea debido a un ligando que de forma transitoria activa a AHR, y con ello la transcripción de *Cyp1a1*.

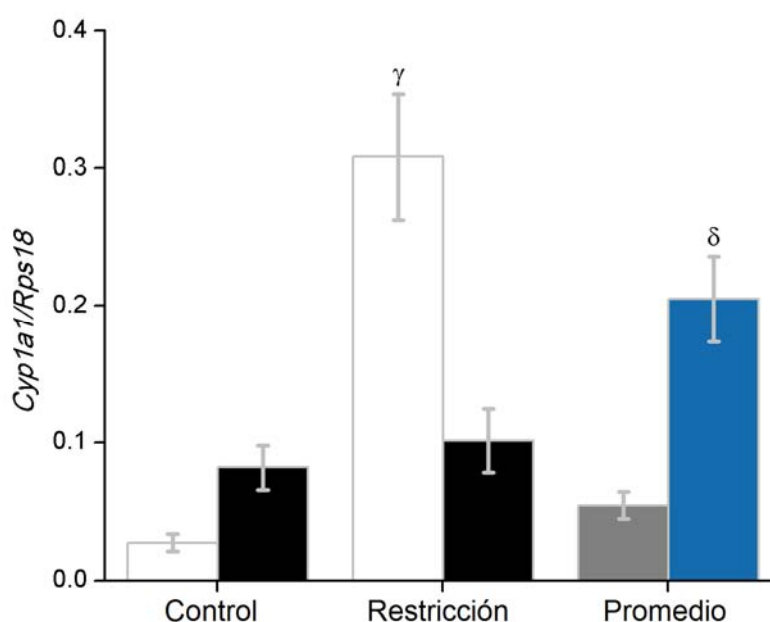


Figura 14. Cada barra corresponde al promedio  $\pm$  E.E. de cada uno de los registros en fase luminosa (barra blanca) y fase oscura (barra negra) de cada grupo; y el promedio global de los valores obtenidos en el grupo control (barra gris) y en el grupo de restricción (barra azul).  $\gamma$   $P \leq 0.05$  con respecto al control de la misma fase y  $\delta$   $P \leq 0.05$  con respecto al control de la misma fase.

La expresión del *Cyp1a2* fue analizada por RT-PCR cuantitativo del tejido hepático de ratas de cada grupo. En la figura 15, se presentan los resultados de la expresión relativa de *Cyp1a2* normalizados con respecto a *Rps18*. La expresión de *Cyp1a2* mostró una mayor transcripción en la fase oscura (23 h), y este decae en los horarios subsiguientes manteniendo baja transcripción durante el período luminoso; particularmente una mayor magnitud durante todo el ciclo de 24 h con respecto al *Cyp1a1*. Por otro lado, en el grupo de restricción de alimento el *Cyp1a2* presentó alta transcripción en la etapa del encendido de la luz (8 h) con respecto al grupo control, y decayendo en las subsiguientes horas. Mientras que en el grupo de ayuno y realimentación solo se observó cambios con respecto al grupo de restricción de alimento.

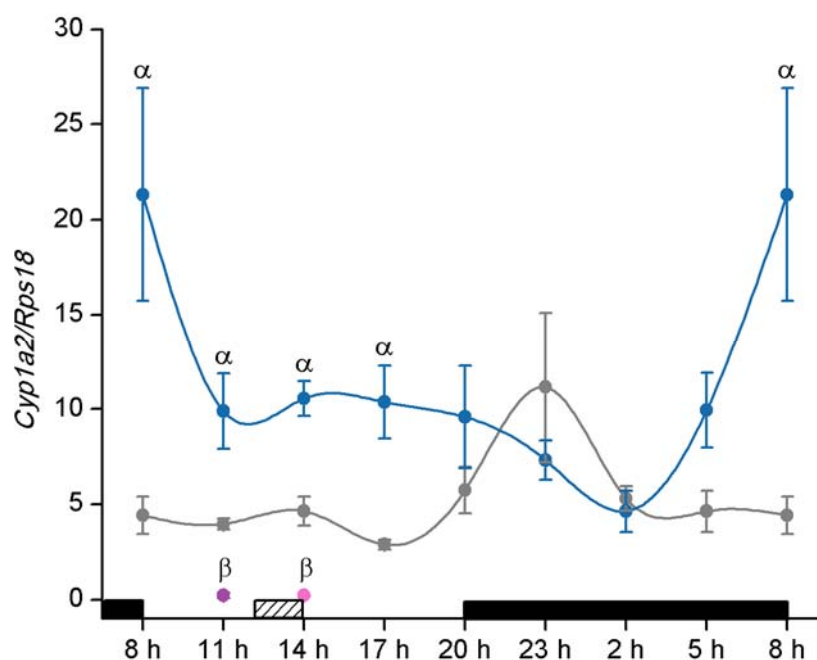


Figura 15. Variación temporal (●) y efecto de la restricción de alimento (●), período de ayuno (●) y realimentación (●) sobre la expresión de mRNA de *Cyp1a2* en de hígado de ratas. Las cajas negras indican el intervalo de tiempo que la luz permanencia apagada, mientras que la caja con rayas en diagonal al período de acceso al alimento en el grupo con restricción. Los datos se expresan en veces de incrementos relativos con respecto al gen *RPS18*.  $\alpha$   $P \leq 0.05$  con respecto al control del mismo horario y  $\beta$   $P \leq 0.05$  con respecto al grupo de restricción del mismo horario. Cada punto corresponde al promedio de tres lecturas de cuatro ratas  $\pm$  E.E.

En la figura 16 se presenta la tasa de transcripción de *Cyp1a2* en la fase luminosa y oscura del grupo control y del grupo con restricción de alimento; así como la transcripción total de cada grupo. En el grupo control se observa una mayor tendencia a la transcripción de *Cyp1a2* en la fase oscura, de forma congruente con el cambio presentado por *Cyp1a1*. En el grupo de restricción de alimento se observa mayor transcripción durante el período luminoso, y al compararlo con el grupo control muestran una inversión de fase (Figura 8B y 8D); mientras que el promedio de los datos del grupo de restricción, se observa un aumento en la transcripción en el grupo control.

Si bien, la región promotora del *Cyp1a2* también presenta DRE (Kawajiri K. y Fujii-Kuriyama, 2007), ya está documentado que estos son en menor abundancia con respecto al *Cyp1a1*; además, es capaz de ser modulado por otras vías de señalización, lo que sugiere que el patrón diferencial entre *Cyp1a1* y *Cyp1a2* sea debido a las condiciones particulares de sus regiones promotoras.

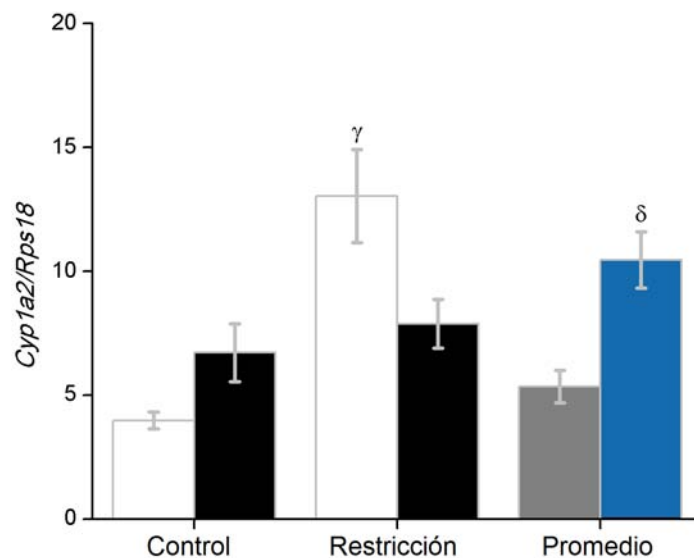


Figura 16. Cada barra corresponde al promedio +/- E.E. de cada uno de los registros en fase luminosa (barra blanca) y fase oscura (barra negra) de cada grupo; y el promedio global de los valores obtenidos en el grupo control (barra gris) y en el grupo de restricción (barra azul).  $\gamma$   $P \leq 0.05$  con respecto al control de la misma fase y  $\delta$   $P \leq 0.05$  con respecto al control de la misma fase.

## Inmunodetección de AHR, Cyp1a1 y Cyp1a2

La presencia de AHR fue evaluada a partir de 50  $\mu\text{g}$  de proteínas presentes en el homogenado de hígado de rata de cada uno de los grupos. En la figura 17 A, se presenta una inmunodetección representativa de AHR y  $\beta$ -actina de cada uno de los grupos; en la figura 17 B se presenta el patrón temporal de la relación de AHR con respecto a  $\beta$ -actina; mientras que en la figura 17 C se presenta la tasa de expresión de AHR en cada fase del grupo control y del grupo con restricción de alimento; así como la transcripción total de cada grupo.

El grupo control no presentó variación temporal y de igual forma el grupo con restricción de alimento, así como no hubo diferencias entre los grupos en los diferentes horarios; lo cual contrasta con lo observado con lo determinado a nivel de mRNA en este trabajo. De forma interesante del grupo de ayuno solo presentó cambio con respecto al grupo control, mientras que el grupo de realimentación no presenta cambio con respecto al grupo control o de restricción de alimento.

Al contrastar los valores de cada fase, se observó una mayor abundancia de AHR en la fase luminosa del grupo control, cuyo patrón se repitió en el grupo con restricción de alimento; promoviendo que no haya diferencia entre la expresión total de los grupos.

Al integrar la información obtenida en el RT-PCR con determinada en la inmunodetección, se observa que el ritmo presentado a nivel de mRNA se pierde a nivel de proteína; esto puede ser derivado por los múltiples procesos involucrados en la traducción, así como de las modificaciones postraduccionales que requiera el AHR para adquirir funcionalidad.

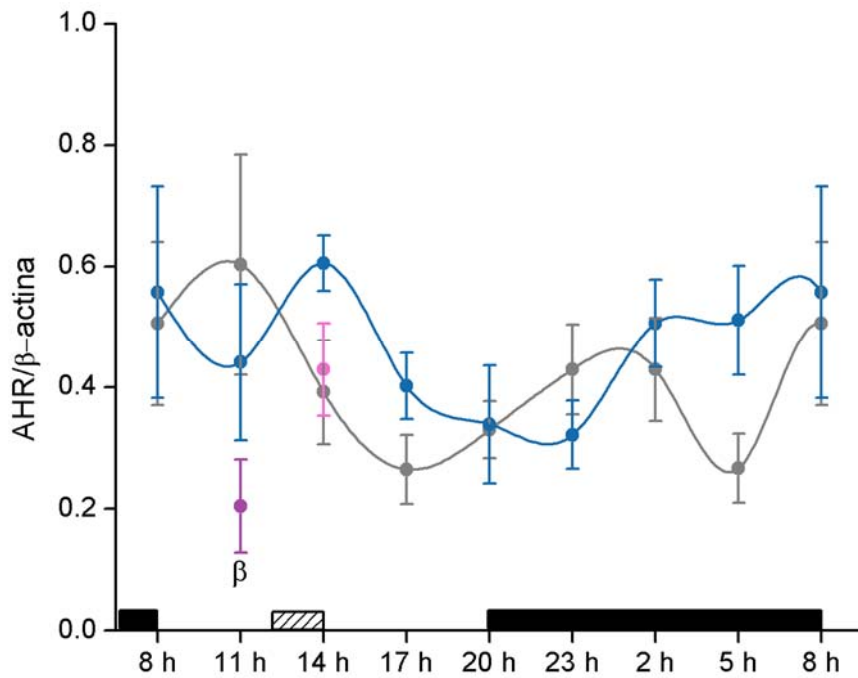
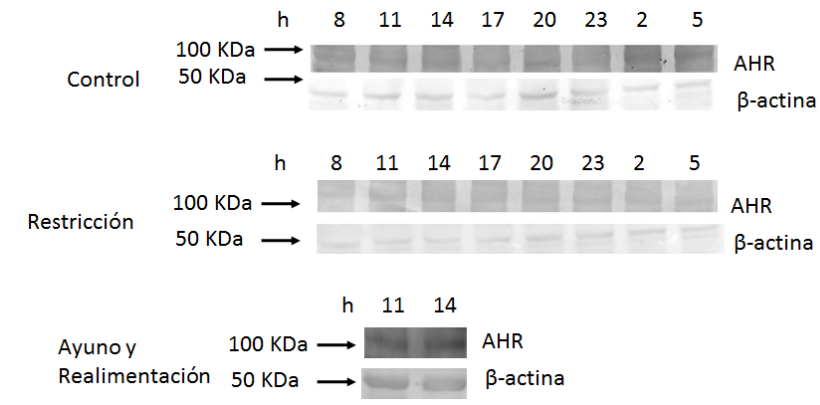
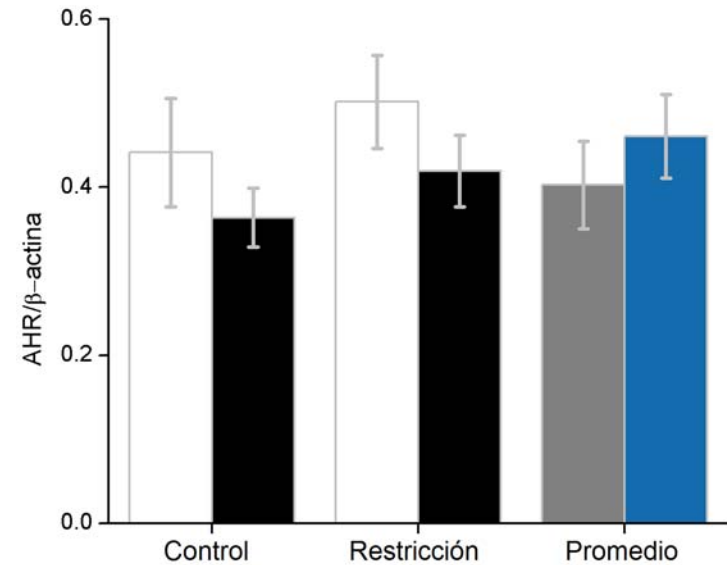


Figura 17 en A, inmunodetección representativa de AHR y  $\beta$ -actina en homogenado de hígado de rata del grupo control, restricción de alimento, ayuno y realimentación de cada uno de los puntos de muestreo. en B, variación temporal (●) y efecto de la restricción de alimento (●), período de ayuno (●) y realimentación (●) sobre la expresión de AHR en de hígado de rata. Los datos se expresan en veces de incrementos relativos con respecto a  $\beta$ -actina. Las cajas negras indican el intervalo de tiempo que la luz permanencia apagada, mientras que la caja con rayas en diagonal al período de acceso al alimento en el grupo con restricción. Cada punto corresponde al promedio de tres lecturas de cuatro ratas  $\pm$  E.E.  $P \leq 0.05$  con respecto al grupo de restricción del mismo horario. En C, cada barra corresponde al promedio  $\pm$  E.E. de cada uno de los registro en fase luminosa (barra blanca) y fase oscura (barra negra) de cada grupo; y el promedio global de los valores obtenidos en el grupo control (barra gris) y en el grupo de restricción (barra azul).





La presencia de Cyp1a1 fue evaluada a partir de 100  $\mu$ g de proteínas presentes en el en la fracción microsomal de hígado de rata de cada uno de los grupos. En la figura 18 A, se presenta una inmunodetección representativa de Cyp1a1 y  $\beta$ -actina de cada uno de los grupos; en la figura 18 B se presenta el patrón temporal de la relación de Cyp1a1 con respecto a  $\beta$ -actina; mientras que en la figura 18 C se presenta la tasa de expresión de Cyp1a1 en cada fase del grupo control y del grupo con restricción de alimento; así como la transcripción total de cada grupo.

La presencia de Cyp1a1 en el grupo control mostró variación temporal en 24 h, con una mayor presencia en la fase oscura en los horarios de 2 y 5 h, el cual puede derivar de los puntos altos de transcripción (20 y 23 h) observados en este trabajo. En el grupo bajo restricción de alimento aumentó la presencia de Cyp1a1 con respecto al grupo control a las 8, 11 y 23 h coincidiendo con los puntos de alta transcripción observados en este trabajo; mientras que el grupo de ayuno solo presentó cambio con respecto al grupo de restricción de alimento.

En el grupo control no se observó cambio entre sus fases, sin embargo, en el grupo de restricción de alimento se observó mayor expresión durante el periodo luminoso, sugiriendo que la expresión de Cyp1a1 presentó un cambio de fase. Al comparar los datos determinados por el grupo control y el de restricción de alimento, se observa un aumento en la transcripción en el grupo con restricción de alimento.

Tanto los datos del mRNA de Cyp1a1 y los de proteína en el grupo con restricción de alimento reflejan un cambio de fase, lo que sugiere que cantidad de transcrito es suficiente para ser traducido y ser detectado en la inmunodetección.

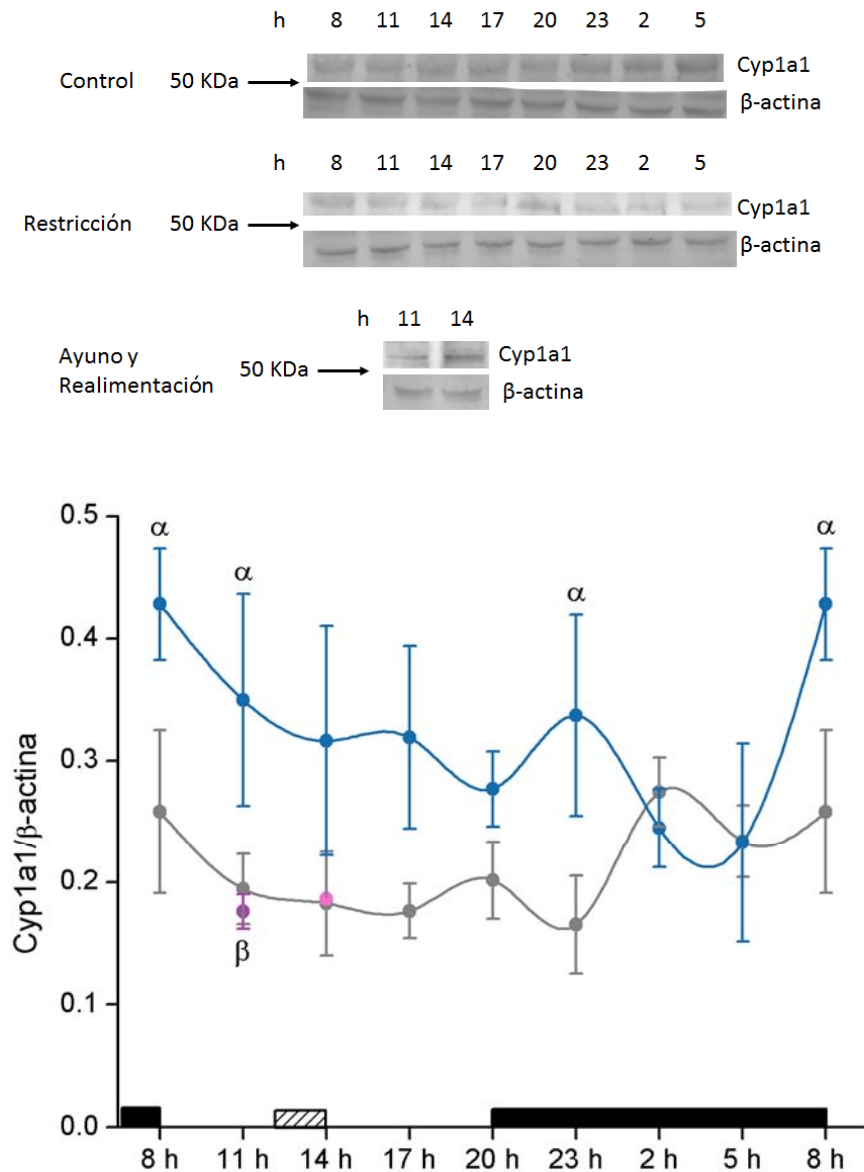
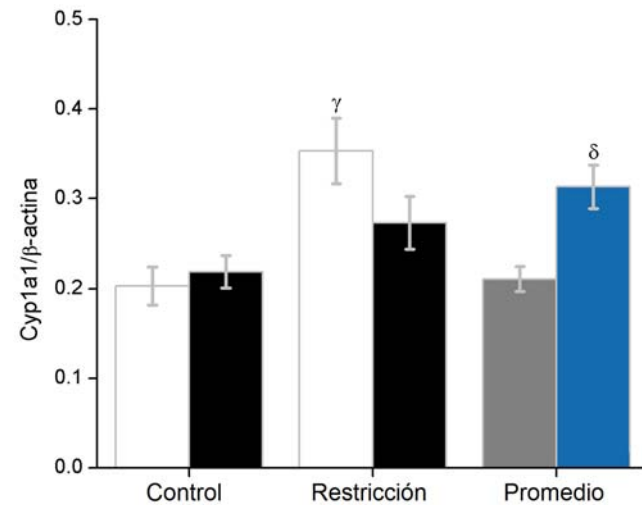


Figura 18 en A, inmunodetección representativa de Cyp1a1 y  $\beta$ -actina en homogenado de hígado de rata del grupo control, restricción de alimento, ayuno y realimentación de cada uno de los puntos de muestreo. En B, variación temporal ( $\bullet$ ) y efecto de la restricción de alimento ( $\bullet$ ), período de ayuno ( $\bullet$ ) y realimentación ( $\bullet$ ) sobre la expresión de Cyp1a1 en de hígado de rata. Los datos se expresan en veces de incrementos relativos con respecto a  $\beta$ -actina. Las cajas negras indican el intervalo de tiempo que la luz permanencia apagada, mientras que la caja con rayas en diagonal al período de acceso al alimento en el grupo con restricción. Cada punto corresponde al promedio de tres lecturas de cuatro ratas  $\pm$  E.E.  $\alpha$   $P \leq 0.05$  con respecto al control del mismo horario y  $\beta$   $P \leq 0.05$  con respecto al grupo de restricción del mismo horario. En C, cada barra corresponde al promedio  $\pm$  E.E. de cada uno de los registro en fase luminosa (barra blanca) y fase oscura (barra negra) de cada grupo; y el promedio global de los valores obtenidos en el grupo control (barra gris) y en el grupo de restricción (barra azul).  $\gamma$   $P \leq 0.05$  con respecto al control de la misma fase y  $\delta$   $P \leq 0.05$  con respecto al control de la misma fase.



La presencia de Cyp1a2 fue evaluada a partir de 100  $\mu$ g de proteínas presentes en el en la fracción microsomal de hígado de rata de cada uno de los grupos. En la figura 19 A, se presenta una inmunodetección representativa de Cyp1a1 y  $\beta$ -actina de cada uno de los grupos; en la figura 19 B se presenta el patrón temporal de la relación de Cyp1a2 con respecto a  $\beta$ -actina; mientras que en la figura 19 C se presenta la tasa de expresión de Cyp1a1 en cada fase del grupo control y del grupo con restricción de alimento; así como la transcripción total de cada grupo.

La inmunodetección de Cyp1a2 en el grupo control reflejo una particular abundancia de la proteína en la fase oscura junto con la tendencia determinada en el mRNA de este trabajo. Mientras que en el grupo con restricción de alimento se observó una mayor abundancia de Cyp1a2 a las 11, 14 y 17 h (siendo el calor de las 14 h el más alto), esto con respecto al grupo control. Por otro lado, tanto el grupo de ayuno y realimentación mostró cambio con respecto al grupo de restricción de alimento, mas no, con respecto al grupo control.

Al considerar los datos en cada fase de los grupos, el grupo control presentó una mayor abundancia en la fase oscura, mientras que el grupo con restricción de alimento presentó mayor abundancia en la fase luminosa; sin embargo, la fase oscura no presentó cambio con respecto a la del grupo control. De forma interesante los promedios de los tratamientos no presentaron cambios.

Tanto los datos obtenidos en el RT-PCR y los de proteína muestra la misma tendencia de cambio de fase; caso que se observa en los resultados de Cyp1a1 en este trabajo; lo que permite inferir que la activación de la vía de señalización está siendo activada y se presentan las condiciones para que esta promueva un cambio a nivel de proteína en la familia Cyp1a.

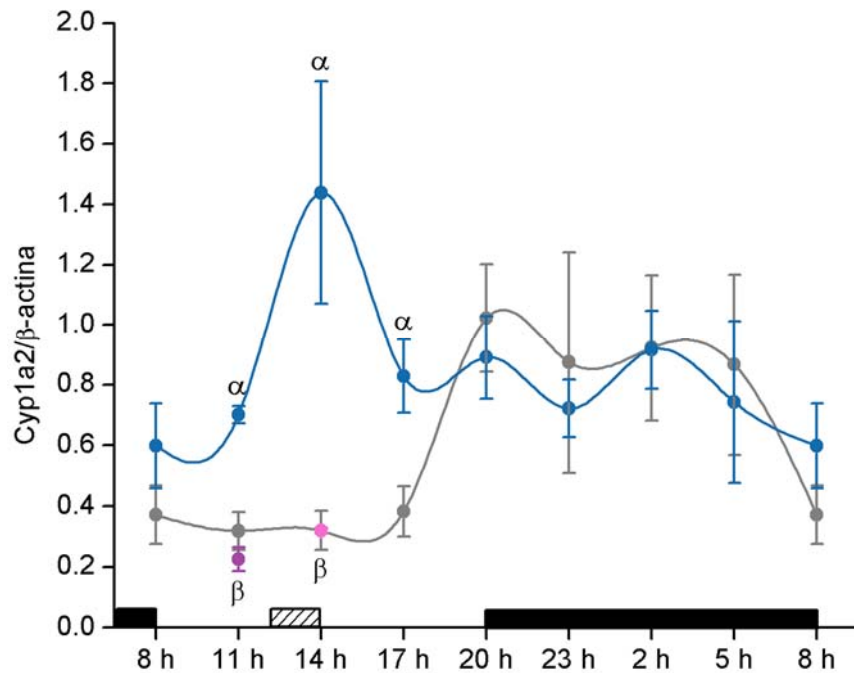
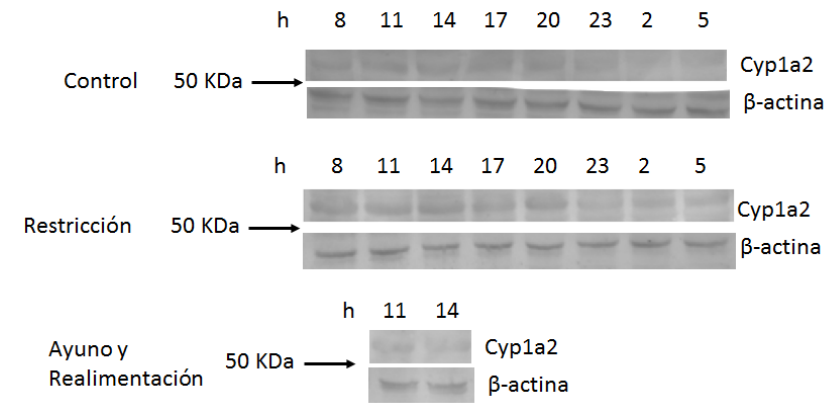
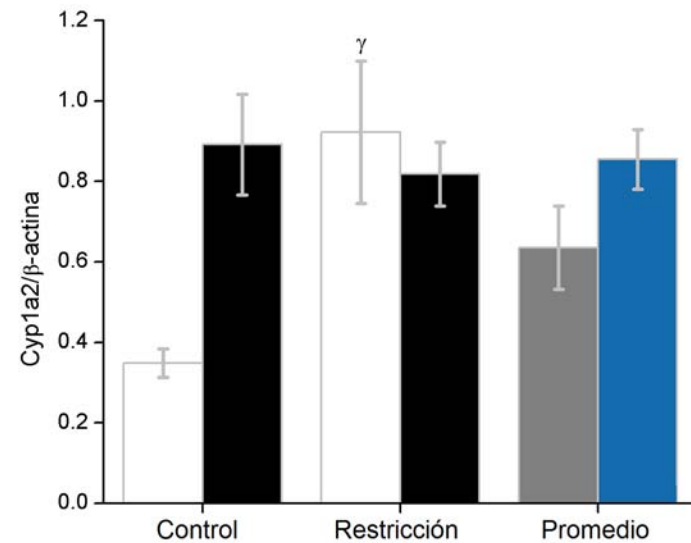


Figura 19 en A, inmunodetección representativa de AHR y  $\beta$ -actina en homogenado de hígado de rata del grupo control, restricción de alimento, ayuno y realimentación de cada uno de los puntos de muestreo. En B, variación temporal (●) y efecto de la restricción de alimento (●), período de ayuno (●) y realimentación (●) sobre la expresión de Cyp1a1 en de hígado de rata. Los datos se expresan en veces de incrementos relativos con respecto a  $\beta$ -actina. Las cajas negras indican el intervalo de tiempo que la luz permanencia apagada, mientras que la caja con rayas en diagonal al período de acceso al alimento en el grupo con restricción. Cada punto corresponde al promedio de tres lecturas de cuatro ratas  $\pm$  E.E.  $\alpha$   $P \leq 0.05$  con respecto al control del mismo horario y  $\beta$   $P \leq 0.05$  con respecto al grupo de restricción del mismo horario. En C, cada barra corresponde al promedio  $\pm$  E.E. de cada uno de los registro en fase luminosa (barra blanca) y fase oscura (barra negra) de cada grupo; y el promedio global de los valores obtenidos en el grupo control (barra gris) y en el grupo de restricción (barra azul). y  $P \leq 0.05$  con respecto al control de la misma fase.



## Metabolismo de EROD y MROD por la fracción microsomal de hígado de rata

Con el objetivo evaluar la actividad de Cyp1a1 en el hígado de rata, se evaluó el metabolismo de EROD por la fracción microsomal del hígado. En la figura 20 se presenta el patrón temporal del metabolismo de resorufina a EROD por medio de Cyp1a1. En el grupo control, se observó un patrón bifásico, presentando una elevación a las 8 h (encendido de luz) y otra a las 20 h (apagado de luz). El grupo de restricción mostró un patrón similar al grupo control, con la excepción de las 11 y 23 h, donde se presenta un aumento en el metabolismo de EROD, mientras que a las 5 h se observa una disminución con respecto al grupo control. Por otro lado, el grupo de ayuno y realimentación presentó el mismo comportamiento que el grupo control; sin embargo, este solo difirió del grupo con restricción de alimento.

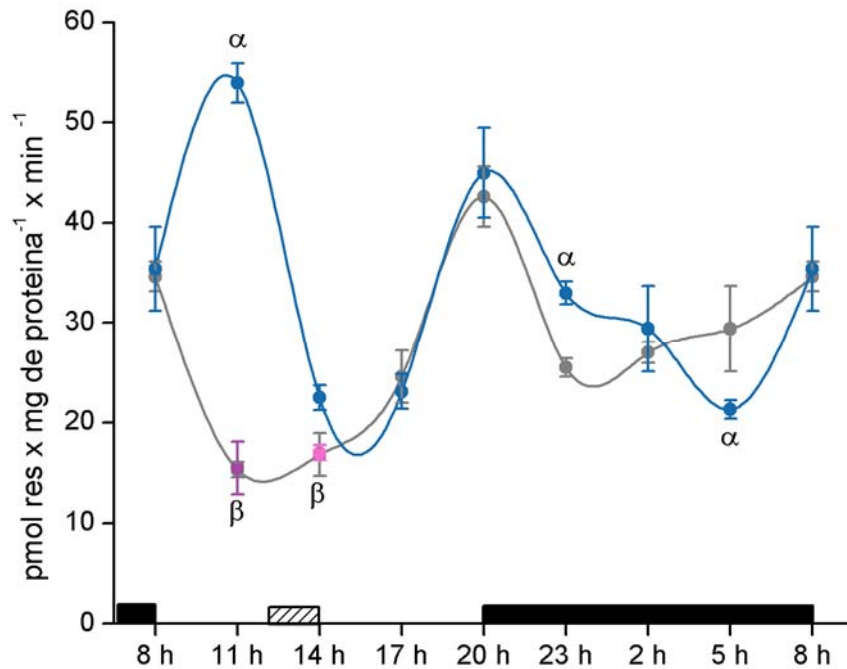


Figura 20. Variación temporal (●) y efecto de la restricción de alimento (●), período de ayuno (●) y realimentación (●) sobre el metabolismo de EROD en de hígado de rata. Las cajas negras indican el intervalo de tiempo que la luz permanencia apagada, mientras que la caja con rayas en diagonal al período de acceso al alimento en el grupo con restricción. Los datos se expresan en pmol de resorufina por mg de proteína por min. Cada punto corresponde al promedio de tres lecturas de cuatro ratas +/- E.E.  $\alpha P \leq 0.05$  con respecto al control del mismo horario y  $\beta P \leq 0.05$  con respecto al grupo de restricción del mismo horario.

En la figura 21 se presenta la tasa de metabolismo de resorufina a EROD por Cyp1a1 en la fase luminosa y oscura del grupo control y del grupo con restricción de alimento; así como el metabolismo total de cada grupo. Al comparar los datos obtenidos en cada fase de los grupos se refleja particularmente un aumento en la actividad de la fase luminosa del grupo con restricción de alimento con respecto a la fase luminosa del grupo control. Mientras que los promedios muestran un aumento de la actividad en el grupo de restricción de alimento.

Si bien los valores obtenidos del metabolismo de resorufina a EROD no coinciden con el patrón temporal de Cyp1a1 observado en este trabajo, es posible que la dinámica de los demás componentes involucrados en la funcionalidad de Cyp1a1 esté presentando cambios que no fueron medidos en este trabajo.

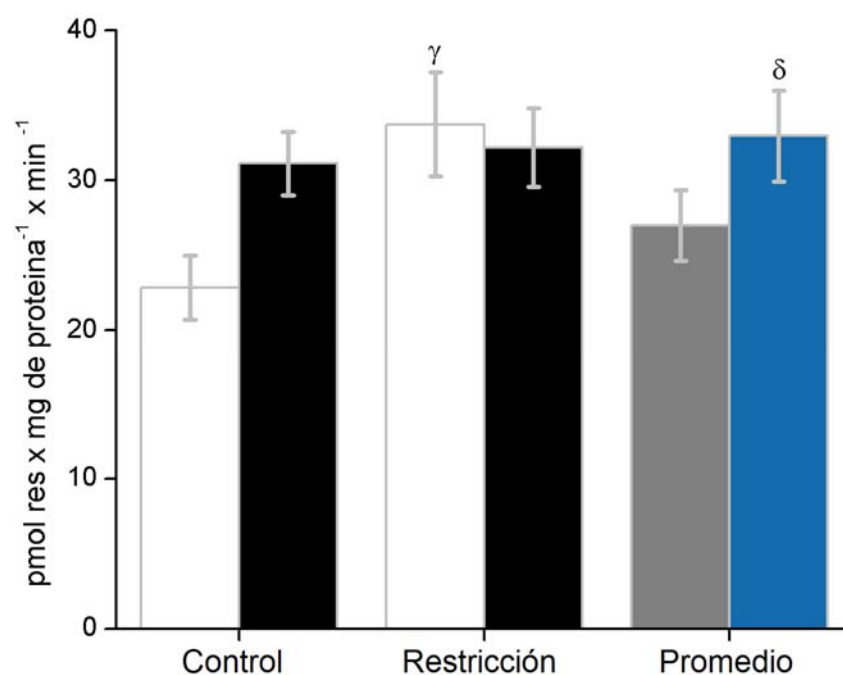


Figura 21. Cada barra corresponde al promedio +/- E.E. de cada uno de los registros en fase luminosa (barra blanca) y fase oscura (barra negra) de cada grupo; y el promedio global de los valores obtenidos en el grupo control (barra gris) y en el grupo de restricción (barra azul). γ  $P \leq 0.05$  con respecto al control de la misma fase y δ  $P \leq 0.05$  con respecto al control de la misma fase.

En la figura 22 se presenta el patrón temporal del metabolismo de resorufina a MROD por medio de Cyp1a2. En el grupo control se determinó una variación temporal con una tendencia de mayor actividad durante el final de la fase oscura. De forma interesante, el metabolismo de MROD en el grupo con restricción de alimento mostró un patrón bifásico con los picos más altos a las 8 y 20 h, de los cuales solo las muestras de las 20 h son diferentes con respecto al control. Adicionalmente, en los horarios de las 11, 17 y 2 h se observó mayor actividad con respecto al grupo control. Por otro lado, el grupo de ayuno y realimentación presentó la misma tendencia que el grupo control, sin embargo, solo el grupo de ayuno mostró diferencia con respecto al grupo de restricción.

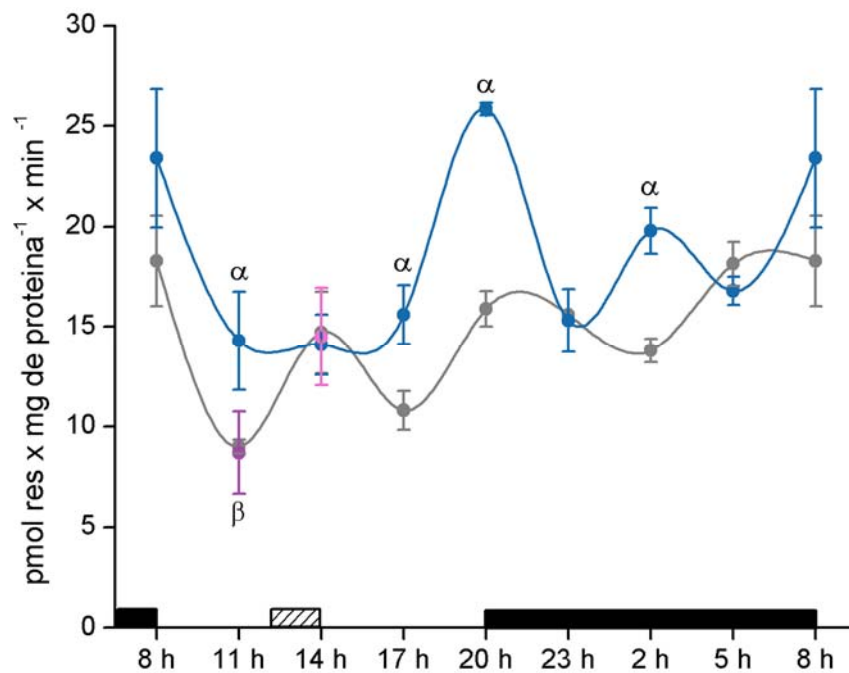


Figura 22. Variación temporal (●) y efecto de la restricción de alimento (●), período de ayuno (●) y realimentación (●) sobre el metabolismo de MROD en de hígado de rata. Las cajas negras indican el intervalo de tiempo que la luz permanencia apagada, mientras que la caja con rayas en diagonal al período de acceso al alimento en el grupo con restricción. Los datos se expresan en pmol de resorufina por mg de proteína por min. Cada punto corresponde al promedio de tres lecturas de cuatro ratas +/- E.E.  $\alpha$   $P \leq 0.05$  con respecto al control del mismo horario y  $\beta$   $P \leq 0.05$  con respecto al grupo de restricción del mismo horario.

En la figura 23 se presenta la tasa de metabolismo de resorufina a MROD por Cyp1a2 en la fase luminosa y oscura del grupo control y del grupo con restricción de alimento; así como el metabolismo total de cada grupo. Al considerar los valores de las fases de cada grupo se observó un aumento en la actividad del grupo de restricción en la fase luminosa del grupo de restricción con respecto a la fase luminosa del grupo control. Mientras que los promedios de los grupos reflejan que el grupo de restricción de alimento una mayor actividad con respecto al grupo control.

Los patrones del metabolismo de MROD por la fracción microsomal no hacen correlación con los observados en la inmunodetección, es posible que los cambios determinados en la proteína no sean suficientes para reflejar un cambio en el metabolismo; así como alguno de los componentes involucrados en el metabolismo de MROD.

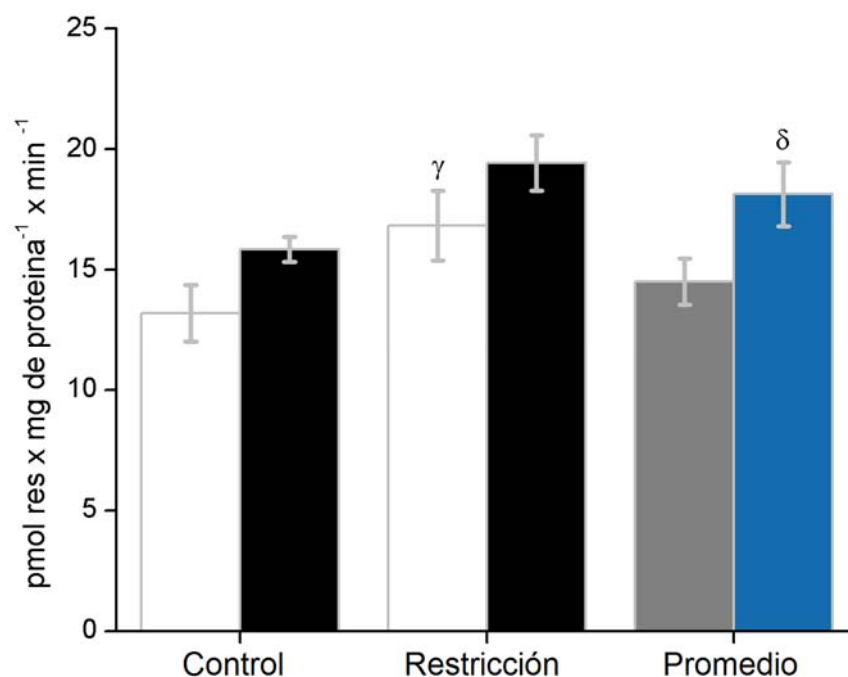


Figura 23. Cada barra corresponde al promedio  $\pm$  E.E. de cada uno de los registros en fase luminosa (barra blanca) y fase oscura (barra negra) de cada grupo; y el promedio global de los valores obtenidos en el grupo control (barra gris) y en el grupo de restricción (barra azul).  $\gamma$   $P \leq 0.05$  con respecto al control de la misma fase y  $\delta$   $P \leq 0.05$  con respecto al control de la misma fase.



## VII Discusión

Durante un protocolo de restricción de alimento, las ratas pasan de una condición *Ad libitum* a una nueva condición, en la cual los animales deben cambiar su conducta habitual de alimentación en la etapa nocturna, promoviendo el ajuste de los parámetros fisiológicos a la nueva condición de acceso al alimento. Lo anterior promueve ciclos de ayuno-realimentación; donde en la primera etapa se da durante el acceso al alimento el cual promueve las adaptaciones fisiológicas para movilizar la energía almacenada y activar la búsqueda de comida en la segunda se agrupan los procesos fisiológicos que se encargan de reponer los depósitos de energía y conductas asociadas al desarrollo y reproducción (Froy, 2013).

En esta reorganización los genes reloj se desacoplan al ritmo determinado por el SCN; para ajustarse a los tiempos de acceso al alimento (Aguilar-Roblero y Díaz-Muñoz, 2010), por lo que se ha propuesto la existencia de un oscilador sincronizado por alimento, el cual es una propiedad que surge cuando se presentan ciclos diarios de ayuno-realimentación; sin embargo, su localización anatómica es poco clara.

Otra condición implícita nuestro protocolo de restricción de alimento es una disminución en la ingesta de calorías totales (Arellanes-Licea E. *et al.*, 2014); esto puede ser debido a los tiempos de exposición al alimento; sin embargo se ha observado en nuestro grupo de trabajo que los animales con acceso a 2 h de alimento solo emplean la primera hora para alimentarse, mientras que en la segunda hora el consumo de alimento es escaso.

En este trabajo utilizamos en primera instancia la expresión de mRNA de AHR y Arnt además de la proteína de AHR para determinar si la restricción de alimento modificaba el patrón temporal de la vía de señalización. También se consideró como resultado de la activación de la vía de AHR la expresión de Cyp1a, que se evaluó a través del mRNA, proteína y actividad.

Como ya está documentado, el AHR presenta variación temporal a nivel de mRNA (Huang *et al.*, 2002) y de proteína (Richardson *et al.*, 1998); y ya que la expresión de múltiples genes que presentan variación temporal, su patrón se modifica por un protocolo de restricción de alimento; en este trabajo decidimos evaluar el efecto de la restricción de alimento sobre la variación temporal de 24 h del mRNA de AHR y Arnt, así como la inmunodetección de AHR.

La gran mayoría de los genes modulados por reloj presentan en su región promotora una o más E-box (Westermarck y Herzel *et al.*, 2013). El gen AHR presenta en su promotor una E-box (Garrison y Deninson, 2000) y posiblemente de esta derive su patrón temporal en el grupo control (Tanimura *et al.*, 2011); sin embargo, el patrón determinado en nuestro trabajo difiere con lo observado por Huang *et al.*, 2002; esto puede ser derivado por los diferentes tiempos de muestreo, así como las diferencias entre cepas de ratas. Actualmente, esta poco descrita la vía de inducción del AHR, sin embargo, se han reportado elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE), a cAMP (CRE), a antioxidantes (ARE) y dioxinas (DRE) (Garrison y Deninson, 2000; Shin *et al.*, 2007) en su región promotora; lo que sugiere que la vía de expresión del gen AHR depende de más de un factor para promover su transcripción.

Al realizar la inmunodetección de AHR, el grupo control no presentó ritmo, lo cual contrasta con lo observado por Richardson *et al.*, 1998; esto puede derivar de la diferencia entre el sexo del modelo biológico empleado en cada trabajo, ya que se ha observado que múltiples genes presentan variación por los cambios a través de las fluctuaciones hormonales de las hembras.

Durante el ciclo de ayuno y realimentación se provocan cambios en el estado redox de NAD(H) y NADP(H), con ello se altera la afinidad de CLOCK/BMAL1 por el DNA, generando cambios en la expresión de los genes modulados por reloj (Ramsey K. *et al.*, 2009; Nakahata Y. *et al.*, 2009), caso que no se refleja en el patrón temporal del AHR en el grupo con restricción de alimento. Por otro lado, una de las características de la restricción del alimento es la presencia de un pico de glucocorticoides circulantes durante la actividad anticipatoria al alimento (Díaz-Muñoz *et al.*, 2000), proceso que puede activar al receptor de glucocorticoides y por ende a los genes que depende de este; sin embargo, la presencia de un GRE en el promotor de AHR parece no ser suficiente para ejercer influencia sobre su transcripción. Lo anterior sugiere que la variación temporal de AHR no es modulada por la restricción de alimento y posiblemente esta sigue acoplada a los patrones de luz/oscuridad.

A nivel de proteína, AHR no presentó cambio con respecto al grupo control, lo cual se mantiene congruente con los resultados observados a nivel de mRNA, reforzando la idea de que la expresión de AHR no se ve modificada por un protocolo de restricción de alimento.

Al evaluar la presencia del mRNA de Arnt se observó que este presenta ritmo y una marcada transcripción en la fase de oscuridad, lo cual contrasta con la alta transcripción de Arnt en la fase luminosa observada por Huang *et al.*, 2002; y esto de igual forma puede derivar de las diferencias entre los tiempos de muestreo, así como las diferencias entre la cepa Wistar (empleada en este trabajo) y la cepa Sprague-Dawley (Floreani *et al.*, 2012).

Poco se ha descrito sobre los factores que modula la expresión de Arnt, sin embargo, el cambio en la transcripción de Arnt por la restricción de alimento sugiere que su expresión puede ser modulada por algún factor involucrado durante el proceso de alimentación. Por otro lado, el Arnt puede formar heterodímero con el factor de hipoxia (HIF) para promover la eritropoyesis (McIntosh *et al.*, 2010), y ya que durante el período previo a la exposición al alimento aumenta el flujo sanguíneo este puede estar más involucrado en este proceso.

Para determinar si los genes dependientes de AHR eran activados durante el protocolo de restricción de alimento, se decidió evaluar la expresión de la familia Cyp1a, ya que son genes que tras la activación de la vía de AHR aumentan sus niveles de expresión, por la presencia de DRE en sus promotores (Fujii-Kuriyama Y., Mimura J., 2005); y para ello, se optó por la evaluación del mRNA y de proteína.

El patrón temporal de Cyp1a1, mostró un perfil similar a lo previamente reportado en hígado (Huang *et al.*, 2002) y en pulmón (Tanimura *et al.*, 2011); donde se observa una mayor transcripción durante la fase de oscura. A nivel de proteína, Cyp1a1 mostró una variación temporal de 24 h, con una mayor presencia durante la fase oscura en los horarios de 2 y 5 h, lo cual es consistente con los puntos más altos de transcripción de Cyp1a1 observados a las 23 y 2 h en este trabajo.

Durante el protocolo de restricción de alimento, los puntos más altos de transcripción de Cyp1a1 se observaron durante la fase luminosa (período en el cual el grupo tenía acceso al alimento); lo cual muestra claramente un cambio de fase en la expresión de Cyp1a1. Mientras que la inmunodetección mostró variación temporal, sin embargo, no reflejo un cambio en particular con un punto de muestreo del grupo control; sugiriendo que los cambios observados en el mRNA de Cyp1a1 a las 11, 14 y 17 h sean insuficientes para reflejarse en la inmunodetección.

Los cambios observados en la transcripción de *Cyp1a1* pueden ser derivados de la activación del AHR a través de un ligando endógeno; que sea sintetizado durante la preparación del organismo para el acceso al alimento, y en cuanto concluye la alimentación, este disminuye, así mismo decae la activación de AHR y como consecuencia la expresión de *Cyp1a1* para posteriormente mostrar la misma tendencia que se observó en el grupo control.

Los candidatos para ser el ligando que promueva la transcripción de *Cyp1a1*, son los metabolitos del triptófano, ya que se ha observado que pueden ser activadores de AHR (Pagliuso *et al.*, 1998), modular la expresión de *Cyp1a1* en cultivo celular (Wie *et al.*, 2000), en ratón y en pez cebra. Además, se ha observado que estos pueden ser sintetizados por bacterias presentes en el tracto gastrointestinal (Zelante *et al.*, 2013), y por fotooxidación (Diani-Moore *et al.*, 2006). Particularmente, la triptamina ha mostrado ser un ligando del AHR cuya activación depende de la monoamino oxidasa (MAO) (Vikström Bergander *et al.*, 2012), y particularmente la MAO presenta una mayor abundancia 4 horas antes del acceso al alimento durante un protocolo de restricción de alimento (Valdez-Fuentes *et al.*, 2015), lo cual podría originar una abundancia de triptamina en los horarios subsecuentes, promoviendo la abundancia de esta en el hígado, y por ende, la activación de AHR con la subsecuente transcripción de *Cyp1a1*.

Por otro lado, *Cyp1a2* mostró variación temporal, con una mayor transcripción en la fase oscura (23 h), manteniendo la tendencia observada en *Cyp1a1*. A nivel de proteína, *Cyp1a2* mostró variación temporal con una particular abundancia durante la fase oscura, reflejando la misma tendencia observada en el mRNA de este trabajo.

Particularmente se observó una mayor magnitud del transcrito y proteína de Cyp1a2 durante todo el ciclo de 24 h con respecto a Cyp1a1; lo cual puede ser reflejo de su expresión constitutiva en hígado (Corchero *et al.*, 2001), esto debido a que el promotor de Cyp1a2 presenta elementos de respuesta para el factor nuclear hepático tipo 1, 3 y 4 (Corchero *et al.*, 2001); lo que puede generar un patrón de expresión diferente a Cyp1a1.

En el grupo con restricción de alimento la transcripción de Cyp1a2 presentó variación temporal con un punto máximo de transcripción a las 8 h, mientras que a nivel de proteína se observaron cambios en los horarios de 11, 14 y 17 h con respecto al grupo control. El origen de estas elevaciones puede corresponder al punto máximo de RNA Cyp1a2 a las 8 h y a los subsecuentes procesos de traducción que requiere para su incorporación al retículo endoplasmático.

Para evaluar si la funcionalidad de la subfamilia Cyp1a se ve modificada por el protocolo de restricción de alimento, se empleó EROD como sustrato indicativo para la actividad de Cyp1a1; mientras que MROD como sustrato indicativo para Cyp1a2.

De forma interesante, el patrón temporal de la *O*-desalquilación de EROD así como el de MROD no es consistente con el patrón observado en la presencia de Cyp1a1 y Cyp1a2 respectivamente, esto puede ser debido a que EROD, es una prueba selectiva para Cyp1a1 cuando las muestras derivan de animales tratados con un ligando de AHR (Burke *et al.*, 1994); sin embargo, no descartamos que este pico de actividad pueda derivar de un aumento en la cantidad de Cyp1a1 que no fue suficiente para ser observada en la inmunodetección; mientras que la *O*-desalquilación de MROD es una prueba indicativa cuando los microsomas derivan de ratas que no se hayan tratado con algún ligando de AHR (Burke *et al.*, 1994).

Si bien la catálisis de EROD y MROD depende de Cyp1a1 y Cyp1a2, respectivamente, ambos requieren del aporte de 2 electrones derivados de NADPH o NADH; estos electrones son transportados al Cyp1a1 y Cyp1a2 a través de la enzima citocromo P450 reductasa (CPR) (Munro *et al.*, 2006); por lo que CPR cumple una función importante en las propiedades catalíticas de Cyp1a.

Como ya está documentado, la relación de CYP450:CPR es 1:20 (Peterson *et al.*, 1970) y se ha observado que ratones que no expresan a CPR en hígado la actividad de EROD no es detectable (Arlt *et al.*, 2008); y en microsomas reconstituidos con diferentes concentraciones de CPR muestran cambios en la producción de los metabolitos de Benzo [a] Pireno (Stiborová *et al.*, 2014); esto sugiere que la variación en cantidad de CPR puede afectar la actividad de Cyp1a1. En el estudio realizado por Hirao *et al.*, 2006 se determinó que los niveles de mRNA de CPR presentan un cambio de fase en ratas con acceso al alimento en la fase luminosa; por lo que no descartamos que la abundancia de esta no sea constante durante el periodo de 24 h. Otro componente que influye en la actividad microsomal de Cyp1a1, es el citocromo b<sub>5</sub>, del cual su abundancia relativa en microsomas reconstituidos con diferentes concentraciones del citocromo b<sub>5</sub>, promueve una mayor producción de metabolitos de Benzo [a] Pireno (Stiborová *et al.*, 2014). Por lo anterior sugerimos que los cambios temporales en el metabolismo de EROD y MROD, dependen particularmente de la relación CYP1A: CPR: cit b<sub>5</sub>.

Si bien, nuestro protocolo de restricción de alimento implica una ingesta menor de calorías con respecto a grupo control y esta repercute en la talla del animal (Arellanes-Licea E. *et al.*, 2014), trabajos sobre la vía de AHR han demostrado que dietas hipocalóricas no afecta la transcripción de *AHR*; (Zidong Donna Fu, y Klaassenba C. 2014), mientras que dietas hipoproteicas no afectan el metabolismo de EROD (García G. Aguirre-Espinosa, 2014); como lo demostrado en este trabajo.

Particularmente los datos obtenidos en el grupo de ayuno y realimentación, en cada parámetro evaluado en este trabajo, no presentaron cambio con respecto al grupo control, lo que indica que los cambios de fase observados en Cyp1a son promovidos por la constante exposición a los períodos de ayuno-realimentación.

Nuestros resultados muestran que la abundancia del AHR a nivel de transcripcional no se refleja a nivel de proteína los cuales no son modificados por la restricción de alimento, sin embargo, los genes blanco de AHR (Cyp1a) presentaron cambios de fase en sus patrones temporales, sugiriendo que la vía de señalización de AHR, está siendo activada posiblemente por algún endobiótico, presentando la idea de una función endógena dentro de la alimentación, adicional a la respuesta a xenobióticos.

#### VIII Conclusiones

- El protocolo de restricción de alimento modifica el patrón temporal de mRNA de AHR.
- En ratas macho de la cepa Wistar el AHR no presenta variación a lo largo del día.
- La variación temporal de Arnt presenta un cambio de fase durante el protocolo de restricción de alimento.
- El protocolo de restricción de alimento promueve el cambio de fase del mRNA y proteína de Cyp1a1.
- El protocolo de restricción de alimento promueve el cambio de fase en el patrón temporal de Cyp1a2 a nivel de mRNA y proteína.
- Los patrones temporales del metabolismo de EROD y MROD, no coinciden con los patrones de proteína de Cyp1a1 y Cyp1a2, respectivamente.



## IX Perspectivas

- Determinar el ligando que favorece la expresión de *Cyp1a1* durante la restricción de alimento, a través de la detección de diferentes metabolitos del triptófano por medio de HPLC.
- Determinar si la inducción de *Cyp1a* es producto de la activación de AHR, a través de un ensayo de cambio de movilidad electroforética.
- Determinar si el perfil temporal de *Cyp1a* durante la restricción de alimento, se mantiene cuando los animales son mantenidos en periodos de oscuridad constante.
- Determinar si el cambio de fase de *Cyp1a* se presenta en animales con mutación en genes reloj.

## X Referencias

Abel J. y Haarmann-Stemmann T. (2010) An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology. *Biological Chemistry*. **391**, 1235-1248.

Aguilar-Roblero R. y Díaz-Muñoz M. (2010) Chronostatic adaptations in the liver to restricted feeding: The FEO as an emergent oscillator. *Sleep and Biological Rhythms* **8**, 9–17.

Arellanes-Licea E., Báez-Ruiz A, Carranza M., Arámburo C., Luna M., Díaz-Muñoz M. (2014) Daily patterns and adaptation of the ghrelin, growth hormone and insulin-like growth factor-1 system under daytime food synchronisation in rats. *J Neuroendocrinol*. **26(5)**, 282-295.

Bassier B. (2011) Cell communication. En *Campbell Biology* 9ª edición (J. Reece, L. Urry, M. Cain, S. Wasserman, P. Minorsky y R. Jackson). E.U.A. pp. 1472.

Boulamery-Velly A., Simon N., Vidal J., Mouchet J. Brougerolle B. (2005) Effects of three-hour restricted food access during the light period on circadian rhythms of temperature, locomotor activity, and heart rate in rats. *Chronobiol. Int.* **22**, 489-498.

Brauze D., Widerak M., Cwykel J., Szyfter K. y Baer-Dubowska W. (2006) The effect of Aryl hydrocarbon receptor ligands on the expression of AhR, ARNT, Hif1, CYP1A1 and NQO1 genes in rat liver. *Toxicology Letters*, **167**, 212-220.

Burke M., Thompson S., Weaver R., Wolf C. y Mayer R. (1994) Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver. *Biochem. Pharmacol.* **48**, 923-936.

Busbee P., Rouse M., Nagarkatti M. y Nagarkatti P. (2013) Use of natural AhR ligands as potential therapeutic modalities against inflammatory disorders. *Nutrition Reviews*. **71**, 353-369.

Carver L. y Bradfield C. (1997) Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel interaction of the homolog *in vivo*. *Journal of biological chemistry*. **272**, 11452-11456.

Carver L., Jackiw V. y Bradfiels C. (1994) The 90kDa heat shock protein is essential for Ah receptor signaling in a yeast expression system. *Journal of Biological Chemistry*. **269**, 30109-30112.

Cassone V. y Stephan F. (2002) Central and peripheral regulation of feeding and nutrition by the mammalian circadian clock: implications for nutrition during manned space flight. *Nutrition* **18**, 814-819.

Comperatore C. y Sthephan F. (1987) Entrainment of duodenal activity to periodic feeding, *J. Biol. Rhythms* **2**, 227-242.

Corchero J., Pimprale S., Kimura S. y Gonzalez J. (2001) Organization of CYP1A cluster on human chromosome 15: implications for gene regulation. *Pharmacogenetics* **11**, 1-6.

Damiola F., Le Minh N., Preitner N., Kornmann B., Fleury-Olela F. y Schibler U. (2000) Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* **14**, 2950-2961.

Denison M. y Nagy S. (2003) Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **43**, 309-334.

Denison M., Fisher J. y Whitlock J. (1988) Inducible, receptor-dependent protein-DNA interactions at a dioxin-responsive transcriptional enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **85**, 2528-2532.

Diani-Moore S., Labitzke E., Brown R., Garvin A., Wong L. y Rifkind B. (2006) Sunlight generates multiple tryptophan photoproducts eliciting high efficacy CYP1A induction in chick hepatocytes and *in vivo*. *Toxicological Sciences* **90(1)**, 96-110.

Díaz-Muñoz M, Vázquez-Martínez O, Aguilar-Roblero R, (2000) Anticipatory changes in liver metabolism and entrainment of insulin, glucagon, and corticosterone in foodrestricted rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **279**, R2048–R2059.

Eckel-Mahan K. y Sassone-Corsi P. (2013) Metabolism and the circadian clock converge. *Physiol. Rev.* **93**, 107-135.

Floreani M. Gabbia D., BArriero M., De Martin S. y Palatini P. (2012) Differential inducing effect of benzo[a]pyrene on gene expression and enzyme activity of cytochrome P450 1A1 and 1A2 in Sprague-Dawley and Wistar rats. *Drug Metab, Pharmacokinet.* **27**, 640-652.

Froy O. (2013) Circadian aspects of energy metabolism and aging. *Ageing Research Reviews* **12**, 931-940.

- Fujii-Kuriyama Y. y Mimura J. (2005) Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. *Biochem. Biophys. Comm.* **338**, 311-317.
- Furness S., Lees M. y Whitelaw M. (2007) The dioxin (aryl hidrocarbon) receptor as a model for adaptative responses of bHLH/PAS transcription factors. *FEBS letters.* **581**, 3616-3625.
- Gallagher S. (2007) One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. *Current protocols in cell biology. John Wiley & Sons, Inc.* 6.1.1-6.1.38.
- Garrison P. y Denison M. (2000) Analysis of the murine AHR gene promoter. *J. Biochem. Mol. Tox.,* **1**, 1-10.
- García G. y Espinosa-Aguirre J. (2014) Efecto de restricción proteica sobre el CYp3A2 y citosinas proinflamatorias (Inédito).
- Gekakis N., Staknis D., Nguyen H., Davis F., Wilsbacher L., King D., Takahashi J. y Weitz, C. (1998) Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* **280**, 1564–1569.
- Gooley J., Schomer A. y Saper, C. (2006) The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms. *Nat. Neurosci.* **9**, 398–407.
- Green C., Douris N., Kojima S., Strayer C., Fogerty J., Lourim D., Keller S. y Beshare J. (2007) Loss of nocturnin, a circadian deadenylase, confers resistance to hepatic stwatosis and diet-induce obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **104**, 9888-9893.
- Gu Y., Hogenesch J. y Bradfield A. (2000) the PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**, 519-561.

Hirao J., Arakawa S., watanabe K., Ito K. y Furukawa T. (2006) Effects of restricted feeding on daily fluctuations of hepatic functions including P450 monooxygenase activities in rats. *The Journal of Biological Chemistry*. **281**, 3165-3171.

Hirota T., Fukada Y. (2004) Resetting mechanism of central and peripheral circadian clocks in mammals. *Zoolog. Sci.* **21**, 359-368.

Honma K., Honma S. y Hiroshige T. (1983) Critical role of food amount for prefeeding corticosterone peak in rats. *Am. J. Physiol.* **245**, R339-R344.

Horikawa K., Minami Y., Lijima M., Akiyama M. y Shibata S. (2005) rapid damping of food-entrained circadian rhythm of clock gene expression in clock-defective peripheral tissues under fasting conditions. *Neuroscience* **134**, 335-343.

Huang P., Ceccatelli S y Rannung A. (A study on diurnal mRNA expression of CYP1A1, AHR, ARNT and PER2 in rat pituitary and liver. *Envoromental Toxicology and Pharmacology* **11**, 119-126.

Ikuta T., Eguchi H., Tachibana T., Yoneda Y. y Kawajiri K. (1998) Nuclear localization and export signals of the human aryl hidrocarbon receptor. *Journal of Biological Chemistry*. **62**, 806-816.

Katsanou E., Kyriakopoulou K., Emmanouil C., Fokiaslakis N., Skaltsounis A. y Machera K. (2014) Modulation of CYP1A1 and CYP1A2 hepatic enzymes after oral administration of *Chios Mastic Gum* to male wistar rats. *PLOS ONE*, **9(6)**, e100190.

Kawajiri K. y Fujii-Kuriyama (2007) Cytochrome P450 gene regulation and physiological functions mediated by the aryl hidrocarbon receptor. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **464**, 207-212.

Kewley R., Whitelaw M. y Champman-Smith A. (2004) The mammalian basic-helix-loop/PAS family of transcriptional regulators. *The international Journal of Biochemistry and Cell Biology*. **36**, 189-204.

Kitada M., Taenda M., Itahashi K. y Kamataki T. (1991) Four forms of cytochrome P450 in human fetal liver: purification and their capacity to activate promutagens. *Jpn. J. Cancer Res.* **82**, 426-432.

Kohsaka A., Bass J. (2007) A sense of time: how molecular clocks organize metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* **18**, 4-11.

Kume, K., Zylka M., Sriram S., Shearman L., Weaver D., Jin X., Maywood, E., Hastings M. y Reppert S. (1999) mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* **98**, 193-205.

Lindsey S. y Papoutsakis E. (2012) The evolving role of the aryl hydrocarbon receptor (AHR) in the normophysiology of hematopoiesis. *Stem Cell Rev.* **8**(4), 1223-1235.

Livak K. y Schmittgen T. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time Quantitative PCR and the 2-T method. *Methods*, **25**, 402-408.

Ma Q. y Whitlock J. (1997) A novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Journal of Biological Chemistry*. **272**, 8878-8884.

McIntosh B., Hogenesch J. y Bradfield C. (2010) Mammalian Per-Arnt-Sim proteins in environmental adaptation. *Annu. Rev. Physiol.* **72**, 625-45.

Meyer B., Pray-Grant M., Vandel Heuvel J. y Perdew G. (1998) Hepatitis B virus X-associated protein 2 is a subunit of the unliganded aryl hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity. *Molecular and Cellular Biology*. **18**, 978-988.

Mukai M., Lin T., Peterson R., Cooke P. y Tischkau S. (2008) Behavioral rhythmicity of mice lacking AhR and attenuation of light-induced phase shift by 2,3,7,8-tetrachlorosibenzo-*p*-dioxin. *Journal of Biological Rhythms*, **23(3)**, 200-210.

Munro A., Girvan H. y Mclean K. (2007) Variations on a (t)heme-novel mechanisms, redox partners and catalytic functions in the cytochrome P450 superfamily. *Nat. Prod. Rep.* **24**, 585-609.

Murray A. (2004) Recycling the cell cycle: Cyclins revisited. *Cell* **116**, 221–234.

Nakahata Y., Laluzova M. Sahar S., Astarita G., Kaluzova M. y Sassone-Corsi P. (2009) Circadian control of the NAD<sup>+</sup> salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science* **9**, 654-657.

Operaña T., Nguyen N., Chen S., Beaton D., Tukey R. (2007) Human CYP1A1<sup>GFP</sup> expression in transgenic mice serves as a biomarker for environmental toxicant exposure. *Toxicological Sciences* **95**, 98-107.

Pagliuso S., Rogers W., Tullis K., Deidel S., Cenjin P., Brouwer A. y Deninson M. (1998) Activation of the Ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites. *Biochemistry* **37**, 11508-11515.

Panda S., Antoch M., Miller B., Su A., Schook A., Straume M., Schultz P., Kay S., Takahashi J. y Hogenesch J. (2002) Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* **109**, 307–320.

Peterson J., Ebel R., O'Keeffe D., Matsubara T, and Estabrook R. (1976) Temperature dependence of cytochrome P-450 reduction. A model for NADPHcytochrome P-450 reductase:cytochrome P-450 interaction. *J. Biol. Chem.* **251**, 4010– 4016.

Poland A., Glover E. y Kende A. (1976) Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin by hepatic cytosol. *Journal of Biological Chemistry.* **251**, 4936-4946.

Pollenz R., Sattler C. y Poland A. (1994) The aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein show distinct subcellular localizations in Hepa 1c1c7 cells by immunofluorescence microscopy. *Molecular Pharmacology*, **45**, 428 438.

Ramsey K., Yooshiro J., Brace C., Abrassart D., Kobayashi Y., Marcheva B., Hong H., Chong J. Buhr E., Lee C., Takahashi J. Imai S. y Bass J. (2009) Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD<sup>+</sup> biosynthesis. *Science* **324**, 651-654.

Richarson V. S Antostefano M y Birnbaum L. (1998) Daily cycle of bHLH\_PAS protein, Ah receptor and Arnt, in multiple tissues of female Sprague-Dawley rats. *Biochemical and Biophysical research communications* **252**, 225-231.

Sadek C. y Allen.Hoffmann B. (1994) Suspension mediated induction of heap 1c1c7 Cyp1a-1 expression is dependent on the Ah receptor signal transduction pathway. *Journal of Biological Chemistry.* **269**, 31505-31509.

Saito M., Murakami E., Suda M., (1976) Circadian rhythms in disaccharidases of rat small intestine and its relation to food intake. *Biochim. Biophys. Acta* **421**, 177-17.

Sangoram A., Saez L., Antoch M., Gekakis N., Staknis D., Whiteley A., Fruechte E., Vitaterna M., Shimomura K., King D., Young M., Weitz C. y Takahashi J. (1998) Mammalian circadian autoregulatory loop: a timeless ortholog and mPer1 interact and negatively regulate CLOCK-BMAL1-induced transcription. *Neuron* **21**, 1101–1113.



Shen H., Robertson L. y Ludewig G. (2015) Regulatory effects of dioxin-like and non-dioxin-like PCBs and other AhR ligands on the antioxidant enzymes paraoxonase 1/2/3. *Environ. Sci. Pollut. Res.* DOI 10.1007/s11356-015-4722-1.

Shimada T., Yamazaki H., Mimura M., Wakamiya L., Ueng Y., Gengerich P. y Inui Y. (1995) Characterization of microsomal cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of xenobiotic chemicals in human fetal liver and adults lungs. *Drug Metab. Disp.* **24**, 515-522.

Shin S., Wakabayashi N., Misra V., Biswal S., Lee G., Agoston E., Yamamoto M. y Kensler T. (2007) NRF2 modulates aryl hydrocarbon receptor signaling: influence on adipogenesis. *Mol Cell. Biol.* **27**, 7188-7197.

Soshilov A. y Denison M. (2008) Role of the Per/Arnt/Sim domains in ligand-dependent transformation of the aryl hydrocarbon receptor. *Journal of biological Chemistry.* **283**, 32995-33005.

Stephan F. (2002) The other circadian system: food as a Zeitgeber. *J. Biol. Rhythms.* **17**, 284-292.

Stiborová M., Monserová M., Cerná V., Indra R., Dracinsky M., Sulc M., Henderson C., Wolf C., Schmeiser H., Phillips H., Frei E. y Arlt V. (2014) Cytochrome b5 and epoxide hydrolase contribute to Benzo[a]pyrene-DNA adduct formation catalyzed by cytochrome P450 1A1 under low NADPH: P450 oxidoreductase conditions. *Toxicology* **318**, 1-12.

Tanimura N., Kusunose N., Matsunaga N., Koyanagi S. Ohdo S. (2011) Aryl hydrocarbon receptor-mediated *Cyp1a1* expression is modulated in a CLOCK-dependent circadian manner. *Toxicology* **290**, 203-207.

Valdés-Fuentes M., Vera-Rivera G., De Ita-Pérez D., Méndez I., Miranda M. y DíazMuñoz (2015) Effect of daytime-restricted feeding in the daily variations of liver metabolism and blood transport of serotonin in rat. *Physiological Reports*, **3(5)**, e12389.

Verma M., Pink M., Rettenmeier A. y Schmitz-Spanke (2012) Review on proteomic analyses of benzo[a]pyrene toxicity. *Proteomics* **12**, 1731-1755.

Vickström Bergander L., Cai W., Klocke B., Seifert M. y Pongratz I. (2012) Tryptamine serves as a proligand of the AhR transcriptional pathway whose activation is dependent of monoamine oxidase. *Mol. Endocrinol.* **26(9)**, 1542-1551.

Wei Y., Bergander L., Rannung U. Rannung A. (2000) Regulation of CYP1A1 transcription via the metabolism of tryptophan-derived 6-formylindolo[3,2-b]carbazole. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **383**, 99-107.

Westermarck P. y Herzog H. (2013) Mechanism for 12 h rhythm generation by the circadian clock. *Cell Reports*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2013.03.013>.

Whitelaw M., McGuire J., Picard D., Gustafsson J. y Poellinger L. (1995) Heat shock protein HSP90 regulates dioxin receptor function *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **92**, 4437-4441.

Xu C., Wang C., Krager S., Bottum K. y Tischkau S. (2013) Aryl hydrocarbon receptor activation attenuates Per1 gene induction and influences circadian clock resetting. *Toxicological Sciences* **132(2)**, 368-278.

Yamazaki K., Teraoka H., Dong W., Stegeman J. y Hiraga T. (2002) cDNA cloning and expressions of cytochrome P450 1<sup>a</sup> in zebra fish embryos. *Vet. Med. Sci.* **9**, 829-833.

Zelante T., Ianniti R., Fallarino F., GArgaro M., De Luca A., Moretti S., Bartoli A. y Romani L. (2014) Tryptophan feeding of the IDO1-AhR axis in host-microbialsymbiosis. *Frontiers in immunology* **5**, 1-4.

Zeldin D. y Seubert J. (2008) Structure, mechanism, and regulation of cytochromes P450. En *Molecular and biochemical toxicology* 4ª edición (R. Smart, R. Hodgson, Ed). E.U.A. pp. 901.

Zheng B., Albrecht U., Kaasik K., Sage M., Lu W., Vaishnav S., Li Q., Su, Z., Eichele G., Bradley A. y Lee, C. C. (2001) Non redundant roles of the mPer1 and mPer2 genes in the mammalian circadian clock. *Cell* **105**, 683–694.

Zidong Donna Fu, y Klaassenba C. (2014) Short-term Calorie Restriction Feminizes the mRNA Profiles of Drug Metabolizing Enzymes and Transporters in Livers of Mice. *Toxicol Appl Pharmacol* **274(1)**, 137-146.