



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Efecto de la restricción de alimento sobre el daño
hepático inducido por benzo [a] pireno

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

Oscar Samuel Ávila Rosales

Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dr. Mauricio Díaz Muñoz
Instituto de Neurobiología

Dra. Regina Dorinda Montero Montoya
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Ciudad de México. Enero, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



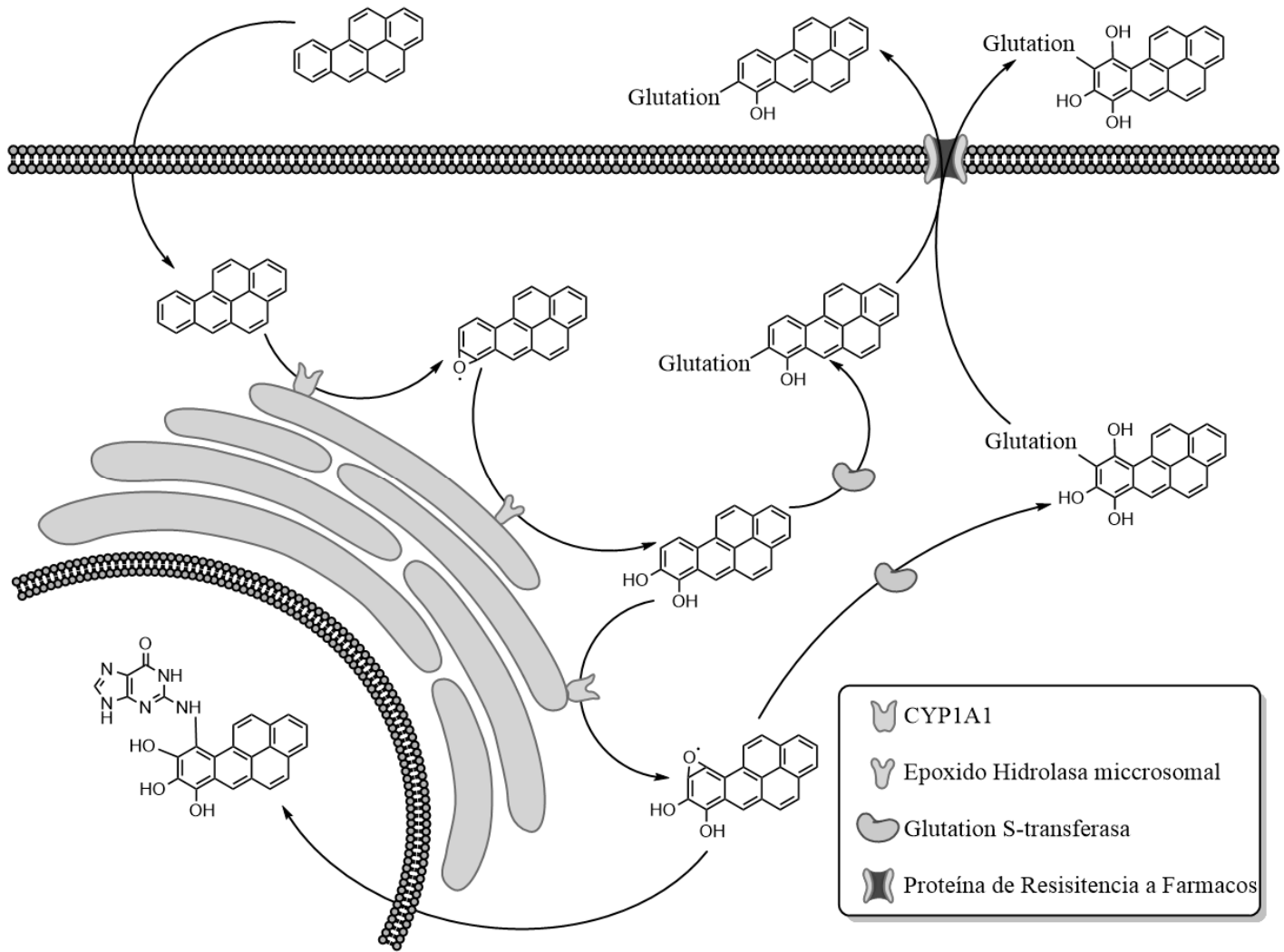
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

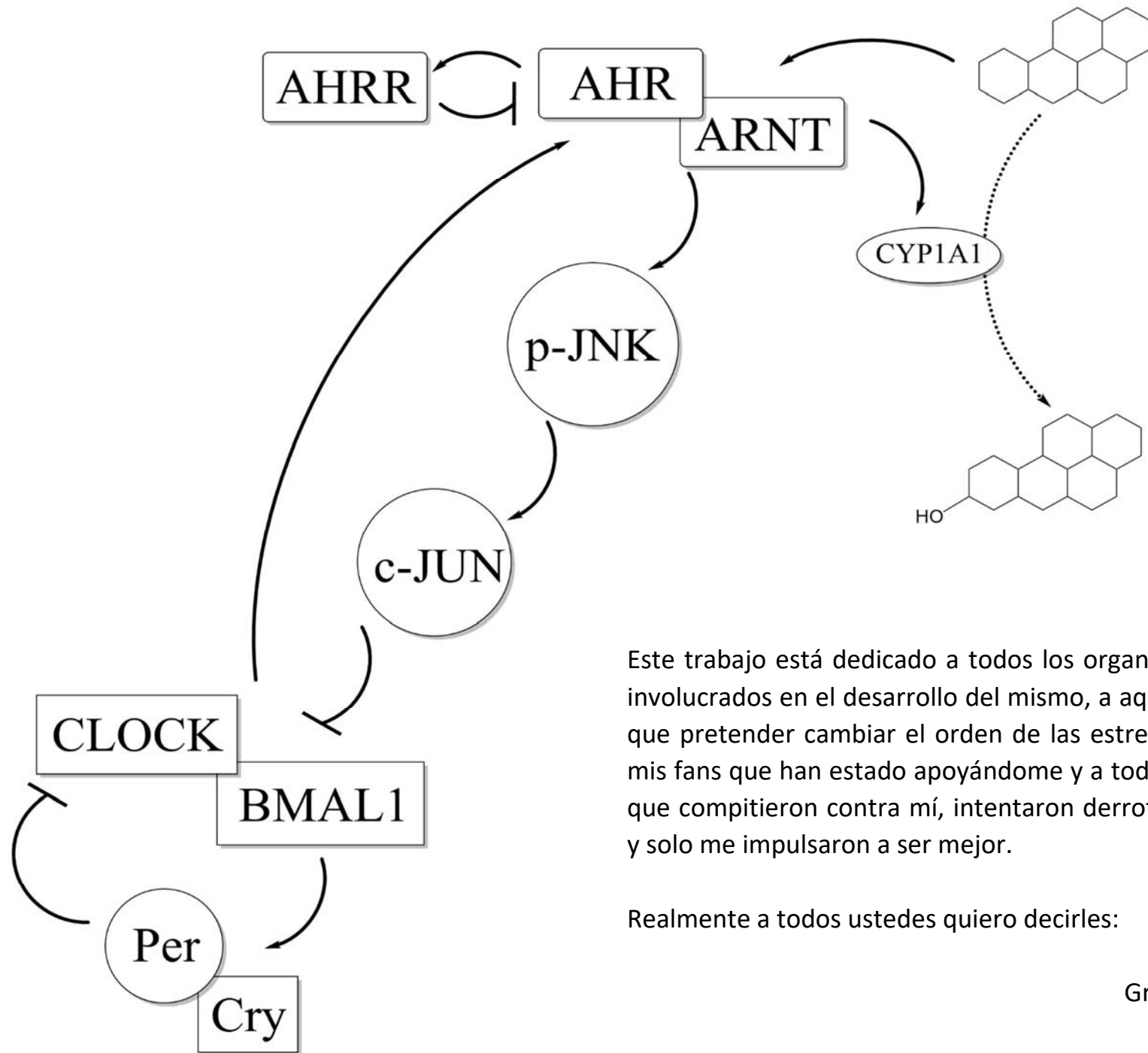
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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 Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, bajo la tutela del Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre.





Este trabajo está dedicado a todos los organismos involucrados en el desarrollo del mismo, a aquellos que pretender cambiar el orden de las estrellas, a mis fans que han estado apoyándome y a todos los que compitieron contra mí, intentaron derrotarme y solo me impulsaron a ser mejor.

Realmente a todos ustedes quiero decirles:

Gracias.



No creas en algo simplemente porque 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 un 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, su puesta en práctica sea beneficiosa para todos; entonces acéptalo y vive de acuerdo con ello.

Buda.

I. Resumen

El benzo [a] pireno (B[a]P) es un contaminante ambiental que ha incrementado su presencia debido al alto consumo de productos derivados del petróleo. Por medio de la vía del receptor para hidrocarburos de arilo (AHR), el B[a]P induce al citocromo P450 1A1 (CYP1A1), una enzima encargada de la primera etapa de la biotransformación de estos compuestos; si bien este proceso promueve la excreción del B[a]P, también puede producir metabolitos que son capaces de formar aductos con el DNA, así como inducir hepatotoxicidad. Por lo anterior se ha propuesto una relación directamente proporcional entre la proteína de CYP1A1 con el daño inducido por B[a]P.

Por otro lado, se ha descrito que en ratas con alimentación *ad libitum*, el mRNA y la proteína de CYP1A1 hepáticos presentan mayor abundancia (acrofase) durante la fase oscura en comparación con la fase luminosa. Sin embargo, si los animales se someten a un protocolo de restricción de alimento, el cual consiste en limitar el acceso al alimento durante 2 h en la fase de luminosa por 21 días, se promueve un cambio de fase en el mRNA y proteína de CYP1A1 hacia el periodo luminoso.

Considerando lo anterior, nuestra hipótesis es que una exposición a B[a]P 4 h antes de la acrofase de mRNA y proteína de CYP1A1 hepático en ratas con restricción de alimento, inducirá una mayor producción de CYP1A1, promoviendo así una mayor formación de aductos de B[a]P en DNA, y por lo tanto un aumento en los indicadores de daño hepático en comparación con ratas con dieta *ad libitum*.

En una dieta *ad libitum*, la retención del B[a]P en el hígado permite una inducción constante de CYP1A1, con ello incrementando la biotransformación del B[a]P a los metabolitos altamente reactivos con el DNA, promoviendo daño genotóxico. Por otro lado, una dieta con restricción de alimento disminuye la retención del B[a]P, lo cual promueve una baja inducción de CYP1A1, lo que repercute en una baja producción de metabolitos de B[a]P y con ello, disminuyendo el daño genotóxico. Por lo que nuestros resultados sugieren que un protocolo de restricción de alimento promueve un efecto protector a la hepatotoxicidad inducida por B[a]P (Figura A).

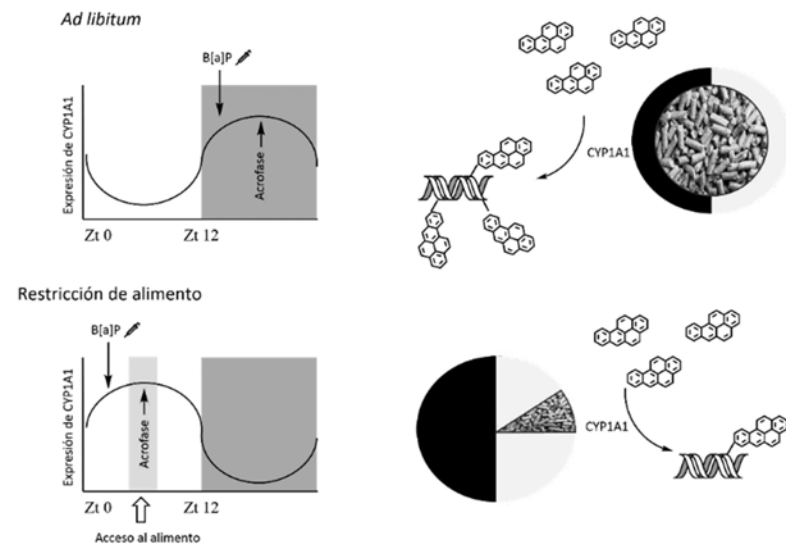


Figura A. Efecto de la restricción de alimento sobre el daño hepático inducido por B[a]P.

II. Siglas

AHR, receptor para hidrocarburos de arilo

AL, *ad libitum*

ALT, alanina aminotransferasa

ARNT, traslocador nuclear del receptor para hidrocarburos de arilo

AST, aspartato aminotransferasa

B[a]P, benzo [a] pireno

BMAL1, proteína 1 similar a ARNT de cerebro y musculo

BPDE, 7,8-dihidrodiol-9,10-epoxido benzo [a] pireno

CLOCK, disparador de salida locomotora del ciclo circadiano

CYP1A1, citocromo P450 1A1

CYP1A2, citocromo P450 1A2

CYPOR, citocromo oxidorreductasa

EROD, etoxirresorufina

GPx, glutatión peroxidasa

Gr, glutatión reductasa

HSP90, proteína de choque térmico 90

LDH, lactato deshidrogenasa

LDL, lipoproteínas de baja densidad

PAH, hidrocarburos aromáticos policíclicos

RA, restricción de alimento

ROR α , receptor huérfano α asociado al ácido retinoico

SCN, nucleo supraquiasmatico

SOD, superoxido dismutasa

TBARS, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad

XAP2, proteína asociada a X tipo 2

III. Abreviaturas

Ay, ayuno

I, intacto

ip, intraperitoneal

CAT, catalasa

CRY, cryptochrome

PER, period

Re, realimentación

REVERB α , reverse-erb α

SIRT, Sirtuina

Zt, zeitgeber

II. Índice

1. Introducción.....	1
1.1 Hidrocarburos aromáticos policíclicos.....	1
1.2 Biotransformación de los PAH: hidroxilaciones y conjugaciones.....	3
1.3 Incremento de la biotransformación: El receptor para hidrocarburos de arilo.....	5
1.4 Toxicidad por PAH: el caso del Benzo [a] pireno.....	7
1.5 Ritmo circadiano: Un tiempo para cada proceso.....	9
1.6 El núcleo del ritmo circadiano: El reloj molecular.....	11
1.7 Eferencia y aferencia del ritmo circadiano: Control del metabolismo.....	13
1.8 Reprogramación del reloj: Sincronización por alimento.....	15
2. Planteamiento del problema.....	17
3. Hipótesis.....	18
4. Objetivos.....	19
4.1 Objetivo general.....	19
4.2 Objetivos particulares.....	19
5. Material y método.....	20
5.1 Determinación del tiempo de administración.....	20
5.2 Animales.....	20
5.3 Tratamientos.....	20
5.3.1 Evaluación del efecto del vehículo.....	20
5.3.2 Exposición a B[a]P.....	21
5.3.3 Control de la condición de alimentación.....	22
5.4 Homogenado y fracción microsomal de hígado.....	26
5.5 Cuantificación de proteínas totales de la fracción microsomal.....	26
5.6 Inmunodetección de CYP1A1 por Western blot.....	27
5.7 Evaluación de la <i>O</i> -desalquilación de etoxiresorufina (EROD).....	27
5.8 Extracción de DNA de hígado para cuantificación de aductos de BPDE.....	28
5.9 Extracción de RNA de hígado.....	28

5.10 Cuantificación de ácidos nucleicos.....	28
5.11 Cuantificación de mRNA de CYP1A1 por RT-PCR.....	29
5.12 Cuantificación de aductos de B[a]P.....	29
5.17 Evaluación de la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	29
5.13 Evaluación de la actividad de superóxido dismutasa (SOD).....	30
5.14 Evaluación de la actividad de catalasa (CAT).....	30
5.15 Evaluación de la actividad de glutatión peroxidasa (GPx).....	30
5.16 Evaluación de la actividad de glutatión reductasa (Gr).....	31
5.18 Evaluación de la función hepática.....	31
5.19 Cuantificación de B[a]P en hígado.....	33
5.20 Análisis estadístico.....	33
6. Resultados.....	33
6.1 Determinación del horario de administración.....	33
6.2 Grupo control.....	34
6.3 Cantidad de mRNA, proteína y actividad de CYP1A1 hepático.....	35
6.4 Formación de aductos de BPDE en DNA	38
6.5 Actividad de enzimas antioxidantes en hígado.....	41
6.5.1 Formación de TBARS en hígado.....	41
6.5.2 Actividad de SOD	42
6.5.3 Actividad de CAT.....	42
6.5.4 Actividad de GPx.....	42
6.5.5 Actividad de Gr.....	42
6.6 Función hepática.....	45
6.7 Cantidad de B[a]P en hígado.....	49
7. Discusión.....	50
8. Conclusión.....	55
9. Perspectivas.....	56
10. Referencias.....	56

1. Introducción

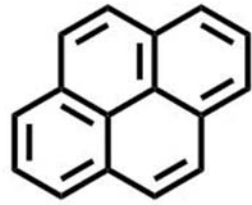
1.1 Hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH, por sus siglas en inglés) son una clase de moléculas orgánicas hidrofóbicas formadas por 2 o más anillos de benceno fusionados (figura 1), derivados de la combustión incompleta de materia orgánica, así como por diagénesis.¹

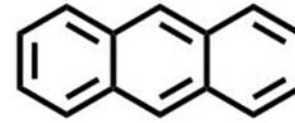
El uso actual de productos derivados del petróleo ha incrementado los niveles de PAH en aire, suelo y agua, lo que lo ha llevado a ser considerado como un contaminante ambiental persistente, cuyas concentraciones se modifican por las condiciones ambientales y estacionales.^{2,3} Además, procesos de cocción a la parrilla y el uso de mantequilla o aceites durante la preparación de los alimentos son una fuente de PAH,⁴ así como la exposición al humo de tabaco tanto para fumadores activos como pasivos.⁵

La absorción de PAH puede ser por vía oral, nasal y cutánea; una vez dentro del organismo son transportados por lipoproteínas de muy baja y baja densidad (VLDL y LDL respectivamente, por sus siglas en inglés) a través de la sangre^{6,7} siendo depositados en hígado, riñones, tejido adiposo y vejiga.⁸

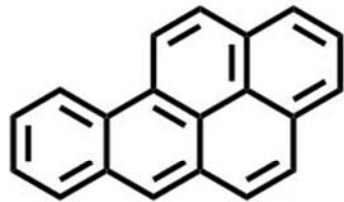
Los PAH atraviesan la membrana celular de forma independiente de la endocitosis de VLDL y LDL, depositándose en pequeñas gotas lipídicas en citoplasma⁹ y al interior de los organelos membranosos.¹⁰



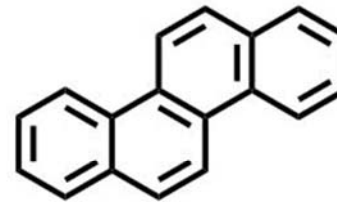
pireno



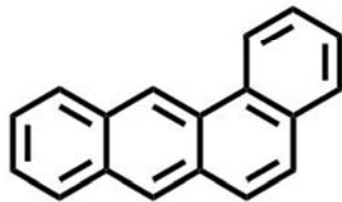
antraceno



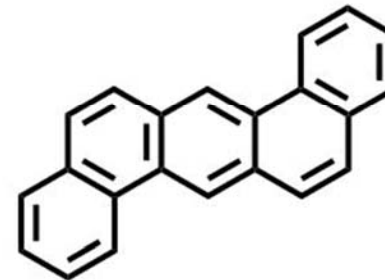
benzo [a] pireno



criseno



benzo [a] antraceno



dibenzo [a,h] antraceno

Figura 1. Principales PAH presentes en el ambiente y alimentos.

1.2 Biotransformación de los PAH: hidroxilaciones y conjugaciones

Una vez dentro de la célula, los PAH son biotransformados por la superfamilia de los citocromos P450 (CYP, por sus siglas en inglés), principalmente por el CYP1A1 y CYP1A2, los cuales catalizan la monooxigenación del PAH incrementando su solubilidad.¹¹ Esta reacción requiere un par de electrones derivados de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), los cuales se transfieren al sustrato por la enzima citocromo óxido reductasa (CYPOR, por sus siglas en inglés) (Figura 2).¹²

La siguiente reacción, la hidrólisis del epóxido en el PAH, la cual es mediada por la epóxido hidrolasa microsomal.¹³ Posteriormente, la Glutación S-transferasa conjuga al glutatión con el PAH, incrementando aún más su solubilidad (Figura 2).¹⁴ Como paso final, este compuesto es transportado fuera de la célula hacia el torrente sanguíneo a través de proteínas asociadas a resistencia de fármacos, para ser excretado por de la orina y heces.⁸

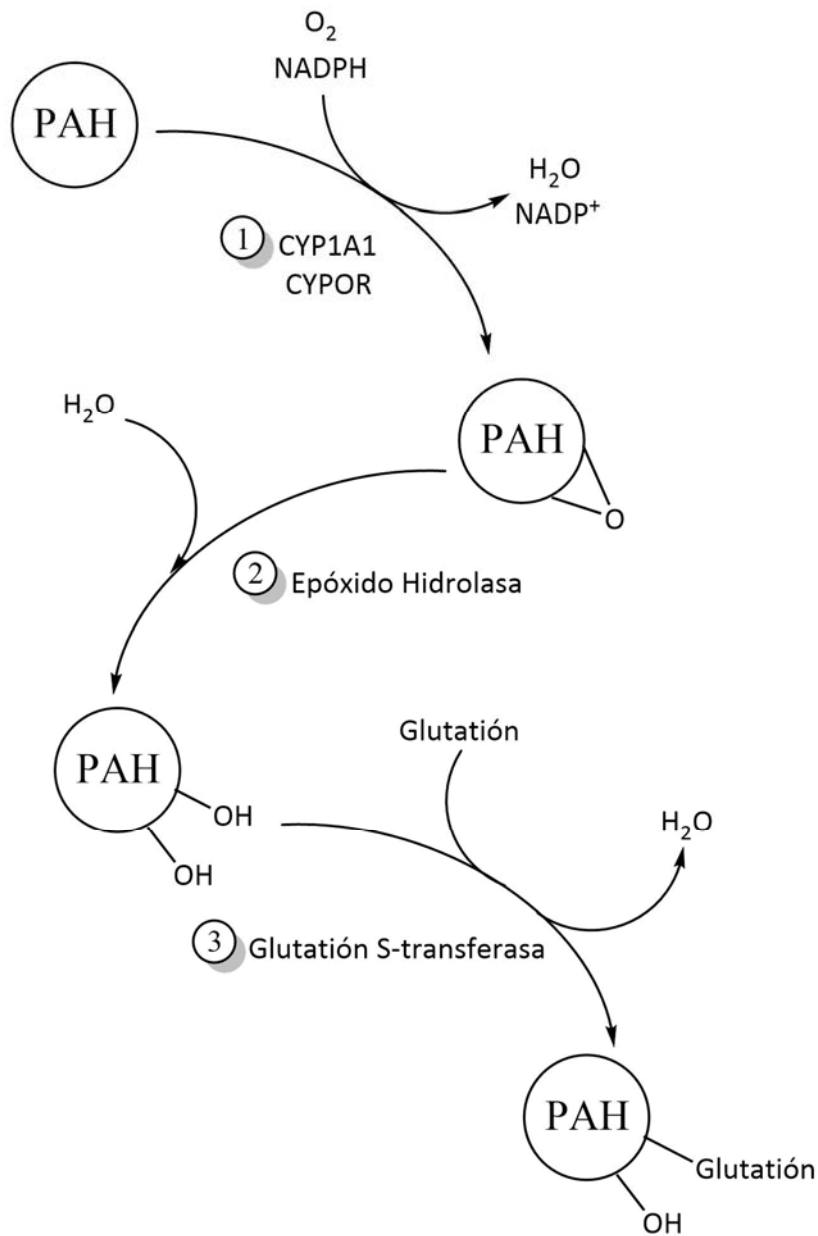


Figura 2. Esquema de la biotransformación de un hidrocarburo aromático policíclico (PAH, por sus siglas en inglés). El citocromo P450 1A1 (CYP1A1) apoyado por la citocromo oxidorreductasa (CYPOR, por sus siglas en inglés), adiciona un átomo de oxígeno para formar el epóxido-PAH. Este producto es sustrato de la epóxido hidrolasa produciendo 7-8 dihidrodiol PAH. Finalmente, la glutatión S-transferasa le adiciona una molécula de glutatión, incrementando la solubilidad del compuesto y facilitando su excreción.

1.3 Incremento de la biotransformación: El receptor para hidrocarburos de arilo

A través del receptor para hidrocarburos de arilo (AHR, por sus siglas en inglés), los PAH inducen a las enzimas que se encargan de biotransformarlos. El AHR es una proteína que se encuentra en el citoplasma asociada con un complejo proteico que le confiere la conformación para reconocer a los PAH. Este complejo se forma por la proteína de choque térmico (HSP90, por sus siglas en inglés), la proteína asociada a X tipo 2 (XAP2, por sus siglas en inglés) y la proteína p23.

Una vez que el ligando interactúa con el AHR, este sufre un cambio conformacional que expone su secuencia de traslocación nuclear, lo que le permite al AHR introducirse al núcleo, donde forma un heterodímero con el traslocador nuclear de AHR (ARNT, por sus siglas en inglés). Este heterodímero reconoce y se une a los elementos de respuesta a xenobióticos (XRE, por sus siglas en inglés) presentes en la región promotora en los genes de CYP1A1, CYP1A2 y glutatión S-Transferasa induciéndolos (figura 3).¹⁵

El promotor del gen de AHR posee un elemento de respuesta a cAMP, uno de respuesta a metales y uno de respuesta a xenobióticos, lo que en transcripción puede ser modulada por cada uno de estos factores.¹⁶

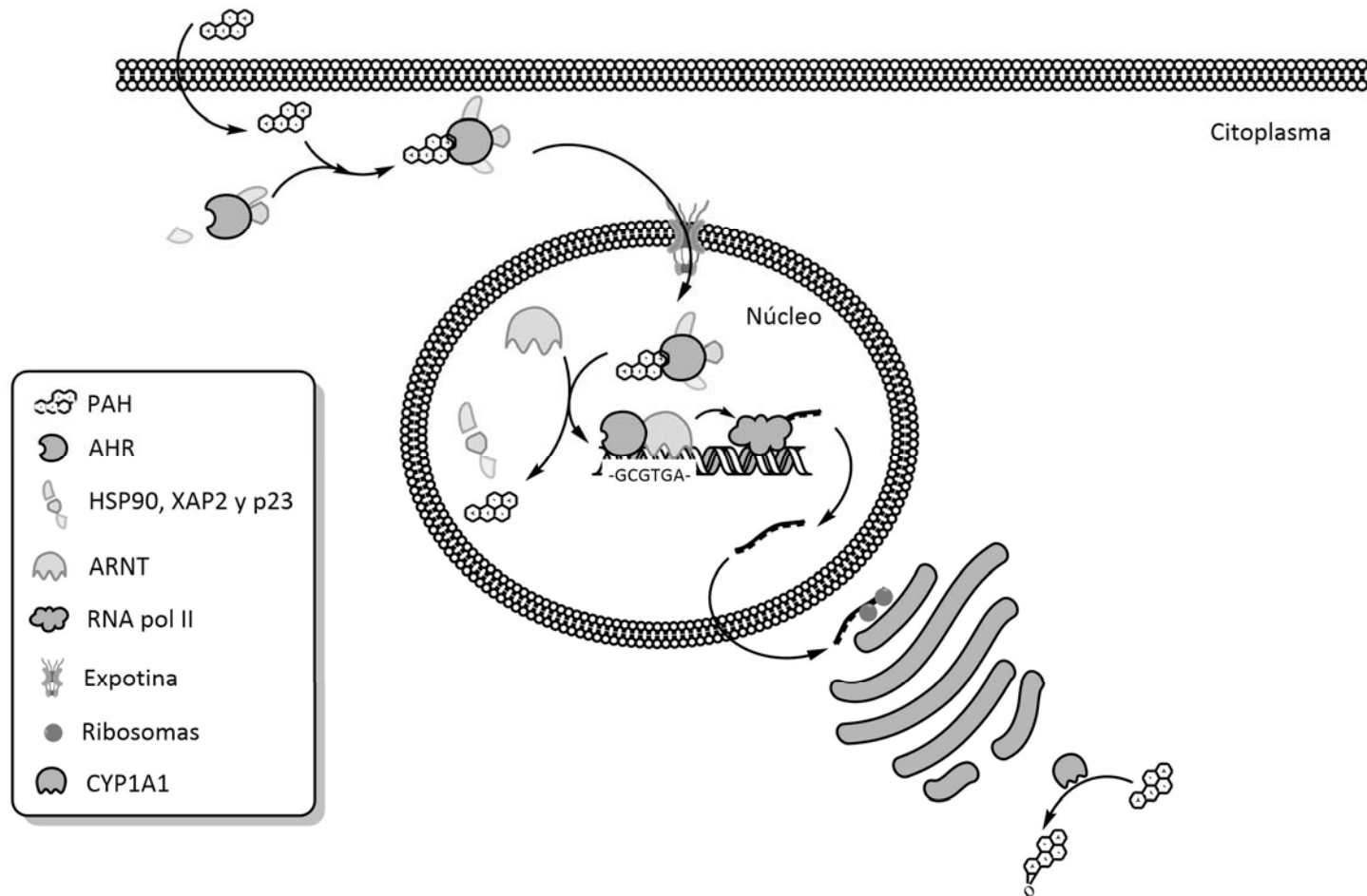


Figura 3. Esquema de la vía del receptor para hidrocarburos de arilo (AHR). El hidrocarburo aromático policíclico (PAH, por sus siglas en inglés) se difunde dentro de la célula y se une al AHR localizado en el citoplasma. El AHR está asociado con la proteína de choque térmico (HSP90, por sus siglas en inglés), la proteína asociada a X tipo 2 (XAP2, por sus siglas en inglés) y la proteína p23. El complejo PAH:AHR es traslocado al núcleo, donde el AHR heterodimeriza con el traslocador nuclear de AHR (ARNT), reconoce y se une a los elementos XRE en el promotor de CYP1A1, induciendo su transcripción de CYP1A1. Una vez sintetizada la proteína de CYP1A1, el PAH es biotransformado.

1.4 Toxicidad por PAH: el caso del Benzo [a] pireno

Todos los PAH presentes en el ambiente, poseen características citotóxicas, mutagénicas y carcinogénicas, siendo el benzo [a] pireno (B[a]P) el integrante más estudiado, esto debido a la capacidad de ser acumulado en varios organos.¹⁷

El B[a]P al ser biotransformado por el CYP1A1, la CYPOR y la epóxido hidrolasa pasa a ser el 7-8 dihidrodiol B[a]P, el cual puede ser una vez más sustrato de CYP1A1 produciéndose una segunda monooxigenación en la posición 9-10, y formándose el 7,8-dihidrodiol-9,10-epoxido-benzo [a] pireno (BPDE, por sus siglas en inglés).¹⁸ Tras estos procesos el B[a]P adquiere la capacidad de formar enlaces covalentes con

el DNA y generar aductos (Figura 4).¹⁹ Estos aductos generan irregularidades en la estabilidad y fidelidad en la lectura del DNA, tanto en la replicación como en la transcripción, promoviendo procesos mutagénicos y carcinogénicos, comprometiendo la integridad celular, así como la actividad fisiológica.¹⁰

Los aductos de BPDE, son considerados como un biomarcador característico de la exposición a B[a]P,²⁰ los cuales son persistentes por más de 72 h tras una sola exposición.²¹

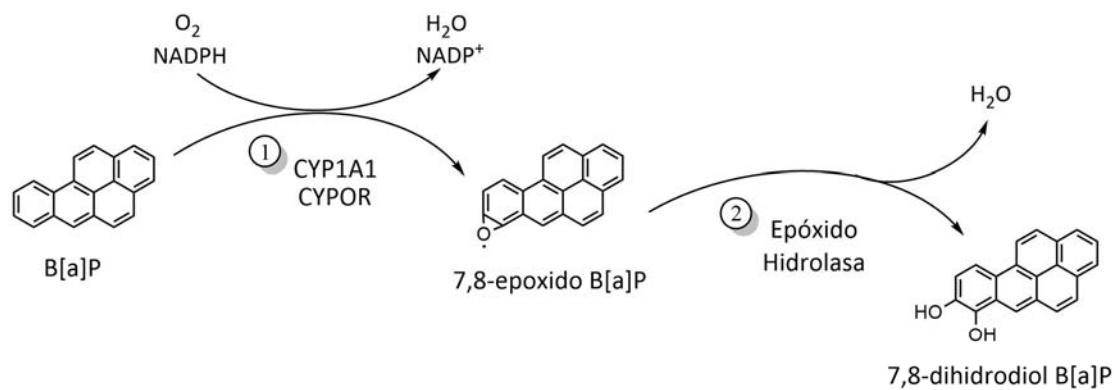
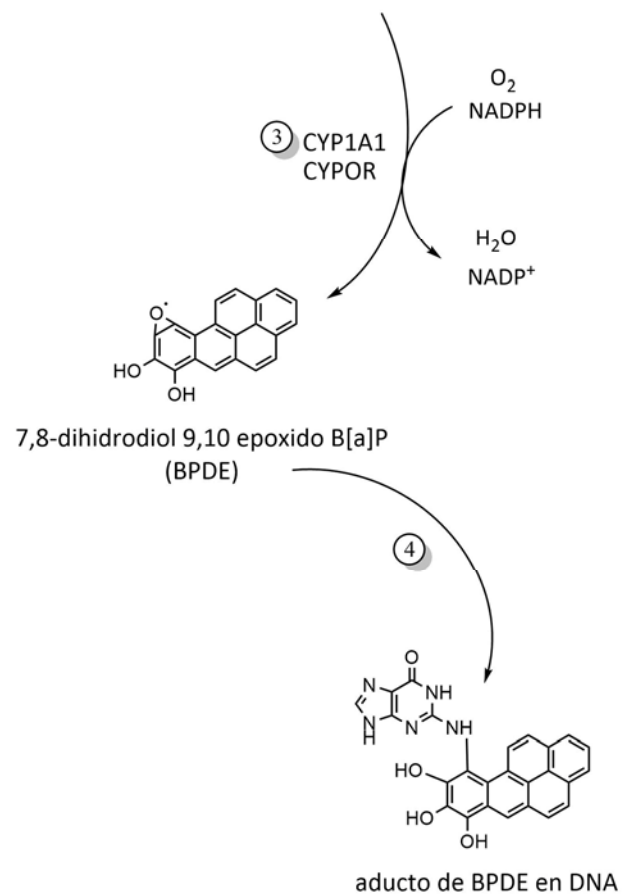


Figura 4. Esquema de la formación de aductos de B[a]P con el DNA. El B[a]P adquiere su primer hidroxilación por medio del citocromo P450 1A1 (CYP1A1), la citocromo oxidorreductasa (CYPOR) y la epóxido hidrolasa, formando al 7,8-dihidrodiol B[a]P. Este compuesto es una vez más biotransformado por el CYP1A1 y CYPOR en el 7,8-dihidrodiol-9,10-epoxido-benzo [a] pireno (BPDE, por sus siglas en inglés), el cual forma un aducto con el DNA.



1.5 Ritmos circadianos: un tiempo para cada proceso

Los ritmos circadianos son procesos basados en un sistema de tiempo que ajusta los parámetros fisiológicos de los organismos en función de las condiciones ambientales, de forma periódica en ciclos de 24 h aproximadamente.²² Los periodos de alimentación, ciclos sueño/vigilia, niveles hormonales y la temperatura corporal son resultado de esta función.²³

En todos los tejidos se presentan variaciones circadianas funcionales, las cuales son coordinadas por 15 000 neuronas (aproximadamente) localizadas en el hipotálamo anterior, las cuales constituyen al núcleo supraquiasmático (SCN, por sus siglas en inglés) considerado como el marcapasos principal. Sin embargo, este requiere una condición ambiental (agente sincronizador), siendo la luz su principal sincronizador.²⁴

La estructura encargada de percibir los estímulos luminosos es la retina, la cual genera un estímulo que viaja por el tracto retino-hipotalámico al SCN, donde serán interpretados y transmitidos a través de señales neurales y humorales hacia los órganos periféricos para mantener la ritmicidad de los eventos fisiológicos y conductuales (figura 5).²⁵

Un mecanismo conservado en la mayoría de los organismos es la presencia de un reloj molecular formado por un complejo activador que se encarga de iniciar la transcripción de genes que codifican para proteínas con funciones metabólicas y/o estructurales, así como de un complejo inhibidor que bloquea la señal del activador.²⁶

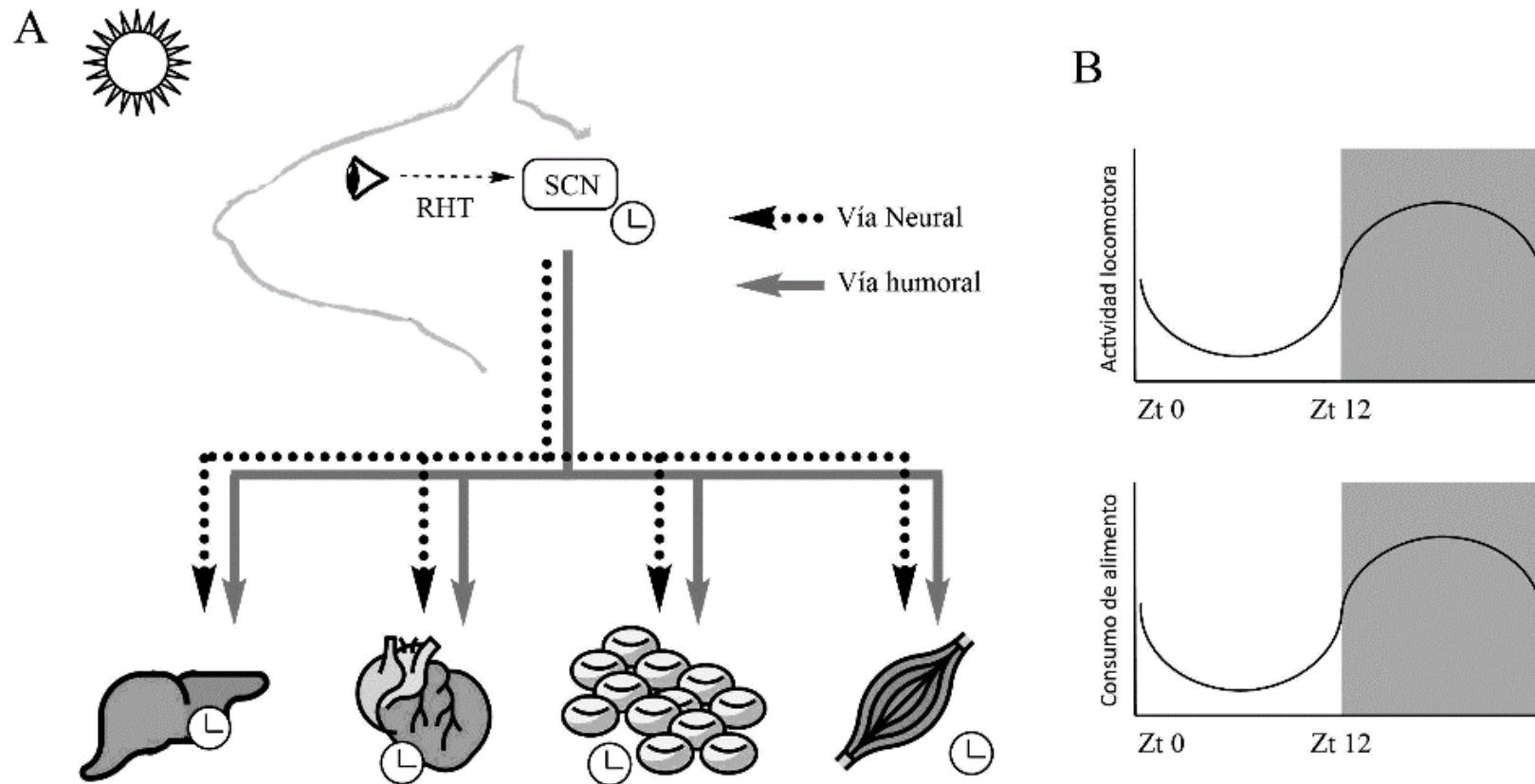


Figura 5. Esquema del efecto de la luz sobre el núcleo supraquiasmático (SCN) y su control sobre los órganos. La luz es percibida a través de la retina, cuyo estímulo viaja a través del tracto retino-hipotalámico (RHT) sincronizando el reloj del SCN (A). El SCN coordina el ritmo de los tejidos periféricos y actividades fisiológicas través de la vía neural y humoral. Esquema representativo de la distribución temporal de la actividad locomotora y el consumo de alimento durante la fase oscura en ratas con dieta *ad libitum* (B).

1.6 El eje del ritmo circadiano: El reloj molecular

El reloj molecular se compone de un heterodímero activador formado por el disparador de salida locomotora de ciclos circadianos (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 reconoce las E-Box (5'-CACGTG -3') presentes en la región promotora de los genes periodo (PER) y criptocromo (CRY), promoviendo su transcripción y posteriormente su traducción. Una vez sintetizadas las proteínas PER y CRY forman un heterodímero (PER:CRY), el cual inhibe al heterodímero CLOCK:BMAL1 deteniendo su actividad (Figura 6). Después de efectuar su función, PER y CRY son degradados en el citosol, proceso que disminuye la interacción con el complejo CLOCK:BMAL1 y con ello reiniciando el ciclo.²⁷

Adicionalmente, en la región promotora de BMAL1 se presenta la secuencia RORE (5'-TTCTAGGTCA-3'), la cual sirve para modular su expresión por medio del receptor huérfano α asociado al ácido retinoico (ROR α) y reverse-erb α (REV-ERB α). Ambos moduladores presentan una E-box en su región promotora, lo cual ayuda a mantener la robustez y precisión del reloj molecular.²⁸

La presencia de estas proteínas no se limita a las neuronas del SCN. Se ha observado que núcleos cerebrales y órganos como el hígado, páncreas e intestino también los expresan de forma rítmica y sus ciclos persisten en ausencia de la influencia del SCN, por lo que estos órganos son considerados como osciladores periféricos.²⁸

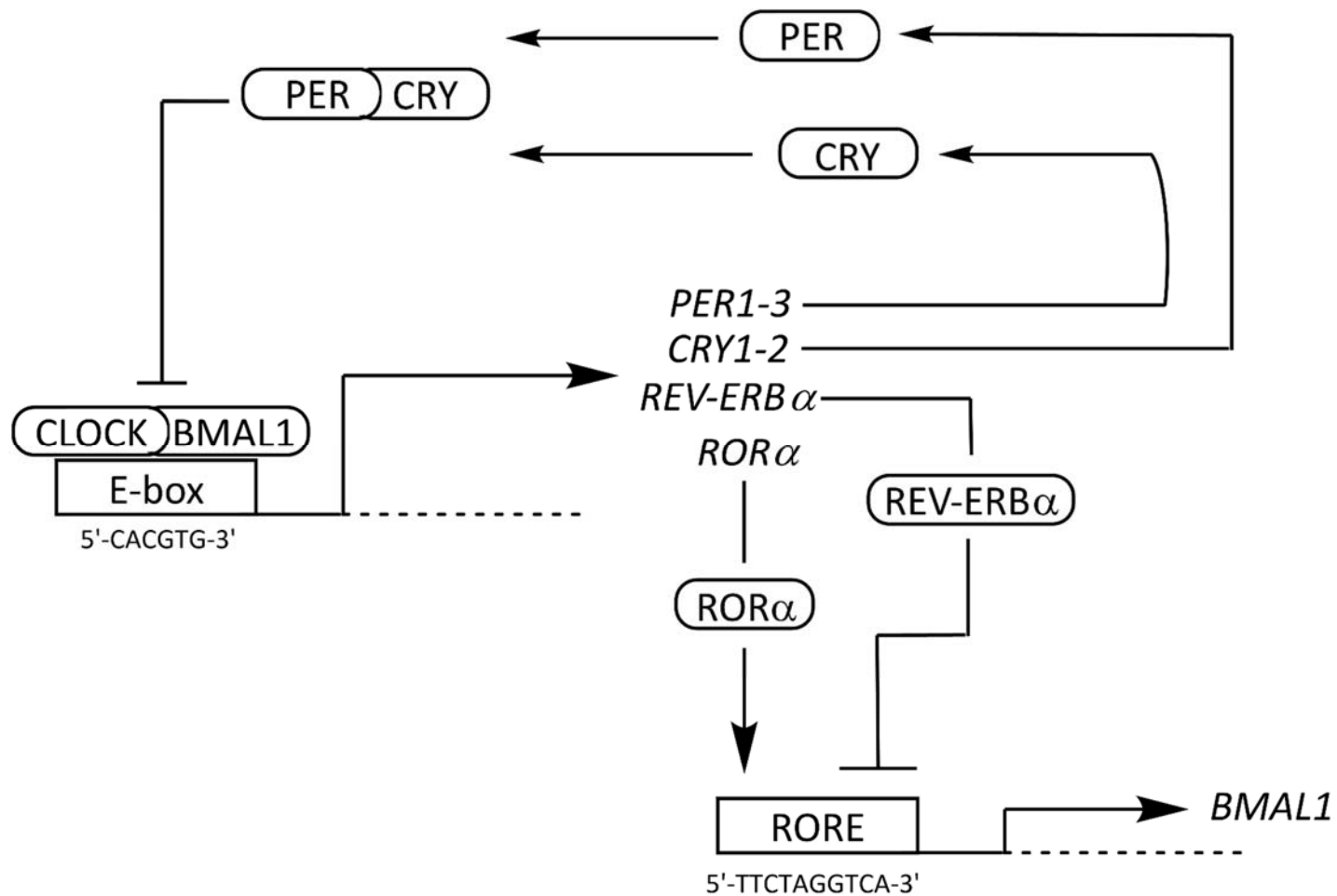


Figura 6. Esquema de los componentes del reloj molecular. El reloj molecular está compuesto por el asa positiva (CLOCK:BMAL1) la cual se forma en el citoplasma y se transloca al núcleo, donde se une a la E-box (5'-CACGTG-3') presente en el promotor de *PER* y *CRY* activando su transcripción y su posterior traducción. PER y CRY forman un complejo inhibidor alostérico de CLOCK:BMAL1 disminuyendo su actividad. Adicionalmente el receptor huérfano α asociado al ácido retinoico (ROR α) y reverse-erb α (REV-ERB α), modulan la expresión de BMAL1 por medio del elemento de respuesta al receptor huérfano relacionado con el ácido retinoico (RORE) (5'-TTCTAGGTCA-3').

1.7 Eferencia y aferencia del ritmo circadiano: Control del metabolismo

El ritmo circadiano modula la síntesis y/o actividad de ciertas enzimas, sistemas de transportadores y receptores nucleares todos estos involucrados en el metabolismo de ácidos grasos, colesterol, urea, carbohidratos y complejos hemo, la síntesis de proteínas y nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺, por sus siglas en inglés).^{29, 30}

De forma recíproca, el metabolismo influye en la función de CLOCK:

1) Acetil-Coenzima A (metabolito de la glicolisis y metabolismo de ácidos grasos) es usado como cofactor por CLOCK:BMAL1, para el reclutamiento de proteínas asociadas durante la transcripción.^{31, 32}

2) NAD⁺ es usado como cofactor por las sirtuinas (SIRT), las cuales acetilan al heterodímero CLOCK:BMAL1, reprimiendo su actividad.

Adicionalmente, el NAD⁺ sirve como cofactor para la ribosa polimerasa poli-ADP (PARP), la cual adiciona una cadena de adenosina difosfato a CLOCK, con lo que reduce la afinidad de CLOCK:BMAL1 a la E-box presente en el promotor CRY y PER (Figura 7).³³

3) La activación por ligando de AHR, además de formar heterodímero con ARNT, también puede formar heterodímero con BMAL1, con lo que reduce la interacción de CLOCK con BMAL1, disminuyendo la transcripción de *PER*.³⁴

A través del conocimiento de las variaciones temporales de las funciones metabólicas y su efecto sobre el ritmo circadiano, se han desarrollado estrategias para administrar fármacos en tiempos en los que se tenga una mayor efectividad (con menor dosis) y reduciendo los efectos nocivos, lo cual es conocido como cronoterapia.³⁵

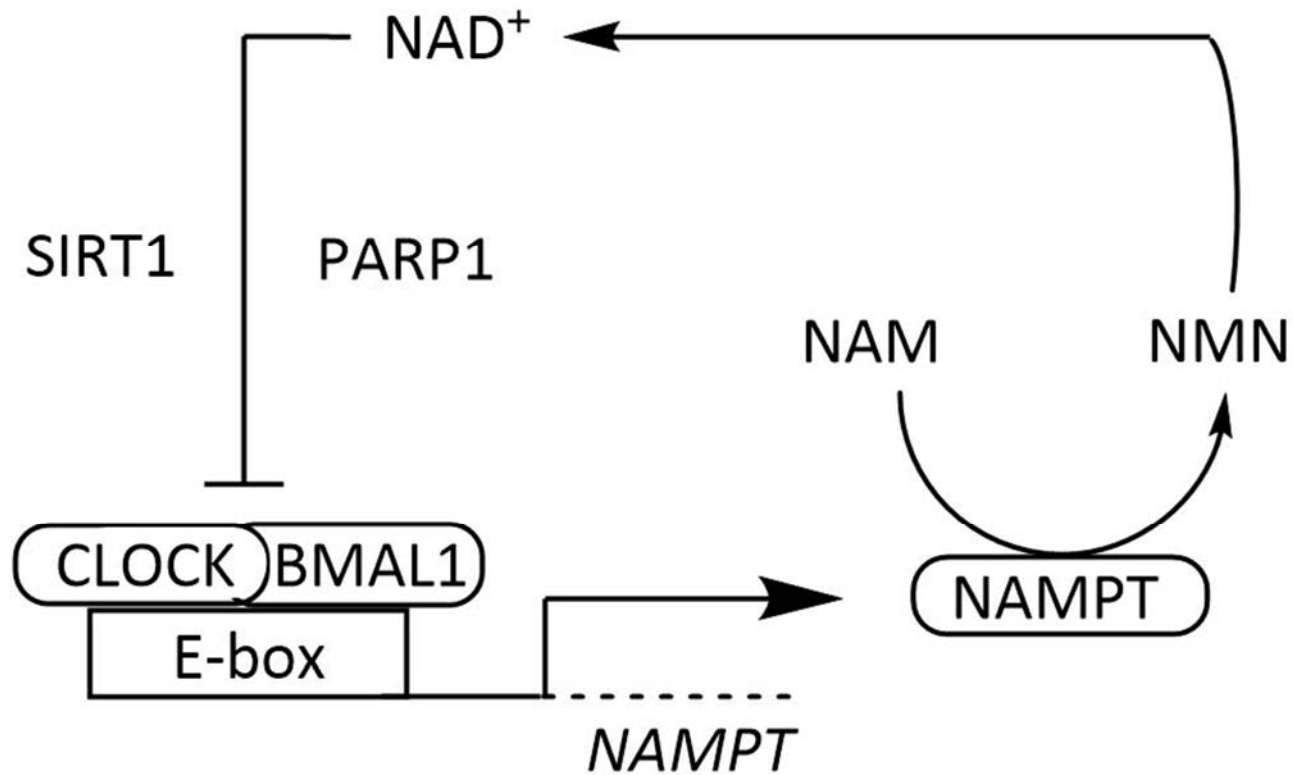


Figura 7. Esquema del efecto del reloj molecular sobre la síntesis de NAD⁺. El heterodímero CLOCK:BMAL1 se une a la E-box presente en el gen de la nicotinamida fosforibosil-transferasa (NAMPT, por sus siglas en inglés), la cual modula la adición de una fosforibosa a la nicotinamida, un precursor del NAD⁺. Siendo éste un cofactor para la modulación de CLOCK, a través de las sirtuina 1 (SIRT1, por sus siglas en inglés) y la ribosa polimerasa poli-ADP (PARP, por sus siglas en inglés).

1.8 Reprogramación del reloj: Restricción de alimento

La restricción de alimento se refiere a limitar a 2 h la disponibilidad de alimento con o sin reducción de calorías.³⁶ Se ha observado que ratas bajo estas circunstancias ajustan su conducta al periodo de alimentación, además de presentar secreción de corticosterona, motilidad gastrointestinal y actividad locomotora aproximadamente 2 h antes del periodo de alimentación (figura 8).³⁷

La restricción de alimento modifica el patrón del reloj molecular en órganos como el hígado, riñón, corazón y páncreas sin afectar el ritmo del SCN.²³ Con ello se promueve el reajuste en los puntos máximos (o acrofase) de múltiples parámetros fisiológicos, a través de cambios temporales (cambio de fase) en la cantidad de enzimas encargadas del aprovechamiento de lípidos,³⁸ glucosa,³⁹ urea,⁴⁰ así como el balance energético.^{41, 42}

Previamente, demostramos que un protocolo de restricción de alimento (acceso al alimento de 2 h, de Zt 4 a Zt 6) durante 21 días en ratas, promueve un cambio temporal en la cantidad de CYP1A1, el cual comienza un par de horas antes de acceso al alimento, decayendo en las horas subsiguientes.⁴³

Diversos estudios han demostrado que los efectos fisiológicos de la restricción de alimento se mantienen en animales con mutaciones en CLOCK y lesiones en SCN; lo que sugiere la existencia de un marcapasos independiente del SCN, que responde a las señales activadas por ciclos de ayuno/realimentación, del cual hasta la fecha se desconoce su ubicación.⁴⁴

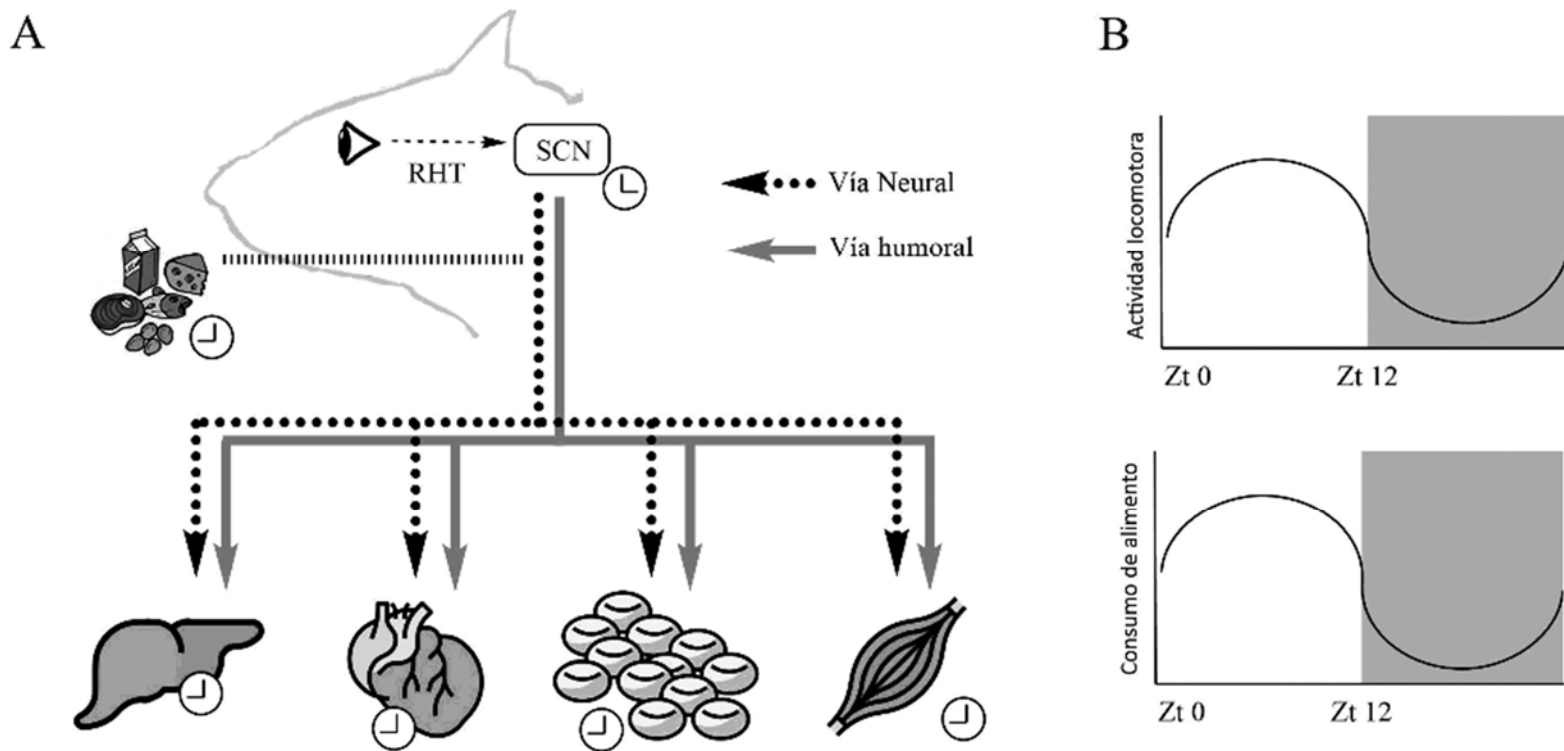


Figura 8. A) Esquema del efecto de la ciclicidad en la alimentación sobre los ritmos circadianos en órganos periféricos. B) Esquema representativo de la distribución temporal de la actividad locomotora y el consumo de alimento durante la fase oscura en ratas con restricción de alimento. Sí el alimento se presenta en ciclos constantes, tanto la expresión de los genes reloj, así como de los genes involucrados en el metabolismo de nutrientes se reorganizan al periodo del acceso al alimento, generando ciclos independientes del núcleo supraquiasmático (SCN, por sus siglas en inglés) acoplando los procesos de actividad locomotora al periodo de acceso al alimento.

2. Planteamiento del problema

Estudios farmacológicos han demostrado que la efectividad y toxicidad de muchos fármacos varía en función de la hora en que son administrados, lo que ha permitido el diseño de estrategias para la optimización de sus efectos terapéuticos.⁴⁵ Una de estas estrategias es la restricción de alimento, ya que esta reduce la toxicidad y biodisponibilidad de fármacos como la gentamicina⁴⁶ y el acetaminofén.⁴⁷ Sin embargo, esta estrategia ha sido poco estudiadas en procesos toxicológicos.

Por otro lado, derivado del uso excesivo de productos derivados del petróleo, los hidrocarburos aromáticos policíclicos, han incrementado su presencia en el ambiente, siendo el benzo [a] pireno, uno de los miembros más estudiado. El organismo es capaz de biotransformar al benzo [a] pireno a través de CYP1A1, sin embargo, durante este proceso se generan metabolitos que son altamente reactivos con el DNA, los cuales comprometen la integridad de la célula.¹⁰

Previamente, demostramos que un protocolo de restricción de alimento modifica el patrón temporal, así como la magnitud de la cantidad de mRNA de CYP1A1. Este resultado sugiere un cambio de fase en la cantidad de CYP1A1 asociado al periodo de alimentación.⁴³

Por lo que el interés de este trabajo es comparar si la acrofase presentado por CYP1A1, durante un protocolo de restricción de alimento, promueve mayor hepatotoxicidad inducida por B[a]P, en comparación con la acrofase presentada durante una dieta *ad libitum* (figura 9).

3. Hipótesis

una exposición a B[a]P 4 h antes de la acrofase de mRNA y proteína de CYP1A1 hepático en ratas con restricción de alimento, inducirá una mayor producción de CYP1A1, promoviendo así una mayor formación de aductos de B[a]P en DNA, y por lo tanto un aumento en los indicadores de daño hepático en comparación con ratas con dieta ad libitum.

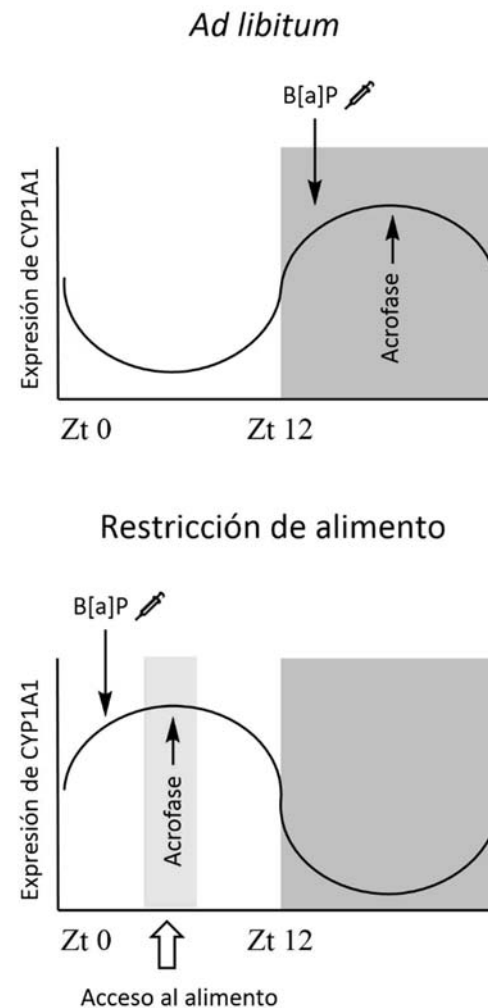


Figura 9. Esquema del diseño de la administración del benzo a pireno (B[a]P) para la comparación de la capacidad de inducción de CYP1A1, entre la acrofase presentadas durante una alimentación *ad libitum* y una restricción de alimento.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar el daño hepatotóxico inducido por B[a]P en ratas bajo un protocolo de restricción de alimento.

4.1 Objetivos particulares

- Determinar la cantidad de mRNA y proteína de CYP1A1 hepático en ratas tratadas con B[a]P alimentadas bajo un protocolo de restricción de alimento.
- Evaluar la cantidad de aductos de B[a]P en DNA hepático de ratas bajo un protocolo de restricción de alimento expuestas a B[a]P.
- Determinar la actividad de catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa hepáticas de ratas bajo un protocolo de restricción de alimento expuestas a B[a]P.
- Evaluar las funciones hepáticas (aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa, lactato deshidrogenasa, bilirrubina total, bilirrubina directa, concentración de albumina y proteínas totales en suero) de ratas alimentadas bajo un protocolo de restricción de alimento expuestas a B[a]P.
- Determinar la cantidad de B[a]P retenido en el hígado de ratas bajo restricción de alimento.

5. Material y método

5.1 Determinación del tiempo de administración

A partir de los datos previamente reportados,⁴³ se realizó el análisis cosinor⁴⁸ para determinar la acrofase, amplitud y mesor de la cantidad temporal de CYP1A1 en ratas con dieta *ad libitum*, así como de ratas con acceso al alimento por 2 h (Zt 4 a Zt 6) durante 21 días. Lo anterior permitió la determinación del punto de mayor cantidad de mRNA de CYP1A1 en ambas condiciones.

5.2 Animales

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar de 6 de edad, las cuales fueron mantenidas en cajas transparentes de acrílico (40 x 50 x 20 cm) con libre acceso a agua y alimento (LabDiet 5001TM), con fotoperiodo de 12 h luz:12 h oscuridad (la luz se encendió a las 07:00 h, considerado Zt 0) y una temperatura constante de 22 ± 1 °C durante una semana antes del inicio de los experimentos. Todos los experimentos fueron realizados de

acuerdo con el Comité Internacional de Cuidados y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional autónoma de México (UNAM).

5.3 Tratamientos

5.3.1 Evaluación del efecto del vehículo

Si bien, es ampliamente reconocido que el aceite de maíz no modifica la cantidad de CYP1A1,⁴⁹ evaluamos el efecto de la administración intraperitoneal (ip) de 0.3 ml de aceite de maíz.

Después de una semana de aclimatación, los animales fueron colocados de forma aleatoria en uno de los siguientes grupos y mantenidos bajo esas condiciones durante 21 días: a) grupo *ad libitum* (AL) con libre acceso a agua y alimento; b) grupo con restricción de alimento (RA), con acceso al alimento durante 2 h diarias (Zt 4 a Zt 6) y libre acceso a agua.

El día 21, los animales del grupo AL fueron administrados con 0.3 ml de aceite de maíz de forma ip en Zt 13. Mientras que los animales del grupo RA fueron administrados en Zt 1. Estos horarios de administración fueron determinados a partir del análisis de cosinor de los datos previamente publicados.⁴³ Adicionalmente, fueron considerados en dicha prueba animales de ambos grupos (AL y RA), los cuales no fueron manipulados, AL intacto (AL+I) y RA intacto (RA+I). Cada subgrupo constó de 6 animales (figura 10), siendo eutanizados 24 h posteriores a su administración.

5.3.2 Exposición a B[a]P

Después de una semana de aclimatación, los animales fueron colocados de forma aleatoria en el grupo AL o RA y mantenidos bajo esas condiciones durante 21 días.

El día 21, 6 animales del grupo AL fueron eutanizados por decapitación (considerados a partir de ahora AL control) en Zt 13. Mientras que el resto de los animales fueron administrados con 10 mg/kg de B[a]P en Zt 13, 4 h antes de la acrofase de CYP1A1 en animales con dieta AL.⁴³

Adicionalmente, 6 animales del grupo RA fueron eutanizados por decapitación (considerados a partir de ahora RA control) en Zt 1. Mientras que el resto de los animales fueron administrados con 10 mg/kg de B[a]P en Zt 13, 4 h antes de la acrofase de CYP1A1 en animales en RA.⁴³

Tanto el grupo Al y RA expuestos a B[a]P, fueron eutanizados 6 animales de cada grupo a las 24, 48 y 72 h, de los cuales se colectó el hígado y suero (figura 11). Se eligió que la exposición a B[a]P fueran 4 h antes de la acrofase de CYP1A1 en cada condición de alimentación, esto con el objetivo de garantizar la presencia del B[a]P en el hígado durante la acrofase de mRNA de CYP1A1.

5.3.3 Control de la condición de alimentación

Para determinar si el efecto mostrado en las pruebas corresponde a un proceso acoplado a la sincronización por acceso al alimento o por la condición alimenticia, evaluamos 4 grupos adicionales:

a) Ayuno (Ay), 6 ratas con acceso libre a agua y alimento durante 20 días, en el día 20 se retiró el alimento en Zt 1.

b) Ayuno expuesto a B[a]P (Ay+B[a]P), 6 ratas con acceso libre a agua y alimento durante 20 días. En el día 20 se retiró el alimento en Zt 4 y se les administró de forma ip 10 mg/kg de B[a]P.

Ambos grupos (Ay y Ay+B[a]P) fueron eutanizados el día 21 tras 22 h de ayuno (Zt 4).

c) Realimentación (Re), 6 ratas con acceso libre a agua y alimento durante 20 días, en el día 20 se retiró el alimento en Zt 4. El día 21 recibieron alimento por 2 h (Zt 4 a Zt 6).

d) Realimentación expuesto a B[a]P (Re + B[a]P), 6 ratas con acceso libre a agua y alimento durante 20 días. En el día 20 se retiró el alimento en Zt 4 y se les administró de forma ip 10 mg/kg de B[a]P. El día 21 recibieron alimento por 2 h (Zt 4 a Zt 6).

Ambos grupos (Re y Re+ B[a]P) fueron eutanizados al termino de las 2 h de alimentación (Zt 6).

De cada animal se recuperó el hígado y el suero, los cuales fueron procesados como se describe a continuación ([figura 12](#)).

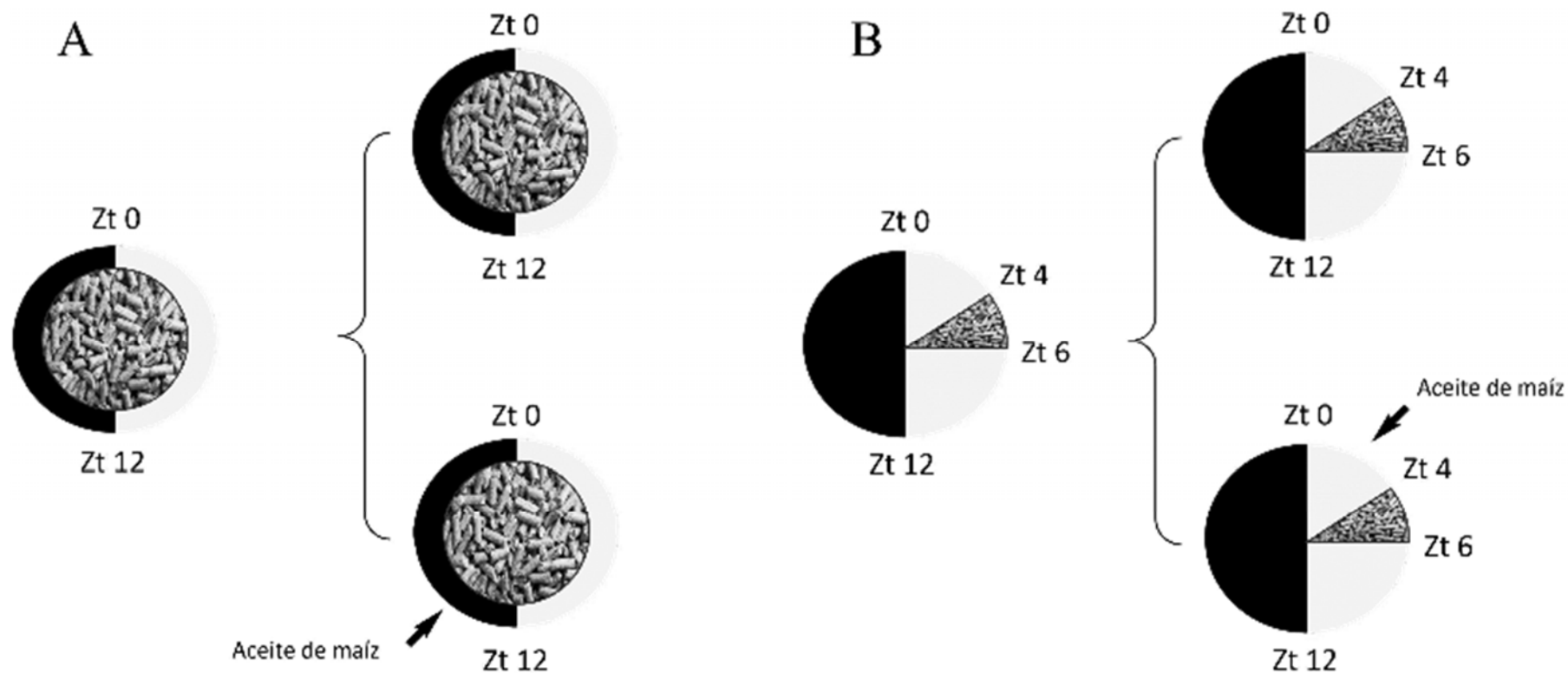


Figura 10. Esquema de administración de aceite de maíz. A) Los animales tuvieron un fotoperiodo de 12 h Luz/ 12 h oscuridad, con libre acceso a agua y alimento, las cuales fueron mantenidos por 21 días. El día 21 un grupo fue administrado de forma intraperitoneal con 0.3 ml de aceite de maíz en Zt 13, mientras que 6 animales se mantuvieron intactos. B) los animales tuvieron un fotoperiodo de 12 h Luz/ 12 h oscuridad, con acceso al alimento en Zt 4 a Zt 6 y libre acceso a agua, los cuales fueron mantenidos por 21 días. El día 21 un grupo fue administrado de forma intraperitoneal con 0.3 ml de aceite de maíz en Zt 1, mientras que 6 animales se mantuvieron intactos.

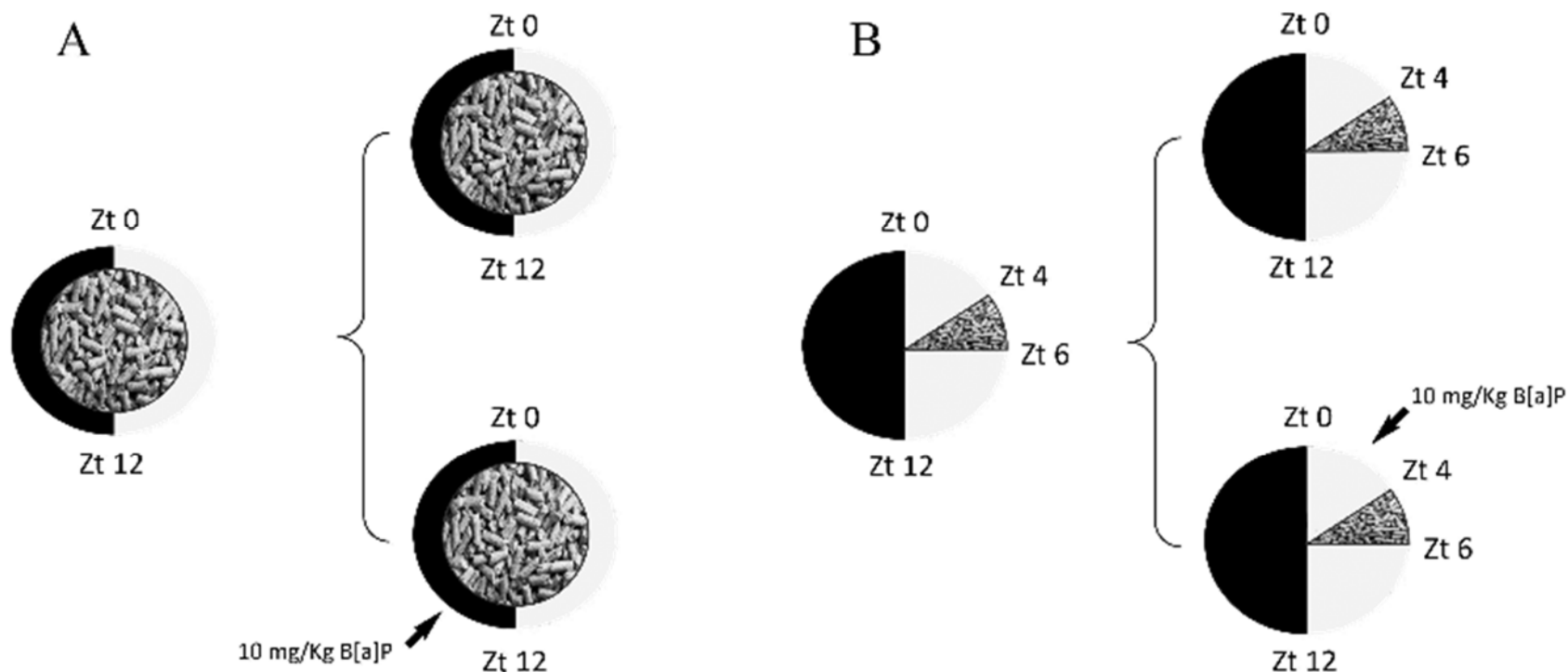


Figura 11. Esquema de administración de B[a]P en ratas con dieta *ad libitum* y restricción de alimento. A) Los animales tuvieron un fotoperiodo de 12 h Luz/ 12 h oscuridad, con libre acceso a agua y alimento, las cuales fueron mantenidos por 21 días. El día 21 un grupo fue administrado de forma intraperitoneal con 10 mg/kg de B[a]P en Zt 13, mientras que 6 animales se mantuvieron intactos. B) los animales tuvieron un fotoperiodo de 12 h Luz/ 12 h oscuridad, con acceso al alimento en Zt 4 a Zt 6 y libre acceso a agua, los cuales fueron mantenidos por 21 días. El día 21 un grupo fue administrado de forma intraperitoneal con 10 mg/kg de B[a]P en Zt 1, mientras que 6 animales se mantuvieron intactos.

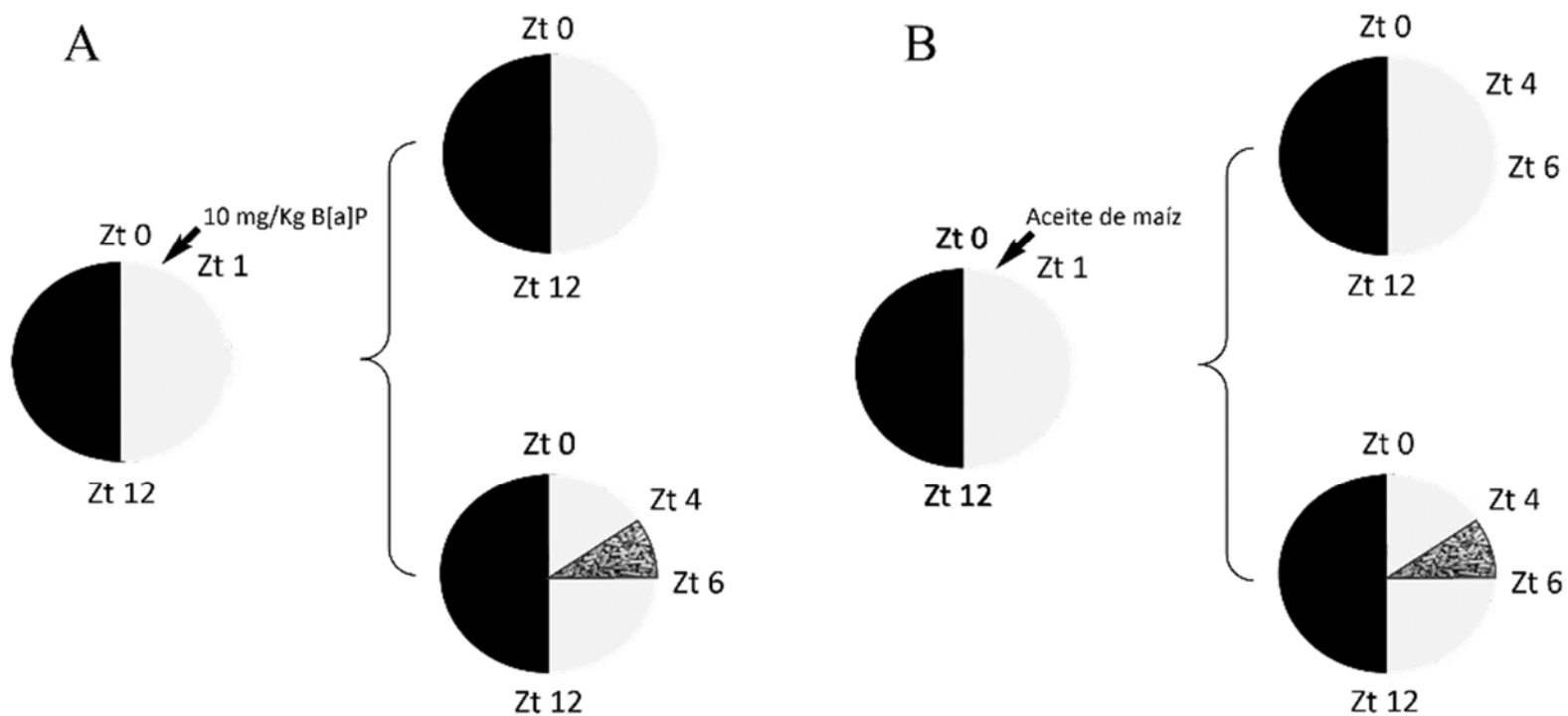


Figura 12. Esquema de administración de B[a]P en ratas con ayuno agudo y realimentación. A) Los animales tuvieron un fotoperiodo de 12 h Luz/ 12 h oscuridad, con libre acceso a agua y alimento, a los cuales se les administro de forma intraperitoneal con 10 mg/kg de B[a]P en Zt 13, y se les retiro el alimento. A 6 animales se les eutanizó a las 22 h de ayuno, mientras que 6 animales fueron alimentados por 2 h, eutanizados al final de estas 2 h. B) los animales tuvieron un fotoperiodo de 12 h Luz/ 12 h oscuridad, con libre acceso a agua y alimento, a los cuales se les administro de forma intraperitoneal con 0.3 ml de aceite de maíz en Zt 1, y se les retiro el alimento. A 6 animales se les eutanizó a las 22 h de ayuno, mientras que 6 animales fueron alimentados por 2 h, eutanizados al final de estas 2 h.

5.4 Homogenado y Fracción microsomal de hígado

Se homogenizó 2 g de hígado en 6 ml de KCl 0.15 M y se centrifugó a 9 000 x g por 20 min a 4°C en una centrífuga Beckman L-80™, y se recuperó el sobrenadante. Una parte se empleó para las pruebas de enzimas antioxidantes, mientras que el resto se centrifugó a 100 000 g por 60 min, posteriormente el botón se resuspendió en un volumen igual al inicial en un amortiguador de fosfato de potasio 0.1 M y sacarosa 25 mM a pH 7.4, el cual se centrifugó bajo las mismas condiciones. El sobrenadante fue considerado como la fracción citosólica mientras que el botón final se resuspendió en un amortiguador de fosfatos a pH 7.4, EDTA 1mM, DTT 1mM con glicerol al 20%, obteniendo así, la fracción microsomal.

5.5 Cuantificación de proteínas totales de la fracción microsomal

Se emplearon 10 µl de una dilución 1:80 de fracción microsomal o fracción citosólica en agua, se adicionaron 200 µl de una dilución 1:4 del reactivo de Bradford (BIORAD™) en agua, y se cuantificó su absorbancia a 595 nm por triplicado en un lector de placa Synergy H4™. Los datos fueron normalizados con una curva de suero fetal bovino. Los resultados se manejaron en µg de proteínas totales por µl.

5.6 Inmunodetección de CYP1A1 por Western blot

Se realizó la electroforesis de 20 µg de proteínas totales presente en la fracción microsomal en un gel de 10 % de poliacrilamida (SDS-PAGE), en presencia de un sistema discontinuo de 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 100 V por 60 min en la presencia de una solución Tris-Base 25 mM y glicina 192 mM. La membrana fue bloqueada con albúmina 1 % en un amortiguador que contenía 0.1 % Tween 20, Tris-Base 10 mM y NaCl 150 mM, por 2 h Posteriormente se incubó la membrana con un anticuerpo monoclonal anti-CYP1A1 (sc-393979, Santa Cruz™) o anti-GAPDH (sc-2354 Santa Cruz™) en una dilución 1:2000, por 1 h. Se incubó por 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (Gt IgG H+L HRP) en una dilución 1:10 000. Los resultados son expresados en cantidad relativa de CYP1A1 con respecto a GAPDH.

5.7 Evaluación de la *O*-desalquilación de etoxirresorufina (EROD)

Esta reacción fue medida conforme al protocolo original,⁵⁰ en el que se evalúa la catálisis de etoxirresorufina a resorufina por CYP1A1, con la oxidación de NADP(H) a NADP⁺; con modificaciones para su lectura en microplaca. Se incubó a 37 °C por 3 min, una mezcla que contenía 150 µl de amortiguador Tris-Base 150 mM y MgCl₂ 25 mM, 40 g de proteína de la fracción microsomal y 5 µl de EROD de una solución 50 M, en un volumen final de 200 µl. Al finalizar esta incubación, se adicionó un volumen de 40 µl de NADP(H) 5 mM para iniciar la reacción enzimática. Se detectó la fluorescencia a 585 nm con una excitación de 520 nm en un lector de placa Synergy H4™. Los resultados son expresados pmol de resorufina por mg de proteína por min⁻¹.

5.8 Extracción de DNA de hígado para cuantificación de aductos de BPDE

Se utilizó una porción de 200 mg de hígado, el cual fue homogenizado en un buffer que contenía 0.35 M de sacarosa, Tris-base 30 mM, EGTA 2 mM a pH 7.4, y se centrifugó por 10 min a 12 000 g a 4°C. El precipitado se resuspendió en un amortiguador de Tris-base 10 mM, EDTA 10 mM, NaCl 100 mM y SDS al 2% a pH 8.0, con 10 µl de Proteinasa K de una solución de 20 mg/mL y se incubó a 57 °C por 2 h. Al finalizar se agregaron 800 µl de una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó y se centrifugó a 11 000 x g a 4°C por 10 min; al término se recuperó el sobrenadante, se adicionaron 3 µl de RNAsa y se dejó reposar por 60 min a temperatura ambiente. A continuación, se agregó un volumen de 500 µl de la mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, se centrifugó a 11 000 x g a 4°C por 10 min y se recuperó el sobrenadante, se añadió 1 mL de etanol al 70% y se centrifugó por 10 min a 14 000 x g, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón en agua libre de DNAsa y RNAsa.

5.9 Extracción de RNA de hígado

El RNA total fue aislado de 200 mg de hígado por medio del reactivo TRIzol™ de acuerdo con las instrucciones del fabricante.⁵⁰ Se verificó su integridad por medio de una electroforesis en un gel de agarosa (BioRad™) al 2%.

5.10 Cuantificación de ácidos nucleicos

Tanto el DNA como el RNA extraído del hígado de rata fueron cuantificados y se determinó su pureza en un nanodrop modelo 2000 (Thermocientific™). Para el DNA se consideró como nivel aceptable un valor de 1.8-2 en la razón 260/280 nm, y para RNA, un valor superior a 2.

5.11 Cuantificación de mRNA CYP1A1 por RT-PCR

La retrotranscripción fue realizada por el método de Transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MVLRT) (Thermoscientific™) conforme a las instrucciones del fabricante en un termociclador T100 (Thermal Cycler, Biorad™). La reacción de PCR cuantitativo fue realizada con TaqMan Master Mix, con la sonda para CYP1A1 (Foward: 5'-gggccaagagcttctttgatg-3', Reverse: 5'-gtcccggatgrggcccttctcaaa-3') y RPS18 (Foward: 5'-ttcagcacatcctgagta-3', Reverse: 5'-ttggtgaggtcaatgtctgc-3') en el equipo Corbett Rotor-Gene 6000™ siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad relativa de mRNA fue calculada usando el análisis $2^{-\Delta\Delta CT}$.⁵² Los resultados fueron expresados en cantidad relativa de mRNA de CYP1A1 con respecto al mRNA de RPS18.

5.12 Cuantificación de aductos de B[a]P

La cuantificación de los aductos de B[a]P en DNA se realizó por medio del Kit OxiSelect™ BPDE DNA adduct Elisa (# de catálogo STA-357), de acuerdo con las condiciones del fabricante a una longitud de onda de 450 nm en un lector de placa Synergy H4™. Los resultados son presentados en número de aductos por cada 10^8 nucleótidos.

5.13 Cuantificación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

La cuantificación de TBARS fue calculada a partir de la formación de aductos entre el malondialdehído y 2 moléculas de TBARS. Se utilizó un volumen de 200 ml de homogenado al cual se le añadió 10 ml de una solución de 1M2F 15.4 mM, 150 ml de HCl concentrado, se incubó a 45°C por 40 min, y se centrifugó a 3 000 g por 15 min a 14 °C. Al finalizar se cuantificó la absorbancia a 586 nm del sobrenadante por triplicado en un lector de placa Synergy H4™. Los datos fueron normalizados con una curva de

TMPO. Los datos son expresados como nano moles por mg de proteína (nmol/ mg de proteína).

5.14 Evaluación de la actividad de superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de la superóxido dismutasa (SOD) fue calculada basados en la oxidación de la xantina. Se utilizó un volumen de 41.2 μl de homogenado al cual se le añadió 7 μl de Xantina oxidasa, 25 μl de CuCl_2 3.2 mM y 200 μl de una solución de xantina 3 mM, NBT 150 μM , EDTA 0.6 mM; y se cuantificó la absorbancia a 560 nm por triplicado en un lector de placa Synergy H4™. Los datos son expresados como unidades de CAT por mg de proteína (U/ mg de proteína).

5.15 Evaluación de la actividad de catalasa (CAT)

La actividad de catalasa (CAT) fue calculada a partir de la descomposición del H_2O_2 . Se utilizó un volumen de 12 μl del homogenado en una dilución 1:50 al cual se le añadió 338 μl de H_2O_2 30 mM. Se tomaron lecturas en intervalos de 10 s por

3 min a una absorbancia de 240 nm en un lector de placa Synergy H4™. Los datos son expresados como unidades de CAT por mg de proteína (U/ mg de proteína).

5.16 Evaluación de la actividad de glutatión peroxidasa (GPx)

La actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) fue calculada a partir de la oxidación del NADPH. Se utilizó un volumen de 36 μl de homogenado en una dilución 1:50 al cual se le añadió 288 μl de una solución EDTA 0.6 mM, GSH 1 mM y azida de sodio 1 mM. Posteriormente se añadió NADPH 0.2 mM y 1 volumen de GSH reductasa, para iniciar la reacción se añadió 36 μl de H_2O_2 1.25 mM. Se cuantificó la absorbancia a 340 nm en un lector de placa Synergy H4™. Los datos son expresados como unidades de GPx por mg de proteína (U/ mg de proteína).

5.17 Evaluación de la actividad de glutatión reductasa (Gr)

La actividad de la glutatión peroxidasa (GR) fue calculada a partir de la oxidación del NADPH. Se utilizó un volumen de 16.5 µl del homogenado en una dilución 1:10 al cual se le añadió 315 µl de una solución con EDTA 0.5 mM, 2.5 mM de glutatión reducido y NADPH 10 µM. Se cuantificó la absorbancia en 340 nm en un lector de placa Synergy H4™. Los datos son expresados como unidades de GR por mg de proteína (U/ mg de proteína).

5.18 Evaluación de la función hepática

A partir de la sangre, el suero fue separado por centrifugación a 6 000 x g por 15 min. Después las muestras fueron colocadas en un autoanalizador (Dimension AR, Dade Behring Inc., Newark, DE, USA). Donde fue analizada la actividad de aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), lactato deshidrogenasa (LDH), proteínas totales, albúmina, bilirrubina total y bilirrubina directa fueron medidas por adaptación del método recomendado por la Federación Internacional de Química Clínica,⁵³ cuyo fundamento se describe a continuación:

La actividad de AST se calculó a partir de la formación de oxalacetato durante la transferencia de un grupo amino del L-aspartato al α -cetoglutarato. El oxalacetato es reducido a malato en la presencia de malato deshidrogenasa con la oxidación de NADH a NAD⁺. Se detectó caída de la absorbancia a 340 nm. Los datos son expresados como unidades de AST por decilitro de suero (U/dL).

La actividad de ALT se calculó de la formación de la transferencia de un grupo amino de la L-alanina al α -cetoglutarato con la formación de glutamato y piruvato. El piruvato producido es reducido a lactato en presencia de lactato deshidrogenasa y la oxidación de NADH a NAD⁺. Se detectó caída de la absorbancia a 340 nm. Los datos son expresados como unidades de ALT por decilitro de suero (U/dL).

La actividad de LDH esta cataliza la reducción de L-lactato a piruvato con la reducción de NAD⁺ a NADH. Se detectó el incremento de la absorbancia a 340 nm. Los datos son expresados como unidades de LDH por decilitro de suero (U/dL).

Las proteínas totales del suero fueron cuantificadas por la reacción entre el grupo los enlaces peptídicos y el sulfato de cobre, la cual fue detectada por absorbancia a 540 nm. Los datos son expresados como mg de proteína por decilitro de suero (mg/dL).

La albúmina fue cuantificada por la combinación con el verde de bromocresol. Dicho cambio de color de (de amarillo a azul) fue detectada por absorbancia a 630 nm. Los datos son expresados como nano moles de albúmina por decilitro de suero (nmol/dL).

La bilirrubina total se detectó por la formación de azobilirrubina, a partir de la bilirrubina y el ácido sulfanílico diazotado.

La bilirrubina directa se cuantifico en solución acuosa, mientras que la bilirrubina indirecta requirió la adición de DMSO. Ambas cuantificaciones fueron detectadas por absorbancia a 555 nm. Los datos son expresados como mg de bilirrubina por decilitro de suero (mg/dL).

5.19 Cuantificación de B[a]P en hígado

Se emplearon 40 µl de homogenado de hígado a los cuales se les añadió 160 µl de DMSO y se detectó la fluorescencia a 470 nm con una excitación de 380 nm. Los datos fueron normalizados con una curva de B[a]P en DMSO.

5.20 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado usando el software GraphPad Prism (V 6.0; San Diego, CA). La normalidad fue determinada por medio de la prueba de Kolmogorov-Smirnov. El análisis para los resultados derivados de las pruebas realizados en los tiempos posteriores a la administración se realizó por medio del análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido por la prueba post hoc de Bonferroni. Las comparaciones entre grupos en los mismos horarios fueron realizados a través de la prueba t-Student. La diferencia entre grupos fue establecida en un valor de $p \leq 0.05$. Los datos son presentados por la media \pm error estándar.

6. Resultados

6.1 Determinación del horario de administración

A partir de los datos que reportamos previamente,⁴³ determinamos la acrofase, mesor y amplitud de la cantidad de mRNA de CYP1A1 en ratas con dieta *ad libitum*, así como dieta con restricción de alimento, por medio del análisis de cosinor.⁴⁸

Se observó que las ratas con dieta *ad libitum* presenta un punto máximo de transcripción basal de CYP1A1 en el Zt 17, mientras que en las ratas restricción de alimento (acceso al alimento de Zt 4 a Zt 6) presentaron una acrofase en el Zt 5. Adicionalmente, se tiene reportado tras una administración ip, el compuesto de interés es adsorbido por el hígado después de 2 h de la administración.⁵⁴ Por lo que determinamos que la exposición a B[a]P se realizara 4 h de la acrofase de cada grupo, con el propósito de garantizar la adsorción del B[a]P por el hígado.

6.2 Grupo control

Debido al gran número de animales que se manejaron, los grupos AL+AM, AL+I, RA+AM, RA+I, fueron incluidos en un experimento preliminar donde se evaluó el efecto del aceite de maíz, vehículo donde fue disuelto el B[a]P, en la inducción de CYP1A1, siendo los parámetros evaluados el mRNA y la *O*-desalquilación de EROD.

Tanto en el grupo AL+AM y AL+I, no se observaron diferencias en la transcripción de CYP1A1, así como en la *O*-desalquilación de EROD; mientras que los grupos RA+AM y RA+I, tampoco presentaron diferencias. Estos resultados sugieren que el proceso de administración ip, así como el vehículo no promueven la inducción de CYP1A1.

Tabla 1. Parámetros cronobiológicos obtenidos por el análisis de cosinor para el efecto de una dieta ad libitum (AL), y una restricción de alimento (RA) en la cantidad de CYP1A1.

	CYP1A1	
	AL	RA
MESOR	0.055 ± 0.009	0.205 ± 0.031
AMPLITUD	0.056 ± 0.018	0.207 ± 0.041
ACROFASE	Zt 17	Zt 5

Tabla 2. Cantidad de mRNA de CYP1A1 (CYP1A1/RPS18) y actividad de CYP1A1 (pmol de resorufina por miligramo de proteína por minuto) en hígado de ratas con una dieta ad libitum (AL) o restricción de alimento (RA) administrados con 0.3 ml de aceite de maíz.

	INTACTAS		ACEITE DE MAÍZ	
	AL	RA	AL	RA
CYP1A1/RPS18	0.0043 ±	0.0400 ±	0.0046 ±	0.0394 ±
	0.0003	0.0020	0.0010	0.0050
ACTIVIDAD DE CYP1A1	0.0069 ±	0.0094 ±	0.0067 ±	0.0096 ±
	0.0002	0.0001	0.0001	0.0001

6.3 Cantidad de mRNA, proteína y actividad de CYP1A1 hepático

Existe evidencias que el B[a]P a través de la vía de señalización del AHR, incrementa la cantidad de proteína CYP1A1, con ello acelera su biotransformación.¹⁵ Con esta idea evaluamos la cantidad de del mRNA, proteína y actividad enzimática de CYP1A1 en hígado de ratas del grupo AL y grupo RA expuestos a 10 mg/kg de B[a]P.

En el grupo AL, el mRNA de CYP1A1 presentó un incremento a las 24 h después de la exposición al B[a]P y regresó a los valores basales a las 48 h; mientras que la proteína y la actividad enzimática también se elevaron a las 24 h, pero se sostuvieron hasta las 72 h después de la exposición a B[a]P ($p \leq 0.05$).

En el grupo con restricción de alimento, si bien los 3 parámetros presentaron un incremento a las 24 h, estos fueron menores (un 70%) en comparación con los observados en el grupo AL ($p \leq 0.05$) (Figura 13).

En los grupos Ay y Re expuestos al B[a]P, la cantidad de mRNA de CYP1A1 fue menor con respecto al grupo AL expuesto a B[a]P ($p \leq 0.05$). Sin embargo, este cambio no se reflejó en la actividad de CYP1A1 (figura 14).

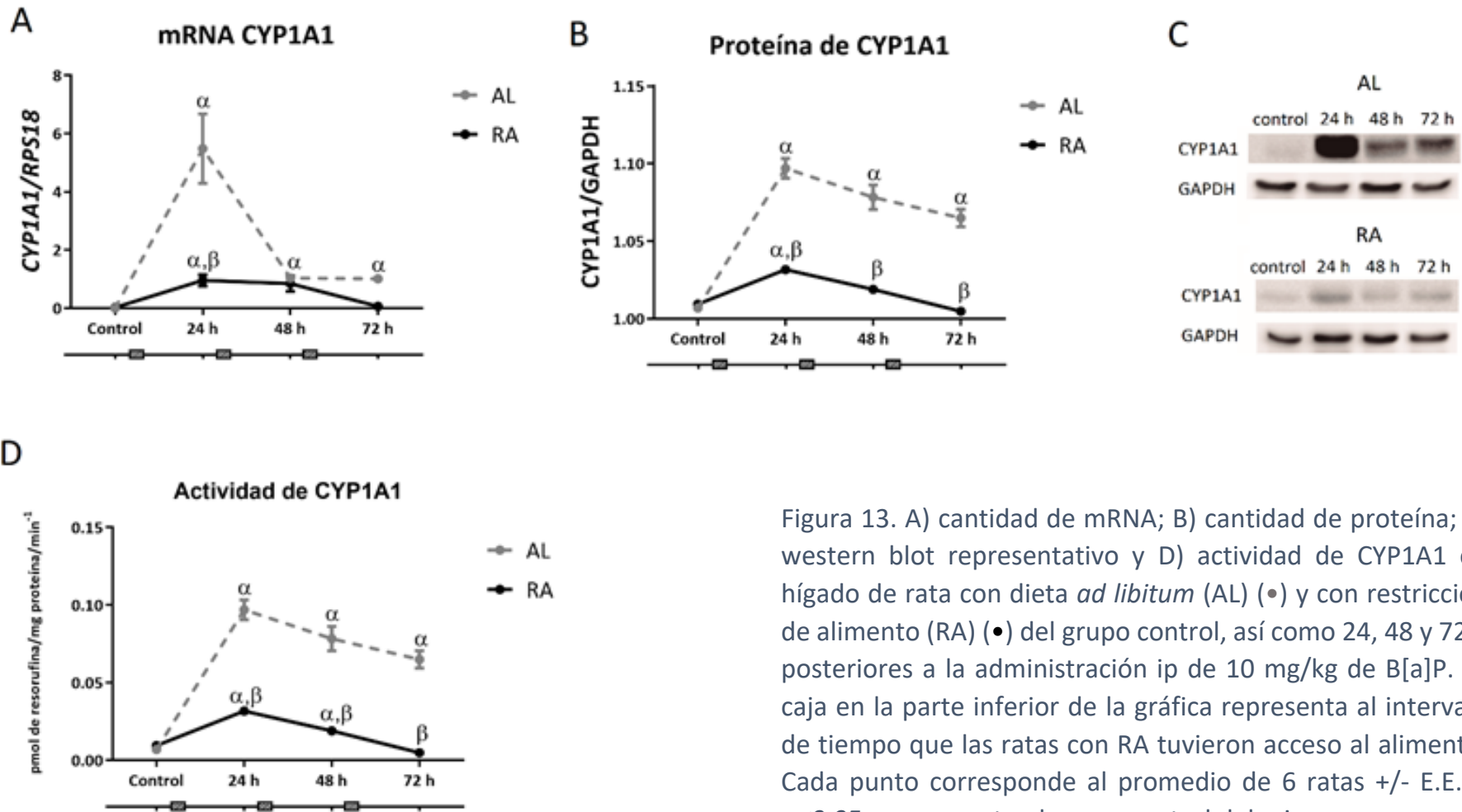


Figura 13. A) cantidad de mRNA; B) cantidad de proteína; C) western blot representativo y D) actividad de CYP1A1 en hígado de rata con dieta *ad libitum* (AL) (•) y con restricción de alimento (RA) (•) del grupo control, así como 24, 48 y 72 h posteriores a la administración ip de 10 mg/kg de B[a]P. La caja en la parte inferior de la gráfica representa al intervalo de tiempo que las ratas con RA tuvieron acceso al alimento. Cada punto corresponde al promedio de 6 ratas +/- E.E. α $p \leq 0.05$ con respecto al grupo control del mismo esquema de alimentación y β $p \leq 0.05$ con respecto al grupo AL en el mismo tiempo.

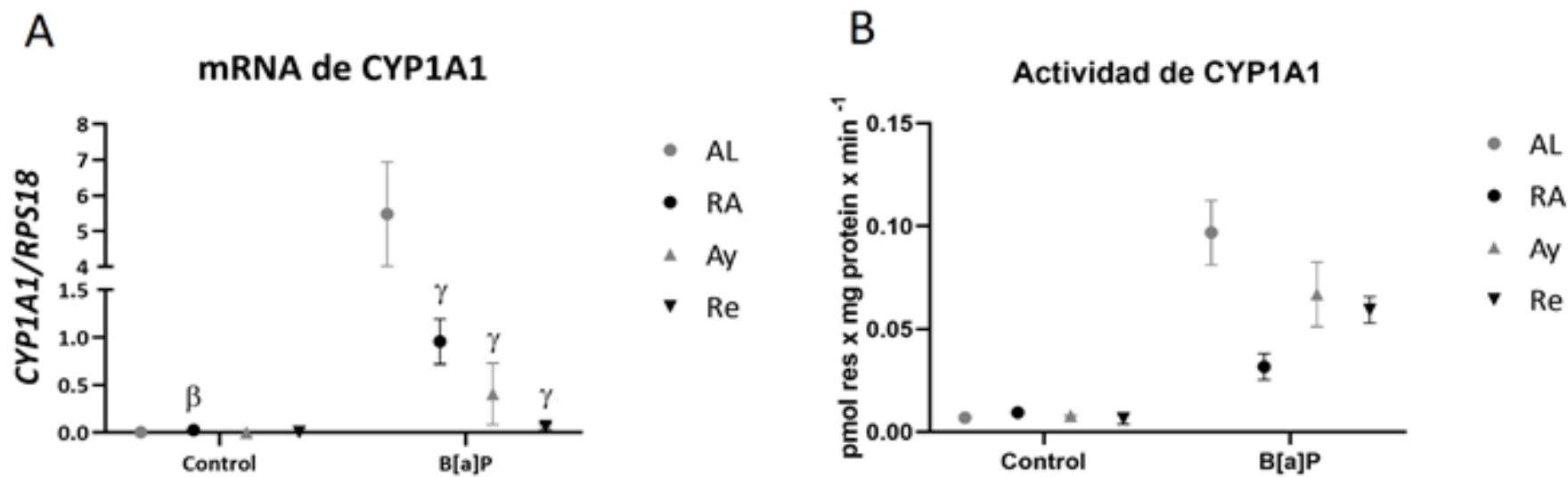


Figura 14. Cantidad de mRNA de CYP1A1 (A) y actividad de CYP1A1 (B) en hígado de rata con dieta *ad libitum* (AL) (●); con restricción de alimento (RA) (●); con un ayuno de 22 h (Ay) (▲) y con un ayuno de 22 h seguido de una realimentación de 2 h (Re) (▼) en el grupo control. En el grupo B[a]P se aplicaron los mismos esquemas de alimentación, después de una administración ip de 10 mg/kg de B[a]P. Cada punto corresponde al promedio de 6 ratas +/- E.E. β $p \leq 0.05$ con respecto al grupo AL en el mismo tiempo y γ $p \leq 0.05$ con respecto al grupo AL expuesto a B[a]P.

6.4 Formación de aductos de BPDE en el DNA

El principal metabolito de la biotransformación del B[a]P es el BPDE, el cual posee alta reactividad con el DNA,⁵⁵ por lo que es considerado un compuesto mutagénico y carcinogénico.¹⁰ Con esta idea evaluamos la presencia de aductos en DNA.

En el grupo AL observamos a las 48 h posteriores a la administración del B[a]P el punto máximo de acumulación de aductos en el DNA ($p \leq 0.05$, con respecto al grupo AL control), reduciendo su presencia en las horas posteriores. Mientras que el grupo RA presentó el mismo patrón que el grupo AL, sin embargo a las 48 h, la acumulación fue en menor magnitud con respecto al grupo AL en el mismo horario ($p \leq 0.05$) (Figura 15A). A su vez, el grupo Ay y Re no presentaron diferencias con respecto al grupo AL o RA (Figura 15B).

Con el objetivo de determinar si la reducción de de aductos de B[a]P en DNA observada en el grupo con RA responde a dosis más altas de B[a]P, repetimos el protocolo de RA con la modificación de que en el día 21 fueron administrados con 50 o 100 mg/kg de B[a]P, 6 animales con alimentación AL (21:00 h) y 6 animales con RA (09:00 h), y fueron eutanizados a las 48 h posteriores a su respectiva administración. Se eligió este horario, ya que en nuestros datos se observa que la mayor incidencia de aductos de BPDE en el DNA es a las 48 h posteriores a la administración de 10 mg/Kg de B[a]P. Similar a lo observado con la dosis de 10 mg/kg, la restricción de alimento también atenuó la formación de aductos de B[a]P en DNA en la dosis de 50 mg/kg ($p \leq 0.05$) (Figura 16).

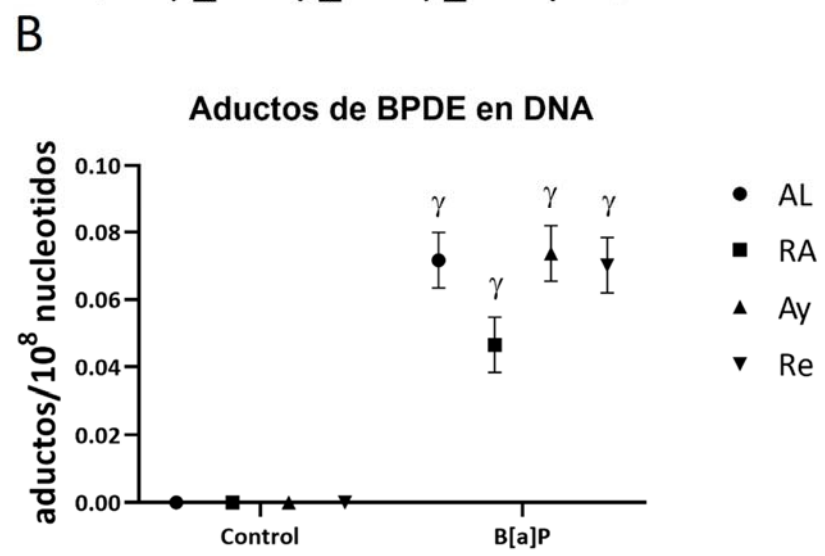
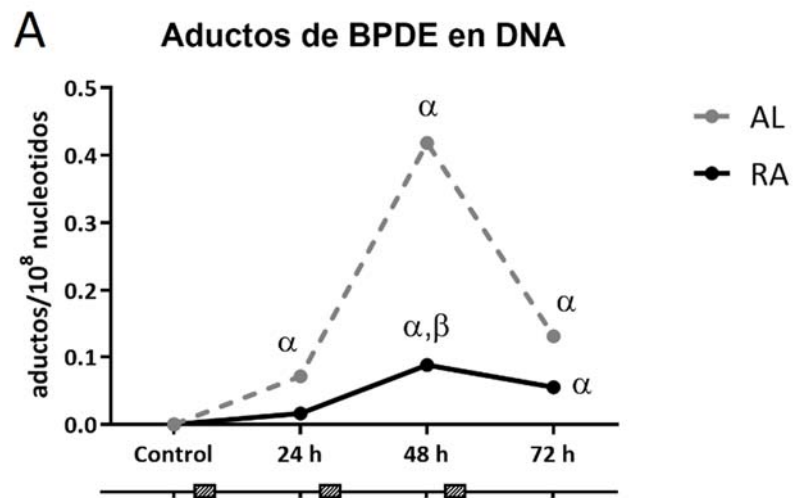


Figura 15. Cantidad de aductos de BPDE en DNA de hígado de rata con dieta *ad libitum* (AL) (●) y con restricción de alimento (RA) (●) posterior a una administración ip de 10 mg/kg de B[a]P (A). La caja en la parte inferior de la gráfica representa al intervalo de tiempo que las ratas con RA tuvieron acceso al alimento. Cantidad de aductos de B[a]P en DNA en hígado de rata con dieta *ad libitum* (AL) (●); con restricción de alimento (RA) (●); con un ayuno de 22 h (Ay) (▲) y con un ayuno de 22 h seguido de una realimentación de 2 h (Re) (▼) en el grupo control. En el grupo B[a]P, Se aplicaron los mismos esquemas de alimentación, después de una administración ip de 10 mg/kg de B[a]P (B). Cada punto corresponde al promedio de 6 ratas +/- E.E. α $p \leq 0.05$ con respecto al grupo control del mismo esquema de alimentación y β $p \leq 0.05$ con respecto al grupo AL en el mismo horario.

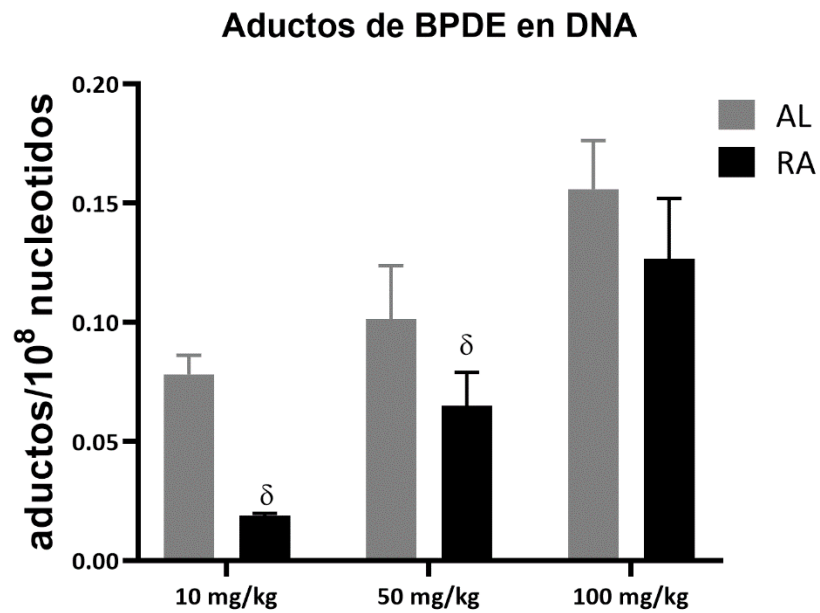


Figura 16, niveles de aductos de BPDE en DNA de hígado de rata con dieta *ad libitum* (AL) (•) y con restricción de alimento (RA) (•) posterior a una administración ip de 10, 50 o 100 mg/kg de B[a]P. Cada barra corresponde al promedio de 6 ratas +/- E.E. $\delta p \leq 0.05$ con respecto al grupo AL en la misma dosis.

6.5 Actividad de enzimas antioxidantes en hígado

Durante la biotransformación del B[a]P, se producen metabolitos que pueden modificar la cantidad de enzimas antioxidantes, así como alterar el balance de las reacciones prooxidantes-antioxidantes.^{56, 57} Con esta idea decidimos evaluar la funcionalidad de dichas enzimas, así como la formación de TBARS.

6.5.1 Formación de TBARS en hígado

En el grupo AL observamos un incremento de TBARS a las 48 h posteriores a la administración del B[a]P ($p \leq 0.05$, con respecto al grupo AL control), para regresar a los valores basales en las 24 h subsecuentes. Mientras que en el grupo RA, la formación de TBARS se mantuvo sin variaciones significativas a lo largo de las 72 h (Figura 17).

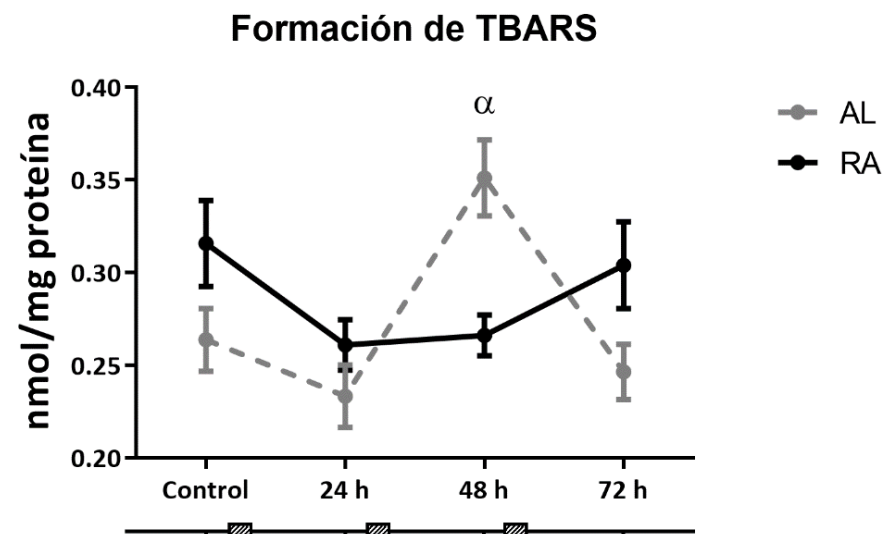


Figura 17. Formación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en hígado de rata con dieta *ad libitum* (AL) (•) y con restricción de alimento (RA) (•) del grupo control, así como 24, 48 y 72 h posteriores a una administración ip de 10 mg/kg de B[a]P. La caja en la parte inferior de la gráfica representa al intervalo de tiempo que las ratas con RA tuvieron acceso al alimento. Cada punto corresponde al promedio de 6 ratas +/- E.E. α $p \leq 0.05$ con respecto a 0 h del mismo grupo y β $p \leq 0.05$ con respecto al grupo control del mismo esquema de alimentación.

6.5.1 Actividad de SOD

En el grupo con alimentación AL no observamos modificaciones en la actividad de SOD durante las 72 h posteriores a la administración del B[a]P ($p \leq 0.05$, con respecto al grupo AL control). Mientras que en el grupo con RA la actividad disminuyó a las 48 h, $p \leq 0.05$, con respecto al grupo RA control (Figura 18A).

6.5.2 Actividad de CAT

En el grupo AL no observamos modificaciones en la actividad de CAT durante las 72 h posteriores a la administración del B[a]P ($p \leq 0.05$, con respecto al grupo AL control). En el grupo RA la actividad de CAT se observó incrementada con respecto al grupo AL, para disminuir tras 24 h posteriores a la administración del B[a]P, y se mantuvo así hasta las 72 h ($p \leq 0.05$, con respecto al grupo RA control) (Figura 18B).

6.5.3 Actividad de GPx

En ambos grupos (AL y RA), observamos una disminución en la actividad de la enzima a las 48 h posteriores a la administración del B[a]P ($p \leq 0.05$, con respecto a su grupo control), para regresar a los valores basales en las 24 h subsecuentes (Figura 19A). Sin embargo, no encontramos diferencias entre los grupos.

6.5.4 Actividad de Gr

Tanto en el grupo AL como en el grupo RA no observamos modificaciones en la actividad de GR durante las 72 h posteriores a la administración del B[a]P (Figura 19B).

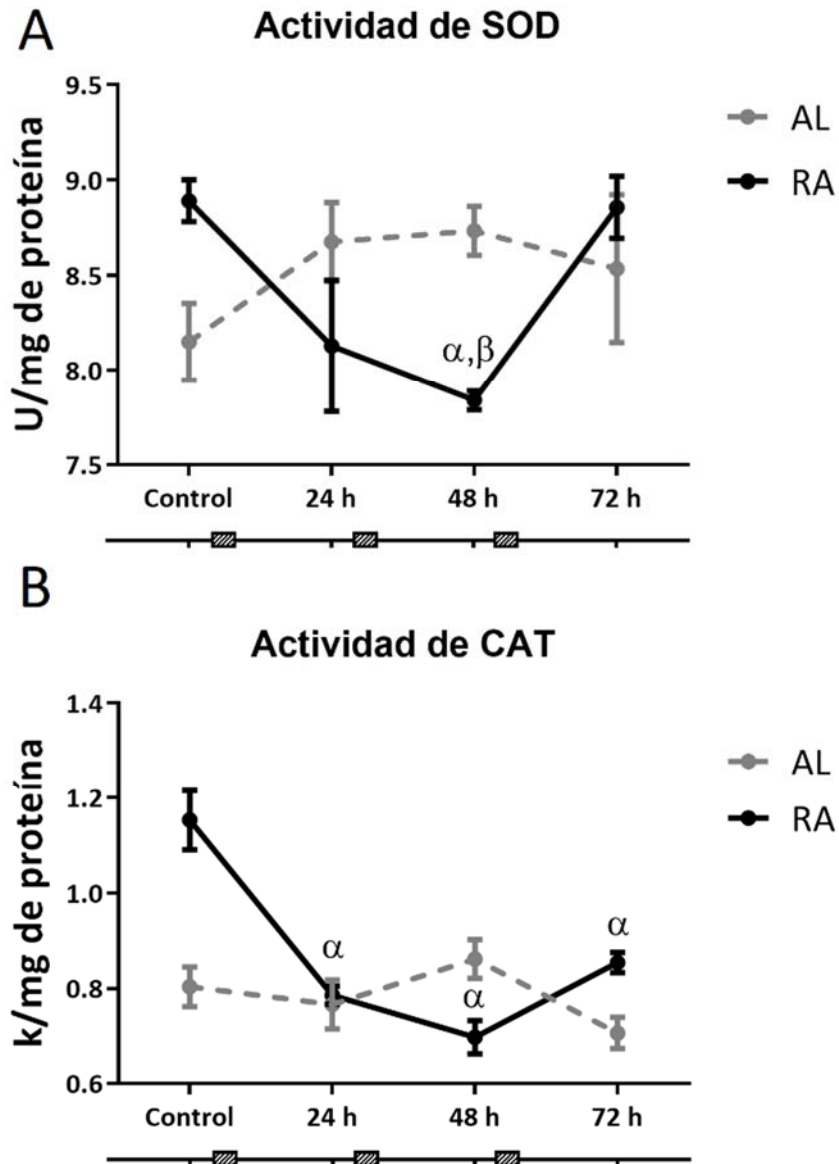


Figura 18. Actividad de superóxido dismutasa (SOD) (A) y actividad de catalasa (CAT) (B) en hígado de rata con dieta *ad libitum* (AL) (•) y con restricción de alimento (RA) (•) del grupo control, así como 24, 48 y 72 h posteriores a una administración ip de 10 mg/kg de B[a]P. La caja en la parte inferior de la gráfica representa al intervalo de tiempo que las ratas con RA tuvieron acceso al alimento. Cada punto corresponde al promedio de 6 ratas +/- E.E. α $p \leq 0.05$ con respecto al grupo control del mismo esquema de alimentación y β $p \leq 0.05$ con respecto al grupo AL en el mismo tiempo.

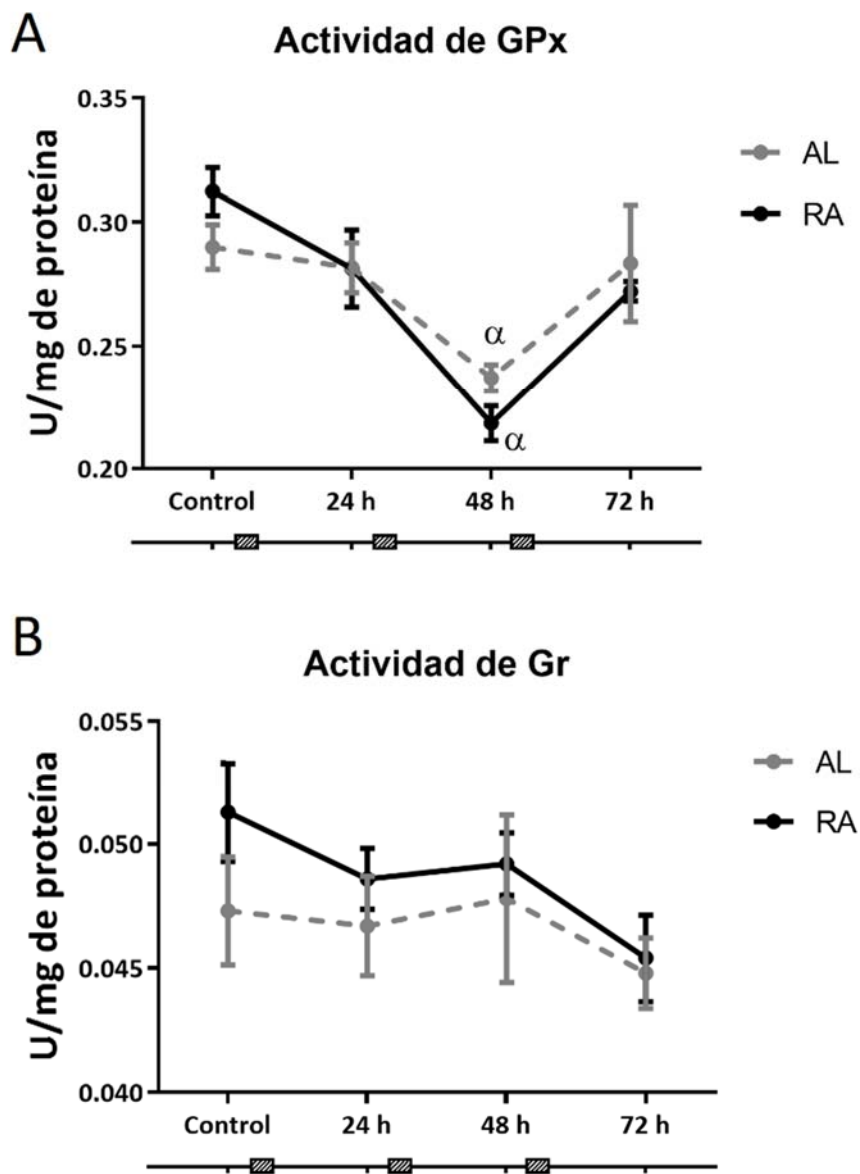


Figura 19. Actividad de glutatión peroxidasa (GPx) (A) y actividad de glutatión reductasa (GR) (B) en hígado de rata con dieta *ad libitum* (AL) (•) y con restricción de alimento (RA) (●) del grupo control, así como 24, 48 y 72 h posteriores a una administración ip de 10 mg/kg de B[a]P. La caja en la parte inferior de la gráfica representa al intervalo de tiempo que las ratas con RA tuvieron acceso al alimento. Cada punto corresponde al promedio de 6 ratas +/- E.E. α $p \leq 0.05$ con respecto al grupo control del mismo esquema de alimentación.

6.6 Función hepática

Con el objetivo de determinar si la reducción en el daño genotóxico observado en animales con RA se reflejaba a nivel celular en el hígado, nos apoyamos en la evaluación de la citólisis hepática por la presencia de las enzimas aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y Lactato deshidrogenasa (LDH) en suero.

En el grupo con alimentación AL, ALT y LDH incrementaron su presencia en suero a las 24 h posteriores a la administración del B[a]P, mientras que AST alcanzó su máxima abundancia en suero hasta las 48 h posteriores a la administración del B[a]P ($p \leq 0.05$).

En el grupo con RA, AST y LDH se incrementaron a las 48 h posteriores a la administración del B[a]P y regresaron a los valores basales a las 72 h; mientras que los niveles de ALT disminuyeron con respecto al grupo RA ($P \leq 0.05$) (Figura 20A, C y E).

En los grupos Ay y Re la actividad de AST no presentó diferencia con respecto a los grupos AL o RA (Figura 20B). Sin embargo, la actividad de ALT disminuyó con respecto al grupo con alimentación AL ($p \leq 0.05$), y fue mayor con respecto al grupo con RA ($p \leq 0.05$) (Figura 20D). Mientras que LDH no modificó su abundancia en suero (Figura 20F).

Mientras que las pruebas de proteínas totales séricas (Figura 21A y B), albumina sérica (Figura 21C y D), bilirrubina total y bilirrubina directa (Figura 22A, B, C y D) no presentaron cambio en ninguno de los 2 tratamientos.

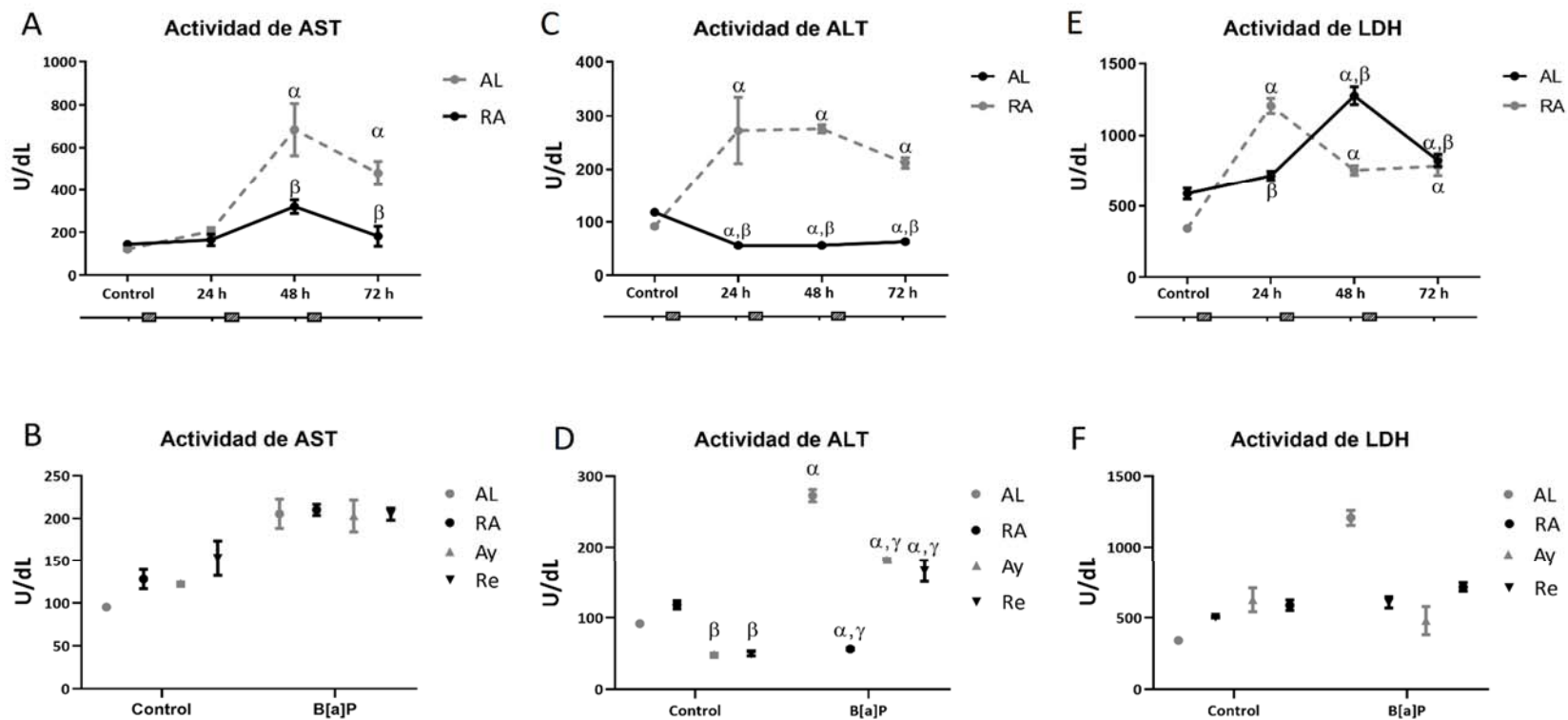


Figura 20. Actividad de AST (A), actividad de ALT (C) y actividad de LDH (E) en suero de rata con dieta *ad libitum* (AL) (●) y con restricción de alimento (RA) (●) del grupo control, así como 24, 48 y 72 h posteriores a una administración ip de 10 mg/kg de B[a]P. La caja en la parte inferior de la gráfica representa al intervalo de tiempo que las ratas con RA tuvieron acceso al alimento. Actividad de AST (B), actividad de ALT (D) y actividad de LDH (F) en suero de rata con dieta *ad libitum* (AL) (●); con restricción de alimento (RA) (●); con un ayuno de 22 h (Ay) (▲) y con un ayuno de 22 h seguido de una realimentación de 2 h (Re) (▼) en el grupo control. En el grupo B[a]P, Se aplicaron los mismos esquemas de alimentación, después de una administración ip de 10 mg/kg de B[a]P. Cada punto corresponde al promedio de 6 ratas +/- e.e. α $P \leq 0.05$ con respecto al grupo control del mismo esquema de alimentación, β $P \leq 0.05$ con respecto al grupo AL en el mismo horario y γ $P \leq 0.05$ con respecto al grupo AL expuesto a B[a]P.

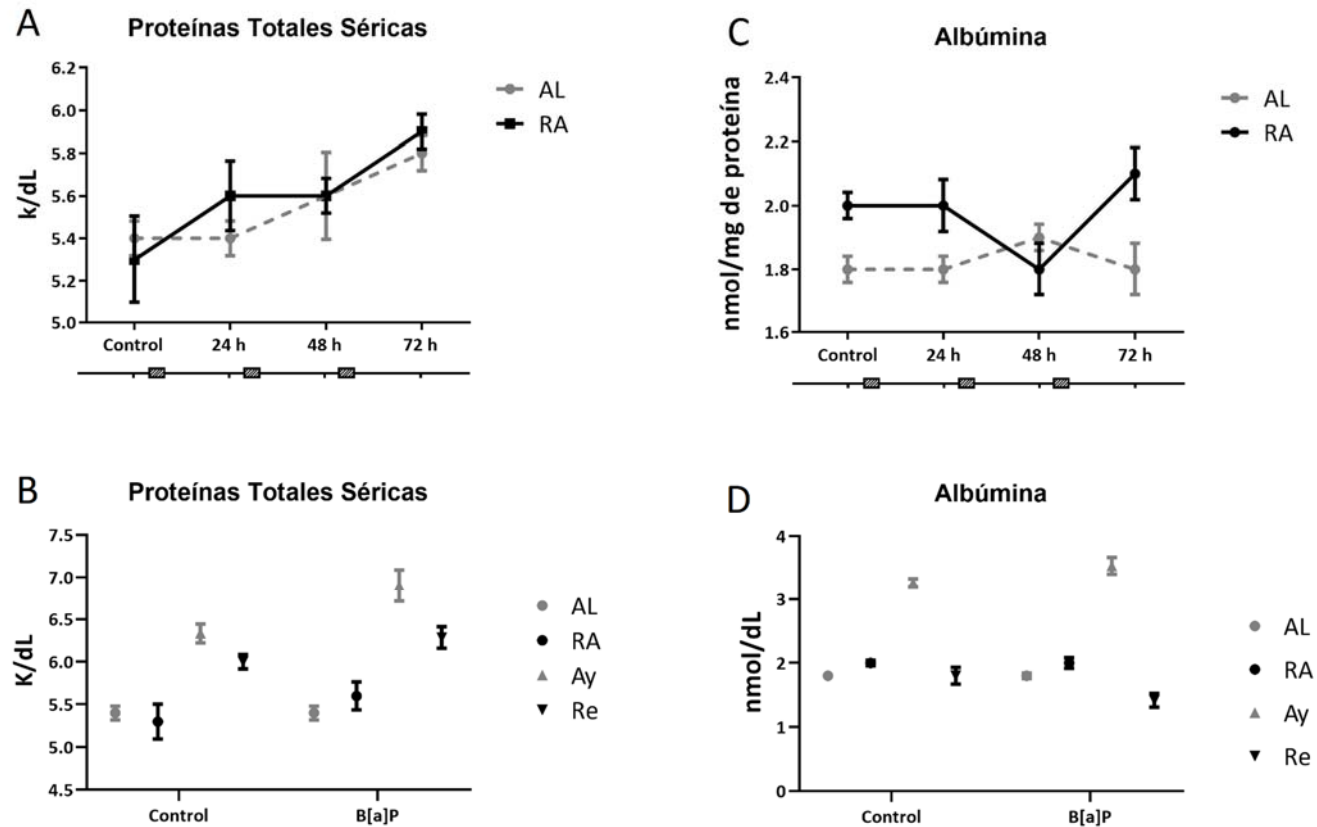


Figura 21. Proteínas totales séricas (A) y albúmina (C) en suero de rata con dieta *ad libitum* (AL) (●) y con restricción de alimento (RA) (●) del grupo control, así como 24, 48 y 72 h posteriores a una administración ip de 10 mg/kg de B[a]P. La caja en la parte inferior de la gráfica representa al intervalo de tiempo que las ratas con RA tuvieron acceso al alimento. Proteínas totales séricas (B) y albúmina (D) en suero de rata con dieta *ad libitum* (AL) (●); con restricción de alimento (RA) (●); con un ayuno de 22 h (Ay) (▲) y con un ayuno de 22 h seguido de una realimentación de 2 h (Re) (▼) en el grupo control. En el grupo B[a]P, Se aplicaron los mismos esquemas de alimentación, después de una administración ip de 10 mg/kg de B[a]P. Cada punto corresponde al promedio de 3 lecturas de 6 ratas +/- e.e.

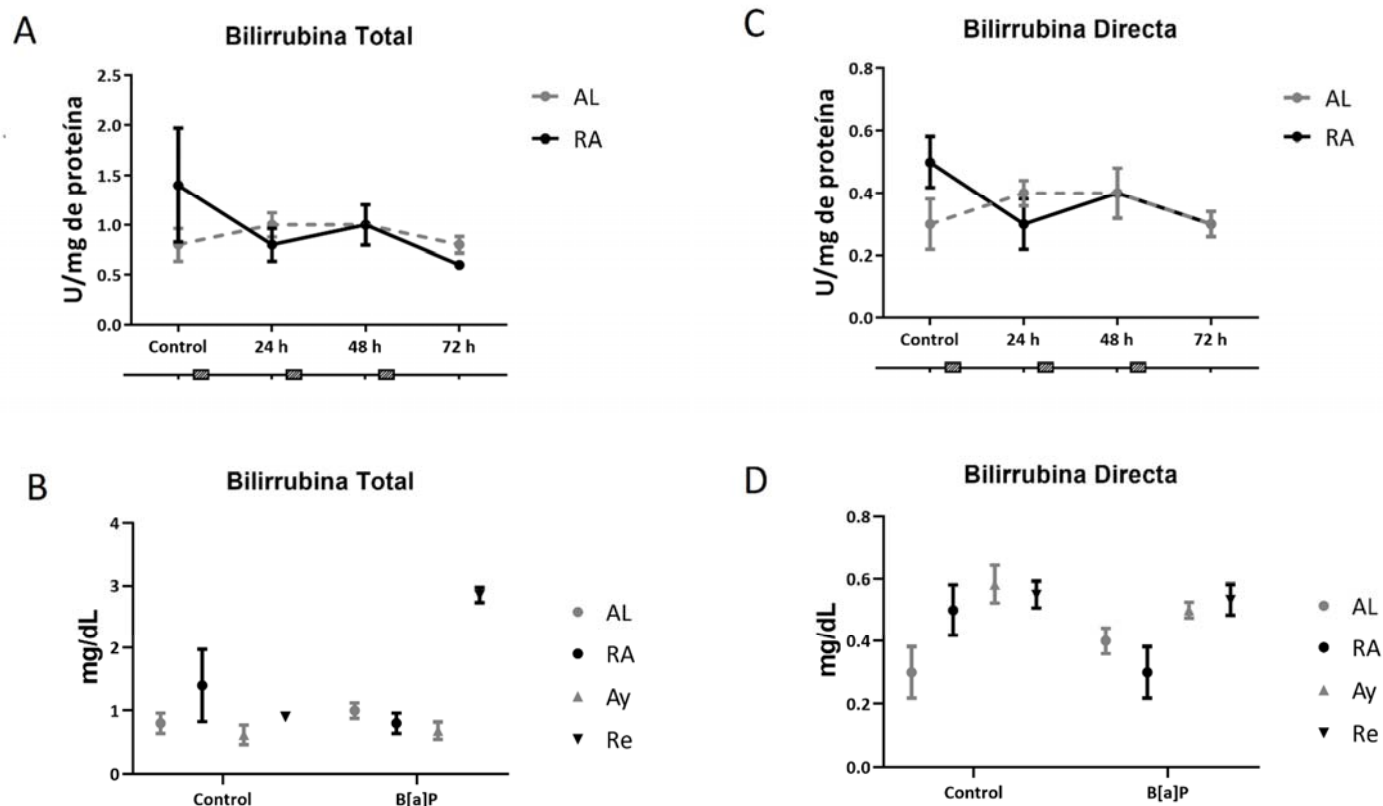


Figura 22. Bilirrubina total (A) y bilirrubina directa (C) en suero de rata con dieta *ad libitum* (AL) (●) y con restricción de alimento (RA) (●) del grupo control, así como 24, 48 y 72 h posteriores a una administración ip de 10 mg/kg de B[a]P. La caja en la parte inferior de la gráfica representa al intervalo de tiempo que las ratas con RA tuvieron acceso al alimento. Bilirrubina total (B) y bilirrubina directa (D) en suero de rata con dieta *ad libitum* (AL) (●), con restricción de alimento (RA) (●), con un ayuno de 22 h (Ay) (▲) y con un ayuno de 22 h seguido de una realimentación de 2 h (Re) (▼) en el grupo control. En el grupo B[a]P, Se aplicaron los mismos esquemas de alimentación, después de una administración ip de 10 mg/kg de B[a]P. Cada punto corresponde al promedio de 6 ratas +/- E.E.

6.7 Cantidad de B[a]P en hígado

Tras una sola exposición a B[a]P, éste puede ser acumulado en el hígado hasta por 72 h.⁸ Con esta idea decidimos cuantificar la cantidad de B[a]P que se retiene en el hígado. En la [Figura 23](#) se graficó la presencia de B[a]P posterior a la administración intraperitoneal de 10 mg/kg. En el grupo AL observamos después de la administración i.p. de 10 mg/kg de B[a]P una abundancia máxima a las 24 h la cual se redujo posteriormente. En el grupo RA observamos la misma tendencia que el grupo AL, sin embargo, el pico a las 24 h es muy inferior con respecto al grupo AL en ese mismo periodo ($p \leq 0.05$). Tanto en el grupo AL y RA se observó menor abundancia de B[a]P con respecto al grupo AL ($p \leq 0.05$); pero no con respecto al grupo con RA ([Figura 24](#)).

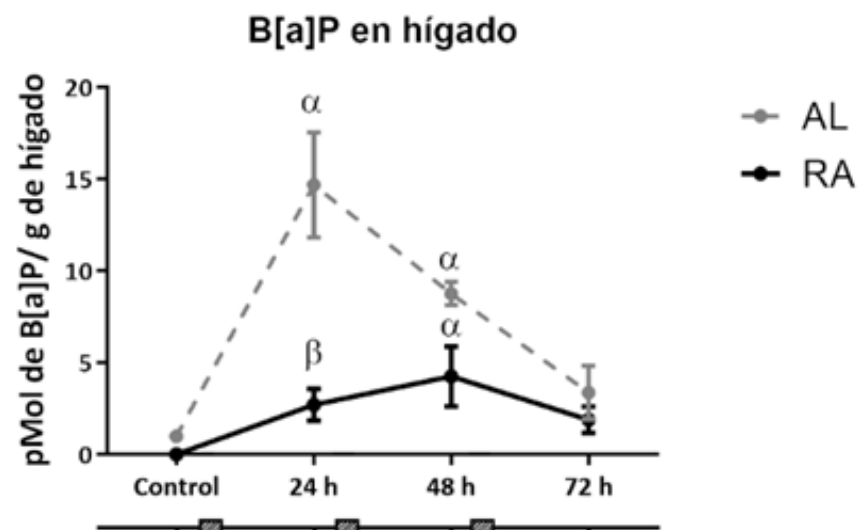


Figura 23. Cantidad de B[a]P en hígado de rata con dieta *ad libitum* (AL) (•) y con restricción de alimento (RA) (•) del grupo control, así como 24, 48 y 72 h posteriores a una administración ip de 10 mg/kg de B[a]P. La caja en la parte inferior de la gráfica representa al intervalo de tiempo que las ratas con RA tuvieron acceso al alimento. Cada punto corresponde al promedio de 6 ratas +/- E.E. α $p \leq 0.05$ con respecto al grupo control del mismo esquema de alimentación y β $p \leq 0.05$ con respecto al grupo AL en el mismo horario.

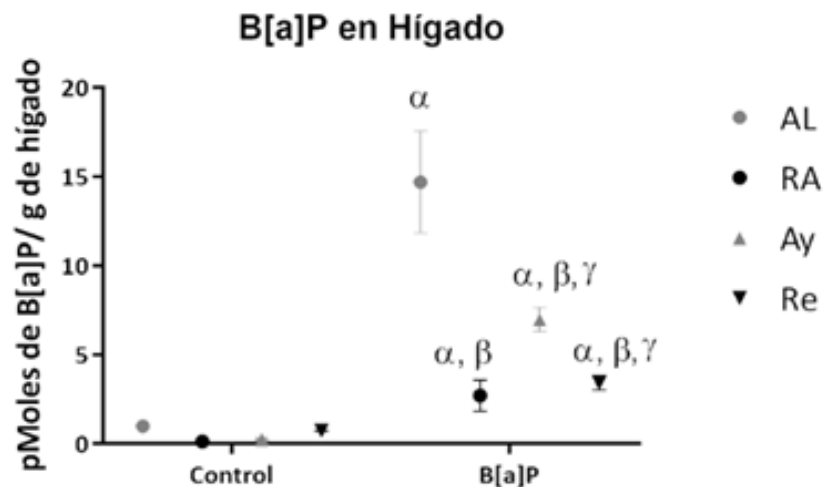


Figura 24. Cantidad de B[a]P en hígado de rata con dieta *ad libitum* (AL) (●); con restricción de alimento (RA) (●); con un ayuno de 22 h (Ay) (▲) y con un ayuno de 22 h seguido de una realimentación de 2 h (Re) (▼) en el grupo control. En el grupo B[a]P, Se aplicaron los mismos esquemas de alimentación, después de una administración ip de 10 mg/kg de B[a]P. Cada punto corresponde al promedio de 6 ratas +/- E.E. $\alpha p \leq 0.05$ con respecto al grupo control del mismo esquema de alimentación y $\beta p \leq 0.05$ con respecto al grupo AL en el mismo horario.

7. Discusión

En ratas, la transcripción de enzimas involucradas en procesos fisiológicos de aprovechamiento de nutrientes y la biotransformación de xenobióticos presenta variación temporal.³⁷ Estas se concentran durante la fase nocturna, el cual es el periodo de mayor consumo de alimento.⁵⁸ Sin embargo, si el periodo de acceso al alimento se desplaza al periodo de luz (restricción de alimento), el patrón de la cantidad de las enzimas involucradas en el metabolismo se ajusta al periodo de acceso al alimento de forma independiente a la señal del SCN.⁴⁶

Previamente, demostramos que animales con RA (acceso al alimento de Zt 4 a Zt 6) presentan un cambio de fase en la cantidad de mRNA de CYP1A1 (acrofase en Zt 6, mientras que en *ad libitum* Zt 16) asociado al periodo de acceso al alimento.⁴³ Adicionalmente, se asocia una alta cantidad de CYP1A1 con el daño genotóxico derivado de la bioactivación de PAH.⁵⁹ Con esta idea, decidimos evaluar si existe diferencia en la capacidad de inducción de CYP1A1 durante su acrofase en ratas con RA, con respecto a la

presentada en ratas con dieta AL. Para ello, nos enfocamos en la cantidad de mRNA y proteína de CYP1A1, así como su actividad, en indicadores de daño como lo son la formación de aductos en DNA hepático y actividad de biomarcadores séricos de daño hepático.

En un reporte previo⁶⁰ se observó que tanto la proteína como la actividad de CYP1A1 hepático se incrementan después de la exposición al 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (un ligando de AHR) y que este efecto se mantiene por varios días. De forma similar, la proteína y actividad de CYP1A1 se incrementaron después de una sola administración de B[a]P en ratas con dieta AL. Si bien el incremento del mRNA de CYP1A1 en las ratas con RA sugería las condiciones para un aumento en la inducción de CYP1A1 por B[a]P, la inducción de CYP1A1 en ratas con RA y administradas con B[a]P fue menor que lo observado en ratas con alimentación AL.

En el caso particular de nuestro protocolo, la restricción de alimento incluye dos características: a) una ingesta calórica reducida y b) periodicidad en la disponibilidad de

alimentos.⁶¹ Informes anteriores muestran que una ingesta calórica baja contribuye a la longevidad y a múltiples beneficios para la salud,⁶¹ sin embargo, aumenta la actividad de CYP1A1,⁶² y con ello incrementando la biotransformación del B[a]P así como los aductos de BPDE-DNA.⁶³ Los resultados del presente estudio contrastan con lo reportado previamente,⁶⁴ los animales bajo restricción calórica presentan mayor actividad de CYP1A1 con respecto al grupo control expuesto a B[a]P. Esta diferencia entre lo anteriormente mencionado y nuestros resultados son evidencia para apoyar que la RA modula diferentes vías de señalización con respecto a una restricción calórica. Si bien, se requiere más estudio en la conexión que se tiene entre las proteínas del reloj molecular y la periodicidad en la alimentación durante un protocolo de RA, un posible mediador son las enzimas modeladoras de cromatina, ya que estas responden al estado energético y podrían estar modulando la misma actividad de las proteínas del reloj molecular.^{41, 61}

Previamente, se observó que un ayuno agudo y un ciclo de ayuno-realimentación no modifica la cantidad basal del mRNA de CYP1A1.⁴³ Sin embargo, después de la administración de B[a]P, la inducción del mRNA de CYP1A1 se vio atenuada en los grupos de Ay y Re, de la misma forma que en ratas con RA. Lo anterior sugiere que durante un ciclo de ayuno-realimentación agudo, ocurre un proceso que atenúa la inducción de CYP1A1 por B[a]P.

Como se ha reportado previamente,⁶⁵ la administración de B[a]P a ratas con dieta AL promueve la formación de aductos de BPDE en el DNA, alcanzando un máximo a los dos días posteriores a la administración del compuesto. En contraste, en las ratas con RA, los niveles de aductos fueron inferiores a los observado en animales con dieta AL en el mismo periodo después de la administración de B[a]P, lo cual coincide con la baja inducción de CYP1A1 observada en hígado de ratas en este trabajo.

Los metabolitos derivados de la biotransformación del B[a]P son capaces de promover un desbalance entre las reacciones prooxidantes y antioxidantes,⁶⁶ una forma de aproximarse para evaluar el balance entre ambas reacciones es por medio de la cuantificación de la lipoperoxidación celular, en nuestro caso fue por la evaluación de TBARS.

En ratas con dieta AL, si bien observamos un incremento de la formación de TBARS a las 48 h, la actividad de las enzimas antioxidantes no se modificó en este grupo tras la exposición al B[a]P. Sin embargo, en nuestros resultados el grupo AL no presento alteraciones en dichas enzimas a lo largo de las 72 h de monitoreo. Caso opuesto que observamos en ratas con RA, donde disminuyó la actividad de SOD y CAT, pero no presento cambios en la formación de TBARS. Si bien, reportes previos sugieren que el B[a]P modifica la actividad de las enzimas antioxidantes,^{56, 57} es posible que nuestros resultados tanto en AL como RA, se deban a que el componente no enzimático de las defensas antioxidantes haya amortiguado la formación de TBARS.

Previamente se ha reportado que, durante el periodo previo al acceso al alimento el hígado de ratas con dieta de RA el citoplasma presenta una condición oxidante,⁴¹ adicionalmente la exposición a B[a]P promueve un incremento en las reacciones prooxidantes.^{67, 68} Estos antecedentes juntos sugieren que las ratas con dieta RA expuestas a B[a]P promovería una mayor formación de TBARS, sin embargo nuestros resultados indican que estos no cambiaron a lo largo de las 72 h de monitoreo, lo cual podría deberse a que la dosis empleada en este trabajo fue insuficiente para modificar la formación de TBARS.

Durante una exposición a B[a]P se observa un incremento de los niveles de AST y ALT en tejido hemático.⁶⁹ En ratas con dieta AL ambas transaminasas, así como la LDH, se incrementaron tras la exposición a B[a]P. En el grupo con RA, AST y LDH aumentaron en forma discreta tras la administración de B[a]P, sin embargo, los análisis de función hepática no presentaron cambios después de la exposición al B[a]P; lo que sí se observó fue un incremento de los bioindicadores de daño hepático, lo cual no comprometió la

función del hígado. Lo anterior indica que una dosis única de 10 mg/kg de B[a]P no promueve alteraciones en la función hepática. También sugiere que otros efectos derivados de la presencia del B[a]P en el hígado, alteraciones en el ciclo celular y el incremento de la actividad necrótica, podrían ser atenuados o inhibidos por la RA.

Al analizar la bioacumulación de B[a]P en el hígado de ratas, observamos que este puede ser detectado hasta 72 h después de una sola administración, similar a los resultados reportados previamente.⁸ Es interesante que en el grupo con RA disminuyó la presencia de B[a]P en el hígado, similar a lo observado en reportes previos donde muestran que la RA modifica la cantidad, absorción y farmacocinética del ácido valproico⁷⁰⁻⁷² y disminuye la bioacumulación de la gentamicina.⁷²

El proceso por el cual la RA disminuye la bioacumulación de los fármacos antes mencionados, así como del B[a]P no es conocida. Sin embargo, debido a la heterogeneidad de estos xenobióticos, sugerimos que podría ser un

proceso asociado con los ciclos de ayuno/realimentación, ya que tanto en el grupo Ay como Re, la bioacumulación de B[a]P disminuyó.

Si bien, nuestra hipótesis sugería que animales en RA expuestos a B[a]P promovería una mayor inducción de CYP1A1 y con ello, incrementando el daño hepatotóxico; nuestros resultados muestran una menor incidencia al igual que múltiples reportes donde emplean diferentes fármacos.⁷⁰⁻⁷²

Un posible candidato es el flujo sanguíneo, ya que se ha observado que éste influye en la absorción, metabolismo y excreción de fármacos⁶⁹ y el flujo sanguíneo hacia el sistema entérico se incrementa durante la alimentación.⁷⁴⁻⁷⁷

Adicionalmente, el acceso al alimento modifica la excreción renal.⁷⁸ Una posible hipótesis es que, durante la RA, el flujo y la presión sanguínea presente un incremento en el periodo antes del acceso al alimento, favoreciendo la movilización del B[a]P (y otros xenobióticos) fuera del hígado.

La elección de la administración intraperitoneal del B[a]P a los animales en este trabajo, fue con la idea de obtener el mayor rendimiento de absorción por el hígado, la baja bioacumulación de B[a]P en hígado de ratas con RA, parece ser la primer etapa de la protección durante un protocolo de RA; ya sea por la movilización de los xenobióticos fuera del hígado y/o agilizando la biotransformación por CYP1A1 y promoviendo su excreción. Adicionalmente, la baja bioacumulación de B[a]P promovió una menor inducción de CYP1A1, lo que derivó en una menor bioactivación del B[a]P, y con ello la menor formación de aductos de BDPE en el DNA. Esta misma baja en la bioactivación, redujo el daño hepático y con ello la liberación de transaminasas a la sangre.

Los efectos de las variaciones temporales se han considerado en numerosos estudios farmacológicos,⁴⁵ demostrando que la efectividad del fármaco varía dependiendo de la relación entre el tiempo de administración de la dosis y los procesos fisiológicos. Adicionalmente, se han descrito los periodos de tiempo donde las manifestaciones clínicas ciertas patologías presentan mayor severidad, lo que ha permitido sentar las bases para la cronofarmacoterapia,^{79, 80} pero las implicaciones de los ritmos circadianos en procesos toxicológicos han sido poco estudiadas.

Lo anterior sugiere que las estrategias utilizadas en la cronofarmacoterapia (acoplar al proceso patológico en una nueva ritmicidad a través de fármacos o por esquemas de alimentación) pueden ofrecer ventanas temporales para probar diferentes estrategias de dosis y vías de administración, con el objetivo de entender el proceso toxicológico.

8. Conclusión

Se rechaza la hipótesis, ya que una exposición a B[a]P 4 h antes de la acrofase de mRNA y proteína de CYP1A1 hepático en ratas con restricción de alimento, disminuye la retención del B[a]P, lo cual promueve una baja inducción de CYP1A1, lo que repercute en una baja producción de metabolitos de B[a]P y con ello, disminuyendo el daño genotóxico.

9. Perspectivas

- Evaluar la vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER) en ratas con restricción de alimento y expuestas a B[a]P.
- Determinar si el flujo sanguíneo está involucrado en la reducción de la bioacumulación del B[a]P en hígado.
- Cuantificación de metabolitos de B[a]P producidos durante la restricción de alimento.
- Evaluar el daño producido por B[a]P extrahepático en ratas con restricción de alimento.
- Evaluar la inducción extrahepática de CYP1A1 por B[a]P.
- Estudiar otras ventanas de administración del B[a]P durante la restricción de alimento.
- Probar otros horarios de administración, para determinar si el efecto observado en este trabajo es independiente del horario de administración.

10. Referencias

1. Wang, C H, Wu S H, Zhou S L, Shi Y X, & Song J. (2017). Characteristics and source identification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in urban soils: A Review. *Pedosphere*. 27(1): 17–26.
2. Brocco D., Fratarcangeli R., Leopre L., Petricca M., & Ventrone I. (1997) Determination of aromatic hydrocarbons in urban air of Rome. *Atmospheric Environment*. 31(4): 557-566
3. Gotham K. A., Blake N. J., CanCuren R. A. Fuelberg H. E., Meinardi S., & Blake D. R., (2010) Seasonal and diurnal measurements of carbons monoxide and non methane hydrocarbons at Mt. Wilson, California: Indirect evidence of atomic Cl in the Los Angeles Basin. *Atmospheric Environment*. (44): 2271-2279.
4. Phillips D. H. (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutation research*, 443(1-2), 139–147.

5. Hecht S. S. (1999). Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 91(14), 1194–1210.
6. Vauhkonen, M., Kuusi, T., & Kinnunen, P. K. (1980). Serum and tissue distribution of benzo[a]pyrene from intravenously injected chylomicrons in rat in vivo. *Cancer letters*, 11(2), 113–119.
7. Busbee, D. L., Norman, J. O., & Ziprin, R. L. (1990). Comparative uptake, vascular transport, and cellular internalization of aflatoxin-B1 and benzo(a)pyrene. *Archives of toxicology*, 64(4), 285–290.
8. Ramesh, A., Inyang, F., Hood, D. B., Archibong, A. E., Knuckles, M. E., & Nyanda, A. M. (2001). Metabolism, bioavailability, and toxicokinetics of benzo(alpha)pyrene in F-344 rats following oral administration. *Experimental and toxicologic pathology: official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*, 53(4), 275–290.
9. Plant, A. L., Knapp, R. D., & Smith, L. C. (1987). Mechanism and rate of permeation of cells by polycyclic aromatic hydrocarbons. *The Journal of biological chemistry*, 262(6), 2514–2519.
10. Verma, N., Pink, M., Rettenmeier, A. W., & Schmitz-Spanke, S. (2012). Review on proteomic analyses of benzo[a]pyrene toxicity. *Proteomics*, 12(11), 1731–1755.
11. Ewa, B., & Danuta, M. Š. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-related DNA adducts. *Journal of applied genetics*, 58(3), 321–330.
12. Munro, A. W., Girvan, H. M., & McLean, K. J. (2007). Variations on a (t)heme--novel mechanisms, redox partners and catalytic functions in the cytochrome P450 superfamily. *Natural product reports*, 24(3), 585–609.
13. Badal, S., & Delgoda, R. (2014). Role of the modulation of CYP1A1 expression and activity in chemoprevention. *Journal of applied toxicology: JAT*, 34(7), 743–753.

14. Hu, Z., & Wells, P. G. (1994). Modulation of benzo[a]pyrene bioactivation by glucuronidation in lymphocytes and hepatic microsomes from rats with a hereditary deficiency in bilirubin UDP-glucuronosyltransferase. *Toxicology and applied pharmacology*, 127(2), 306–313.
15. Kawajiri, K., & Fujii-Kuriyama, Y. (2007). Cytochrome P450 gene regulation and physiological functions mediated by the aryl hydrocarbon receptor. *Archives of biochemistry and biophysics*, 464(2), 207–212.
16. Garrison, P. M., & Denison, M. S. (2000). Analysis of the murine AhR gene promoter. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 14(1), 1–10.
17. Hayakawa K. (2016). Environmental Behaviors and Toxicities of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Nitropolycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 64(2), 83–94.
18. Lee, H. M., Chae, Y. H., Kwon, C., & Kim, S. K. (2007). Conformations of adducts formed between the genotoxic benzo[a]pyrene-7,8-dione and nucleosides studied by density functional theory. *Biophysical chemistry*, 125(1), 151–158.
19. Shimada, T., & Fujii-Kuriyama, Y. (2004). Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer science*, 95(1), 1–6.
20. Nesnow, S., Ross, J., Nelson, G., Holden, K., Erexson, G., Kligerman, A., & Gupta, R. C. (1993). Quantitative and temporal relationships between DNA adduct formation in target and surrogate tissues: implications for biomonitoring. *Environmental health perspectives*, 101 Suppl 3(Suppl 3), 37–42.
21. Stowers, S. J., & Anderson, M. W. (1985). Formation and persistence of benzo(a)pyrene metabolite-DNA adducts. *Environmental health perspectives*, 62, 31–39.

22. Eckel-Mahan, K., & Sassone-Corsi, P. (2013). Metabolism and the circadian clock converge. *Physiological reviews*, 93(1), 107–135.
23. Froy O. (2011). Circadian rhythms, aging, and life span in mammals. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 26(4), 225–235.
24. Foster, R. G., Hankins, M. W., & Peirson, S. N. (2007). Light, photoreceptors, and circadian clocks. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 362, 3–28.
25. Okamura H. (2007). Suprachiasmatic nucleus clock time in the mammalian circadian system. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 72, 551–556.
26. Dunlap J. C. (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, 96(2), 271–290.
27. Takahashi, J. S. (2016). Molecular Architecture of the Circadian Clock in Mammals. In P. Sassone-Corsi (Eds.) et. al., *A Time for Metabolism and Hormones*. (pp. 13–24). Springer.
28. Kowalska, E., & Brown, S. A. (2007). Peripheral clocks: keeping up with the master clock. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 72, 301–305.
29. Panda S. (2016). Circadian physiology of metabolism. *Science (New York, N.Y.)*, 354(6315), 1008–1015.
30. Koike, N., Yoo, S. H., Huang, H. C., Kumar, V., Lee, C., Kim, T. K., & Takahashi, J. S. (2012). Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals. *Science (New York, N.Y.)*, 338(6105), 349–354.
31. Pietrocola, F., Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Madeo, F., & Kroemer, G. (2015). Acetyl coenzyme A: a central metabolite and second messenger. *Cell metabolism*, 21(6), 805–821.

32. Nakahata, Y., Kaluzova, M., Grimaldi, B., Sahar, S., Hirayama, J., Chen, D., Guarente, L. P., & Sassone-Corsi, P. (2008). The NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. *Cell*, 134(2), 329–340.
33. Asher, G., Gatfield, D., Stratmann, M., Reinke, H., Dibner, C., Kreppel, F., Mostoslavsky, R., Alt, F. W., & Schibler, U. (2008). SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation. *Cell*, 134(2), 317–328.
34. Xu, C. X., Wang, C., Krager, S. L., Bottum, K. M., & Tischkau, S. A. (2013). Aryl hydrocarbon receptor activation attenuates Per1 gene induction and influences circadian clock resetting. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 132(2), 368–378.
35. Ohdo S. (2010). Chronotherapeutic strategy: Rhythm monitoring, manipulation and disruption. *Advanced drug delivery reviews*, 62(9-10), 859–875.
36. Hirota, T., & Fukada, Y. (2004). Resetting mechanism of central and peripheral circadian clocks in mammals. *Zoological science*, 21(4), 359–368.
37. Froy O. (2013). Circadian aspects of energy metabolism and aging. *Ageing research reviews*, 12(4), 931–940.
38. Hirao, J., Arakawa, S., Watanabe, K., Ito, K., & 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(6), 3165–3171.
39. Pérez-Mendoza, M., Rivera-Zavala, J. B., & Díaz-Muñoz, M. (2014). Daytime restricted feeding modifies the daily variations of liver gluconeogenesis: adaptations in biochemical and endocrine regulators. *Chronobiology international*, 31(7), 815–828.

40. Luna-Moreno, D., García-Ayala, B., & Díaz-Muñoz, M. (2012). Daytime restricted feeding modifies 24 h rhythmicity and subcellular distribution of liver glucocorticoid receptor and the urea cycle in rat liver. *The British journal of nutrition*, 108(11), 2002–2013.
41. Díaz-Muñoz, M., Vázquez-Martínez, O., Aguilar-Roblero, R., & Escobar, C. (2000). Anticipatory changes in liver metabolism and entrainment of insulin, glucagon, and corticosterone in food-restricted rats. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 279(6), R2048–R2056.
42. Báez-Ruiz, A., Escobar, C., Aguilar-Roblero, R., Vázquez-Martínez, O., & Díaz-Muñoz, M. (2005). Metabolic adaptations of liver mitochondria during restricted feeding schedules. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 289(6), G1015–G1023.
43. Avila-Rosales O. S., Díaz-Muñoz M. (2016) Efecto de la restricción de alimento sobre la expresión hepática del receptor para hidrocarburos de arilo. 0750563 Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias (neurobiología). Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis UNAM.
44. Aguilar-Roblero R., & Díaz-Muñoz M. (2010) Chronostatic adaptations in the liver to restricted feeding: The FEO as an emergent oscillator. *Sleep and Biological rhythms*. (8): 9-17
45. Ohdo, S., Koyanagi, S., & Matsunaga, N. (2010). Chronopharmacological strategies: Intra- and inter-individual variability of molecular clock. *Advanced drug delivery reviews*, 62(9-10), 885–897.

46. Beauchamp, D., Guimont, C., Grenier, L., LeBrun, M., Tardif, D., Gourde, P., Bergeron, M. G., Thibault, L., & Labrecque, G. (1997). Time-restricted feeding schedules modify temporal variation of gentamicin experimental nephrotoxicity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 41(7), 1468–1474.

47. Matsunaga, N., Nakamura, N., Yoneda, N., Qin, T., Terazono, H., To, H., Higuchi, S., & Ohdo, S. (2004). Influence of feeding schedule on 24-h rhythm of hepatotoxicity induced by acetaminophen in mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 311(2), 594–600.

48. Cornelissen G. (2014). Cosinor-based rhythmometry. *Theoretical biology & medical modelling*, 11, 16.

49. Shi, Z., Dragin, N., Miller, M. L., Stringer, K. F., Johansson, E., Chen, J., Uno, S., Gonzalez, F. J., Rubio, C. A., & Nebert, D. W. (2010). Oral benzo[a]pyrene-induced cancer: two distinct types in different target organs depend on the mouse Cyp1 genotype. *International journal of cancer*, 127(10), 2334–2350.

50. Shi, Z., Dragin, N., Miller, M. L., Stringer, K. F., Johansson, E., Chen, J., Uno, S., Gonzalez, F. J., Rubio, C. A., & Nebert, D. W. (2010). Oral benzo[a]pyrene-induced cancer: two distinct types in different target organs depend on the mouse Cyp1 genotype. *International journal of cancer*, 127(10), 2334–2350.

50. Burke, M. D., Thompson, S., Weaver, R. J., Wolf, C. R., & Mayer, R. T. (1994). Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver. *Biochemical pharmacology*, 48(5), 923–936.

51. Chomczynski, P., & Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature protocols*, 1(2), 581–585.
52. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408.
53. Bergmeyer, H.U., Scheibe, P., Wahlefeld, A.W. (1978) Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clin Chem*, 24:1–73.
54. Sekihashi, K., Sasaki, T., Yamamoto, A., Kawamura, K., Ikka, T., Tsuda, S., & Sasaki, Y. F. (2001). A comparison of intraperitoneal and oral gavage administration in comet assay in mouse eight organs. *Mutation research*, 493(1-2), 39–54.
55. Arlt, V. M., Stiborová, M., Henderson, C. J., Thiemann, M., Frei, E., Aimová, D., Singh, R., Gamboa da Costa, G., Schmitz, O. J., Farmer, P. B., Wolf, C. R., & Phillips, D. H. (2008). Metabolic activation of benzo[a]pyrene in vitro by hepatic cytochrome P450 contrasts with detoxification in vivo: experiments with hepatic cytochrome P450 reductase null mice. *Carcinogenesis*, 29(3), 656–665.
56. Burdick, A. D., Davis, J. W., 2nd, Liu, K. J., Hudson, L. G., Shi, H., Monske, M. L., & Burchiel, S. W. (2003). Benzo(a)pyrene quinones increase cell proliferation, generate reactive oxygen species, and transactivate the epidermal growth factor receptor in breast epithelial cells. *Cancer research*, 63(22), 7825–7833.
57. Kim, K. B., & Lee, B. M. (1997). Oxidative stress to DNA, protein, and antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) in rats treated with benzo(a)pyrene. *Cancer letters*, 113(1-2), 205–212.

58. Zmrzljak, U. P., & Rozman, D. (2012). Circadian regulation of the hepatic endobiotic and xenobiotic detoxification pathways: the time matters. *Chemical research in toxicology*, 25(4), 811–824.
59. Arlt, V. M., Stiborová, M., Henderson, C. J., Thiemann, M., Frei, E., Aimová, D., Singh, R., Gamboa da Costa, G., Schmitz, O. J., Farmer, P. B., Wolf, C. R., & Phillips, D. H. (2012). Exposure to benzo[a]pyrene of Hepatic Cytochrome P450 Reductase Null (HRN) and P450 Reductase Conditional Null (RCN) mice: Detection of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts by immunohistochemistry and ³²P-postlabelling. *Toxicology letters*, 213(2), 160–166.
60. Draushuk, A. T., McGarrigle, B. P., Slezak, B. P., Stegeman, J. J., & Olson, J. R. (1999). Time- and concentration-dependent induction of CYP1A1 and CYP1A2 in precision-cut rat liver slices incubated in dynamic organ culture in the presence of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicology and applied pharmacology*, 155(2), 127–138.
61. Patel, S. A., Velingkaar, N., Makwana, K., Chaudhari, A., & Kondratov, R. (2016). Calorie restriction regulates circadian clock gene expression through BMAL1 dependent and independent mechanisms. *Scientific reports*, 6.
62. Chou MW, Kong J, Chung KT, Hart RW. Effect of caloric restriction on the metabolic activation of xenobiotics. *Mutat Res.* 1993;295(4-6):223-235.
63. Manjgaladze, M., Chen, S., Frame, L. T., Seng, J. E., Duffy, P. H., Feuers, R. J., Hart, R. W., & Leakey, J. E. (1993). Effects of caloric restriction on rodent drug and carcinogen metabolizing enzymes: implications for mutagenesis and cancer. *Mutation research*, 295(4-6), 201–222.
64. Chou, M. W., Kong, J., Chung, K. T., & Hart, R. W. (1993). Effect of caloric restriction on the metabolic activation of xenobiotics. *Mutation research*, 295(4-6), 223–235.

65. Godschalk, R. W., Moonen, E. J., Schilderman, P. A., Broekmans, W. M., Kleinjans, J. C., & Van Schooten, F. J. (2000). Exposure-route-dependent DNA adduct formation by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis*, 21(1), 87–92.
66. Kim, H. S., & Lee, B. M. (1997). Inhibition of benzo[a]pyrene-DNA adduct formation by *Aloe barbadensis* Miller. *Carcinogenesis*, 18(4), 771–776.
67. Jiang, Y., Zhou, X., Chen, X., Yang, G., Wang, Q., Rao, K., Xiong, W., & Yuan, J. (2011). Benzo(a)pyrene-induced mitochondrial dysfunction and cell death in p53-null Hep3B cells. *Mutation research*, 726(1), 75–83.
68. Wang, W., Wang, R., Zhang, Q., Mor, G., & Zhang, H. (2018). Benzo(a)pyren-7,8-dihydrodiol-9,10 epoxide induces human trophoblast Swan 71 cell dysfunctions due to cell apoptosis through disorder of mitochondrial fission/fusion. *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)*, 233, 820–832.
69. Uno, S., Dalton, T. P., Dragin, N., Curran, C. P., Derkenne, S., Miller, M. L., Shertzer, H. G., Gonzalez, F. J., & Nebert, D. W. (2006). Oral benzo[a]pyrene in Cyp1 knockout mouse lines: CYP1A1 important in detoxication, CYP1B1 metabolism required for immune damage independent of total-body burden and clearance rate. *Molecular pharmacology*, 69(4), 1103–1114.
70. Ohdo, S., Nakano, S., & Ogawa, N. (1991). Chronopharmacokinetics of valproic acid following constant-rate administration in mice. *Chronobiology international*, 8(1), 35–43.
71. Song, J. G., Ohdo, S., & Ogawa, N. (1995). Chronopharmacokinetics of valproic acid following constant-rate administration in mice and influence of feeding schedule. *Zhongguo yao li xue bao = Acta pharmacologica Sinica*, 16(2), 113–117.

72. Ohdo, S., Ogawa, N., Nakano, S., & Higuchi, S. (1996). Influence of feeding schedule on the chronopharmacological aspects of sodium valproate in mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 278(1), 74–81.
73. Beauchamp, D., Guimont, C., Grenier, L., LeBrun, M., Tardif, D., Gourde, P., Bergeron, M. G., Thibault, L., & Labrecque, G. (1997). Time-restricted feeding schedules modify temporal variation of gentamicin experimental nephrotoxicity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 41(7), 1468–1474.
74. van den Buuse M. (1999). Circadian rhythms of blood pressure and heart rate in conscious rats: effects of light cycle shift and timed feeding. *Physiology & behavior*, 68(1-2), 9–15.
75. Sutton, E. F., Beyl, R., Early, K. S., Cefalu, W. T., Ravussin, E., & Peterson, C. M. (2018). Early Time-Restricted Feeding Improves Insulin Sensitivity, Blood Pressure, and Oxidative Stress Even without Weight Loss in Men with Prediabetes. *Cell metabolism*, 27(6), 1212–1221.e3.
76. Boulamery-Velly, A., Simon, N., Vidal, J., Mouchet, J., & Bruguerolle, 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. *Chronobiology international*, 22(3), 489–498.
77. Song, J. G., Nakano, S., Ohdo, S., & Ogawa, N. (1993). Chronotoxicity and chronopharmacokinetics of methotrexate in mice: modification by feeding schedule. *Japanese journal of pharmacology*, 62(4), 373–378.
78. Boulos, Z., & Terman, M. (1980). Food availability and daily biological rhythms. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 4(2), 119–131.
79. Ohdo S. (2010). Chronotherapeutic strategy: Rhythm monitoring, manipulation and disruption. *Advanced drug delivery reviews*, 62(9-10), 859–875.

80. Ohdo, S., Koyanagi, S., & Matsunaga, N. (2010). Chronopharmacological strategies: Intra- and inter-individual variability of molecular clock. *Advanced drug delivery reviews*, 62(9-10), 885–897.



- Rojo, oro y verde -