



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Estudio de la localización intranuclear del gen circadiano *Dbp*”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Fernando Becerril Pérez

Dra. Lorena Aguilar Arnal

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Juan Miranda Ríos

Unidad Periférica IIB, INPediatria

Dr. Rodrigo González Barrios de la Parra

Instituto Nacional de Cancerología

Ciudad de México. Mayo, 2019



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.

## **Agradecimientos**

Esta tesis se realizó bajo la asesoría de la Dra. Lorena Aguilar Arnal en el Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Fue realizada también bajo el asesoramiento del comité tutor formado por el Dr. Juan Miranda Ríos (INPediatría) y Dr. Rodrigo González Barrios de la Parra (INCAN).

Este trabajo fue financiado por la Universidad Nacional Autónoma de México, PAPIIT IA201717 e IN210619, así como ICGEB International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology Early Career Return Grant CRP/MEX16-05\_EC”

Agradezco también al Programa de Posgrado en Ciencias Bioquímicas (UNAM), y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Mexico por la beca proporcionada durante mis estudios de maestría.

A la Maestra en Ciencias, Marcia Bustamante Zepeda por su apoyo técnico y teórico para el diseño y la realización de los experimentos.

Al personal de la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas particularmente al Dr. Victor Daniel Garzón Cortés y la Dra. Georgina Díaz Herrera por el apoyo brindado para la manipulación y mantenimiento de los animales.

Al Dr. Inti de la Rosa Velazquez de la Red de Apoyo a la Investigación por su apoyo en la generación y secuenciación de las librerías de 4C-seq.

Al Dr. Enrique Hernández Lemus, Dr. Jesus Espinal Enriquez y Dr. Guillermo de Anda Jáuregui, por su ayuda en el manejo de scripts en R.

## Contenido

1. Resumen.....	8
2. Introducción .....	10
2.1 Ritmos biológicos .....	10
2.1.1 Ritmos circadianos .....	11
2.1.2 El reloj circadiano se organiza jerárquicamente: .....	12
2.2 Maquinaria molecular del reloj circadiano .....	17
2.2.1 El gen <i>Dbp</i> .....	20
2.2.2 El reloj molecular regula un epigenoma circadiano .....	24
2.3. Arquitectura espacial de los genes en el núcleo .....	28
2.3.1 Organización nuclear del genoma en territorios cromosómicos.....	28
2.3.2 Compartimentos .....	29
2.3.3 Dominios asociados topológicamente .....	30
2.3.4 Asas de cromatina .....	31
2.3.5 Fábricas transcripcionales .....	32
2.4 Técnicas para el estudio de la arquitectura del genoma .....	34
2.4.1 Arquitectura espacial de los genes circadianos. ....	36
3. Planteamiento de problema .....	39
4. Hipótesis.....	41
5. Objetivos .....	42
6. Materiales y Métodos: .....	43
6.1 Animales y dietas: .....	43
6.2 Test de tolerancia a la glucosa e insulina .....	43
6.3 Tinciones hepáticas .....	44
6.4 Extracción de mRNA.....	44
6.5 Síntesis de cDNA.....	44
6.6 qRT-PCR .....	45
6.7 Captura de Conformación de la Cromatina circular: 4C-seq.....	46
6.7.1 Homogenización y entrecruzamiento .....	46
6.7.2 Lisis celular y nuclear.....	46
6.7.3 Digestión y ligación.....	47
6.7.4 Reversión del entrecruzamiento y purificación .....	47
6.7.5 Segunda restricción y ligación .....	48

6.7.6 Amplificación de la librería de 4C .....	49
6.8 Secuenciación .....	53
6.9 Análisis de las secuencias .....	54
6.10 Visualización de resultados .....	56
6.11 Primers .....	56
7. Resultados .....	58
7.1 La alimentación con dieta rica en grasas genera obesidad y alteraciones metabólicas.....	58
7.2 Cuantificación de la expresión de <i>Dbp</i> .....	62
7.3 El gen <i>Dbp</i> es objeto de transiciones cromatínicas altamente dinámicas entre el día y la noche.....	63
7.3 Implementación de un protocolo de 4C-seq en hígados de ratones sanos y obesos.....	67
7.6 Secuenciación de las librerías 4C de hígados de ratones sanos y obesos.....	70
7.7 El locus <i>Dbp</i> presenta un interactoma circadiano en hígado de ratón.....	73
7.8 El interactoma circadiano del locus de <i>Dbp</i> se reorganiza en respuesta a la dieta rica en grasas. ....	76
7.9 Las características cromatínicas de las interacciones detectadas sugieren un papel regulatorio.....	78
8. Discusión de resultados.....	84
9. Conclusiones.....	96
10. Perspectivas: .....	96
11. Bibliografía: .....	98
Anexo 1 – Composición de las dietas .....	107
Anexo 2 – Control de calidad de la secuenciación .....	108
Anexo 3 – Análisis con R3Cseq .....	110

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Respuestas generadas por el reloj circadiano. ....	11
Figura 2 – El reloj circadiano requiere ser sincronizado por estímulos ambientales. ....	15
Figura 3 - Mecanismo molecular del reloj central. ....	18
Figura 4 - Reclutamiento circadiano de la maquinaria del reloj en el gen Dbp. ....	19
Figura 5 - Niveles circadianos de mRNA y proteína de los factores PAR-bZIP ....	22
Figura 6 - Ritmos circadianos en el hígado. ....	23
Figura 7 - eRNA´s circadianos y regulación por factores transcripcionales circadianos. ....	24
Figura 8 - Enzimas modificadoras de histonas participan en la regulación de CCG. ....	27
Figura 9 - Regulación génica en fábricas transcripcionales. ....	33
Figura 10 - Compartimentalización del genoma. ....	34
Figura 11 - Detección del interactoma de un loci por 4C-seq. ....	36
Figura 12 - La transcripción de genes circadianos requiere de contactos dinámicos entre CCG y elementos regulatorios. ....	37
Figura 13 - Obtención y análisis de datos de 4C-seq. ....	48
Figura 14 - Localización de primers para amplificación del material 4C. ....	49
Figura 15 - Amplificación de la librería de 4c-seq. ....	50
Figura 16 - Amplificación de la librería de 4c-seq con Phusion HSII. ....	51
Figura 17 - Amplificación del DNA 4C con primers. ....	52
Figura 18 - Efecto de la disminución en la concentración de primers en la amplificación del material 4C. ....	52
Figura 19 - Preparación de librerías para secuenciación. ....	54
Figura 20 - Ganancia de peso y desbalance en glucosa basal en animales HFD. ....	58
Figura 21 - Test de tolerancia a la insulina. ....	59
Figura 22 - Test de tolerancia a la glucosa. ....	60
Figura 23 - Acumulación de lípidos en hígados HFD. ....	61
Figura 24 - Expresión de Dbp. ....	62
Figura 25 - Cuantificación de premRNA para Dbp. ....	63
Figura 26 - ChIP-seq en el locus de Dbp para las proteínas BMAL1(A) y CLOCK (B). ....	64
Figura 27 - Datos de ChIP-seq en el locus de Dbp para las proteínas PER2(A) y CRY1 (B). ...	65
Figura 28 -- Datos de ChIP-seq en el locus de Dbp para la HAT P300 (A) y Pol II con la serina 5 fosforilada (B). ....	66
Figura 29 - Datos de ChIP-seq en el locus de Dbp para la H3K27ac, H3K4me3 (B) y H3K4me1 (C). ....	67
Figura 30 - Digestión con HindIII y ligación. ....	68
Figura 31 - Procesamiento de muestras 4C. ....	68
Figura 32 - Amplificación del material 4C de las muestras usadas para secuenciación. ....	69
Figura 33 - Composición de las muestras tras la selección de tamaños. ....	71
Figura 34 - Gráficos de dispersión mostrando la correlación entre los replicados. ....	73
Figura 35 - Análisis de CD6 contra CD18 (A) y HF6 contra HF18 (B) en FourCseq. ....	74
Figura 36 - Análisis de CD6 contra HF6 (A) y CD18 contra HF18 (B) en FourCseq. ....	76
Figura 37 - Interacciones sobrelapan con marcas de interés. ....	78
Figura 38 - Interacciones compartidas por los grupos CD y HFD del ZT6. ....	80

Figura 39 - <b>Interacciones del grupo CD ZT6.</b> .....	81
Figura 40 - <b>Ubicación del snoRNA Snord35b en el intrón 2 de Rps11.</b> .....	81
Figura 41 - <b>Interacciones del grupo HF ZT6.</b> .....	83
Figura 42 - <b>La dieta alta en grasas reorganiza la transcripción de <i>Dbp</i></b> .....	86
Figura 43 - <b>Colocalización de BMAL1/Rev-erb<math>\alpha</math>.</b> .....	92
Figura 44 - <b>Control de calidad de las secuencias.</b> .....	108
Figura 45 - <b>CD6 vs CD18.</b> .....	110
Figura 46 - <b>CD6 vs HF6.</b> .....	111
Figura 47 - <b>CD18 contra HF18.</b> .....	112
Figura 48 - <b>HF6 contra HF18.</b> .....	113

## **Abreviaturas**

ZT – Zeitgeber time

BMAL1 - Receptor nuclear translocador de aril hidrocarburos

CLOCK - Circadian Locomotor Output Cycles Kaput

Dbp - Proteína de unión al promotor del sitio D de la albumina

PER – Periodo (proteína)CRY – Criptocromo (proteína)

NSQ – Núcleo supraquiasmático

PAR-bZIP – Zipper básico de leucina rico en prolina y aminoácidos ácidos

GABA – Ácido gamma amino butírico

TEF – Factor embrionario tirotrofo

HLF – Factor hepático de la leucemia

SIRT1 – Sirtuina 1

P300 – Acetiltransferasa de histona EP300

CBP – Proteína de unión a CREB

CCG, GCR – Genes controlados por el reloj

CD – Dieta control

HFD – Dieta alta en grasas

NAD<sup>+</sup> - Dinucleótido de nicotinamida y adenina

CTCF – Factor de unión a CCCTC

YY1- Proteína Ying Yang 1

ChIP-seq – Inmunoprecipitación de cromatina acoplada a secuenciación

DNase-seq – Hipersensibilidad a la DNAsa acoplada a secuenciación

ATAC-seq – Ensayo de cromatina accesible a la transposasa acoplado a secuenciación

HAT – Acetil transferasa de histonas

HDAC – Desacetilasa de histonas

NCoR – Correpresor 1 de receptor nuclear

MEF's – Fibroblastos embrionarios de ratón

GTT- Test de tolerancia a la glucosa

ITT – Test de tolerancia a la insulina  
ON – Toda la noche (overnight)  
PCI – Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico  
TSS – Sitio de inicio de la transcripción  
FISH – Hibridación fluorescente in situ  
RPM – Lecturas por millón (Reads Per Million)  
VP – Viewpoint o bait (4c-seq)  
GRO-seq – Global Run On acoplado a secuenciación  
ChIA-PET – Análisis de interacciones de cromatina por  
DIO – Obesidad inducida por la dieta (Diet-Induced Obesity)  
snoRNA – RNA pequeño nucleolar  
eRNA – RNA derivado de enhancer  
H3K4 – Histona H3 lisina 4  
H3K27 – Histona H3 lisina 27

## 1. Resumen

Los ritmos circadianos son procesos biológicos que se llevan a cabo en ciclos de aproximadamente 24 horas, algunos de ellos están implicados en el metabolismo. Debido a esto, algunos procesos metabólicos están favorecidos en periodos específicos del día y se segregan temporalmente rutas metabólicas opuestas para que el metabolismo sea eficiente para el organismo.

El principal sincronizador del reloj circadiano en mamíferos es la luz; sin embargo, en tejidos metabólicamente activos como el hígado, el alimento ha demostrado ser un importante sincronizador. Por ello, la composición de la dieta y los horarios de ingesta de alimento han mostrado la capacidad de modular el reloj circadiano en este tejido.

A nivel molecular, el funcionamiento del reloj circadiano se basa en loops de retroalimentación transcripcionales y traduccionales iniciados por los activadores transcripcionales CLOCK/BMAL1, los cuales son reclutados a secuencias E-box donde activan la transcripción de los genes controlados por el reloj (CCG). Entre estos, se encuentran genes codificantes para las proteínas periodo y criptocromo (*Per/Cry*). Estas proteínas se acumulan en el citoplasma y al final del día son capaces de reprimir la actividad transcripcional de CLOCK/BMAL1. Este loop tiene una duración de aproximadamente 24 horas.

Además, entre los CCG se encuentran algunos genes codificantes para factores transcripcionales, que al aparecer de manera circadiana otorgan ritmicidad a la transcripción de sus genes blanco. Entre estos se encuentra *Dbp*, el cual codifica para un factor transcripcional involucrado en la transcripción circadiana de genes asociados al metabolismo de xenobióticos, una de las principales funciones hepáticas que se encuentra favorecida durante la fase nocturna.

Para que esto ocurra se requiere que la cromatina que contiene los CCG sea altamente dinámica, tanto a nivel de accesibilidad, presencia de marcas de histona asociadas con activación/represión transcripcional como en la formación de contactos enhancer-promotor y promotor-promotor a lo largo del día, de acuerdo a sus fases de transcripción y represión transcripcional.

Debido al requerimiento de estos estímulos ambientales para la sincronización del reloj circadiano, factores como los turnos de trabajo nocturnos, fotoperiodos inusuales, desórdenes

neuroológicos y alimentación con dietas altas en grasas son capaces de generar disrupciones en los ritmos circadianos.

En el hígado de ratón, la exposición a distintos tipos de dieta genera la reorganización del transcriptoma circadiano. Por ejemplo, la alimentación con dieta obesogénica de alto contenido lipídico altera la expresión rítmica de genes básicamente en 3 maneras respecto a ratones alimentados con dieta normocalórica: 1) genes circadianos que pierden oscilación, 2) genes sin oscilación que la ganan y 3) genes circadianos con corrimiento de fase en su transcripción.

A nivel de actividad de elementos enhancer circadianos, se observa también una reorganización en su actividad similar a la observada a nivel del transcriptoma, la cual favorece la expresión de genes involucrados en metabolismo lipídico.

En este trabajo, se busca determinar el efecto de la alimentación con dieta alta en grasas sobre el interactoma del gen circadiano *Dbp* en dos ZT, 6 (día) y 18 (noche), utilizando hígados de ratón.

Inicialmente, la expresión de *Dbp* fue medida mediante qPCR para mRNA, se observó mayor expresión de *Dbp* en los ratones alimentados con la dieta alta en grasas al ZT6. A nivel de pre-mRNA, mediante qPCR con primers diseñados en regiones intrónicas, se observó lo contrario, un nivel significativamente mayor en el grupo control al ZT6 lo que sugiere desregulación en la transcripción y acumulación de mRNA de *Dbp* por la dieta alta en grasas. Utilizando la técnica de Captura de Conformación de la Cromatina acoplada a secuenciación (4C-seq), se observó la ocurrencia de interacciones preferencialmente durante el ZT6, acorde a la fase transcripcional de *Dbp*. El perfil cromatínico dado por accesibilidad, marcas de histona y transcripción de algunas de estas interacciones sugiere su función como elementos regulatorios.

Se observaron además algunas interacciones que se conservan entre la condición control y alimentada con dieta alta en grasas mientras que otras son encontradas solamente en alguna de ellas. Estos resultados sugieren un papel de la formación dinámica de contactos regulatorios con la transcripción circadiana de *Dbp* así como la alteración de este interactoma por la alimentación con dieta alta en grasas.

## 2. Introducción

### 2.1 Ritmos biológicos

La presencia de ritmos biológicos es una característica de todos los grupos de seres vivos y se encuentran representados en los tres dominios en que se divide la vida: Archaea, Bacteria y Eukarya [3, 4]. El surgimiento de estos ritmos está relacionado con la presencia de ciclos ambientales como el fotoperiodo, cambios en las estaciones a lo largo del año, variaciones periódicas en la temperatura, disponibilidad de alimento etc. Estos ciclos son desencadenados por el movimiento de rotación de la tierra sobre su eje, así como su movimiento de traslación alrededor del sol y el de la luna alrededor de la tierra [5]. La capacidad de los organismos de contar con un mecanismo que les permita anticipar estos cambios ambientales para tener una adecuada respuesta fisiológica les brinda una ventaja evolutiva [6].

Entre las características propias de un ritmo biológico están: 1) el que sea innato, es decir, está presente desde el momento del nacimiento del organismo y no se debe al aprendizaje a lo largo de su vida. Esto es evidente en ratones que fueron mantenidos durante toda su vida en condiciones constantes de luz, durante 7 generaciones, y la presencia de ritmicidad permanecía aún en la séptima generación [7]. 2) Que persista en el organismo aun cuando los estímulos ambientales no están presentes. Esto fue inicialmente demostrado en la planta mimosa, la cual conserva movimientos rítmicos en su tejido foliar en condiciones constantes de obscuridad [8]. 3) Que sean generados de manera endógena, es decir, que el ritmo no requiera de factores externos para generarse. En estas circunstancias, el organismo pierde sincronía con los ritmos ambientales; sin embargo, mantiene sus propio ritmo [9]. Así pues, en los seres vivos evolucionó un sistema oscilador en respuesta a la rotación del planeta que habitan [10]; y presentan oscilaciones auto sostenibles que pueden ser sincronizadas por estímulos externos [11]. Por la duración de su periodo los ritmos biológicos se pueden clasificar en [12, 13]:

-Circadianos, con una duración de aproximadamente 24 horas.

-Ultradianos, con una duración que va desde algunos segundos hasta aproximadamente 20 horas como el ritmo cardiaco y la secreción pulsátil de algunas hormonas como el cortisol.

-Infradianos con una duración desde 30 horas hasta algunos años. Algunos ritmos infradianos son el ciclo estral, las migraciones o las variaciones adaptativas en respuesta a las estaciones del año.

### 2.1.1 Ritmos circadianos

Entre los ritmos biológicos, los ritmos circadianos con un periodo de aproximadamente 24 horas, tienen una gran influencia en los procesos metabólicos, fisiológicos y conductuales de muchos organismos. El sistema endógeno que permite a los organismos anticiparse y responder a estímulos ambientales es el reloj circadiano, el cual se encarga de segregar temporalmente numerosas funciones cognitivas, fisiológicas y bioquímicas a distintas horas del día (Figura 1).

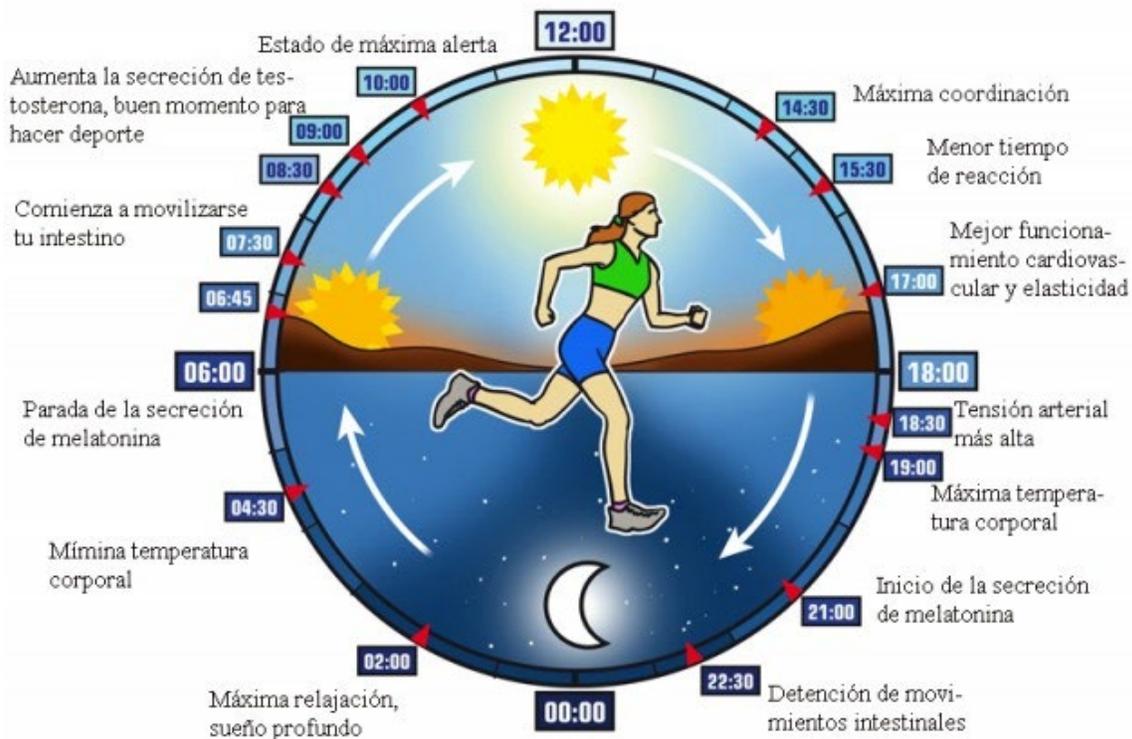


Figura 1 – Respuestas generadas por el reloj circadiano.

Los ritmos circadianos permiten la anticipación a los ritmos ambientales a tiempos específicos para que el organismo pueda tener una respuesta fisiológica adecuada. En la figura se muestran algunas de las respuestas generadas por el reloj circadiano a lo largo del día.

En mamíferos, el ritmo circadiano más evidente es el ciclo de sueño-vigilia[14], pero otros aspectos cognitivos [15], incluyendo la capacidad de aprendizaje, niveles de alerta o incluso el estado anímico tienen un componente circadiano. Así mismo, a nivel fisiológico, aspectos como la presión sanguínea[16], la eficiencia muscular, los movimientos intestinales, la frecuencia cardíaca o la temperatura[17] son algunos ejemplos de procesos que presentan ritmicidad circadiana. En esta misma línea, parámetros bioquímicos como pueden ser los niveles de glucosa y lípidos en sangre[18], la liberación de hormonas[19] (insulina, leptina, grelina, glucagón, hormonas tiroideas, glucocorticoides, etc) y múltiples rutas metabólicas en distintos tejidos del organismo oscilan a lo largo del día [20].

#### 2.1.2 El reloj circadiano se organiza jerárquicamente:

En mamíferos, el reloj circadiano está organizado en un sistema jerárquico formado por relojes periféricos y un reloj central que controla principalmente los ritmos en la actividad locomotora y se encarga de sincronizar los osciladores periféricos [21] (Figura 2). Muchos tejidos cuentan con la maquinaria necesaria y tienen la capacidad de generar oscilaciones de manera circadiana; sin embargo, dichas oscilaciones decaen en ausencia de un oscilador central, y generalmente se considera que el reloj central dicta la sincronización de los relojes periféricos [22]. Los osciladores periféricos permiten hacer más eficientes los distintos procesos fisiológicos, por ejemplo, evitando que reacciones que son incompatibles entre sí converjan temporalmente, como ocurre en el hígado, donde la ruta catabólica de la glucólisis se da durante el periodo de actividad mientras que la gluconeogénesis está temporalmente restringida al periodo de descanso[23].

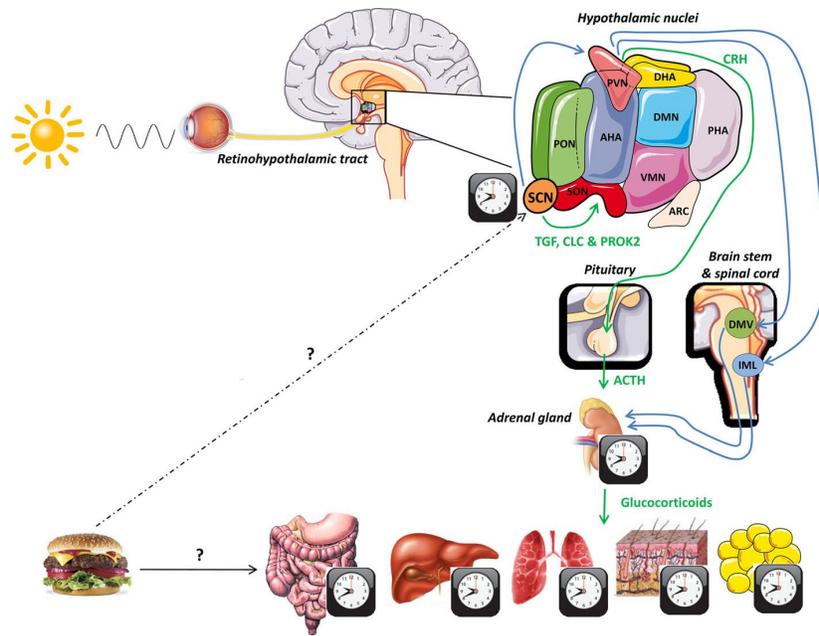


Figura 2 – El reloj circadiano requiere ser sincronizado por estímulos ambientales.

Virtualmente todas las células en un organismo cuentan con la maquinaria necesaria para generar ritmos circadianos. En la figura se muestran algunos osciladores periféricos (tejido adiposo, piel, pulmones, hígado y tracto digestivo) que presentan ritmos circadianos. Sin embargo, todos esos osciladores son sincronizados por el NSQ (parte superior de la imagen) mediante señales neurales (flecha verde) y humorales (flechas azules) para que se mantengan en fase con el ambiente. EL NSQ se sincroniza a su vez mediante el fotoperíodo ambiental sentido por células ganglionares en la retina. El alimento también es un sincronizador potente en los tejidos mostrados. [24]

En mamíferos, el reloj central se localiza anatómicamente en grupo de aproximadamente 20,000 neuronas en la región del hipotálamo denominado núcleo supraquiasmático (NSQ) [25].

#### 2.1.2.1 Sincronización del reloj central

Dado que el periodo de oscilación del reloj circadiano es solamente aproximado y no de exactamente 24 horas, debe existir un mecanismo por el cual se sincronice con el ambiente para evitar así corrimientos de fase y pérdida de sincronización entre el ritmo del organismo y los ritmos ambientales. Por ello, diariamente debe existir un estímulo ambiental que sincronice las fases del organismo con el ambiente. Estos estímulos externos capaces de resetear a los relojes endógenos se conocen como “zeitgebers” (del alemán, *zeit* (tiempo) y *geber* (dador) o sincronizador, y en mamíferos, el principal zeitgeber es la luz ambiental [26, 27]. En el campo de los ritmos circadianos se utilizan dos términos para designar el tiempo

u hora del ciclo, el ZT (zeitgeber time) donde ZT0 es el momento en el que se inicia el estímulo sincronizador (generalmente la luz) y ZT 12, que es cuando la exposición al estímulo termina (generalmente, cuando se apagan las luces). Cuando el estudio se realiza en condiciones de luz u oscuridad constantes, se utiliza el término CT, el CT 0 corresponde al tiempo presuntivo de encendido de las luces (antes de poner en fotoperiodo constante). CT se utiliza también en cultivos celulares, donde CT 0 corresponde al inicio de la sincronización.

A diferencia de organismos como plantas, insectos o pez cebra donde distintos tejidos son capaces de ser sincronizados por estímulos luminosos, en mamíferos esta capacidad se restringe al NSQ. La sincronización por estímulos luminosos en mamíferos requiere de un sistema complejo que ocupa distintos tipos celulares [28], conos, bastones y una subpoblación de células ganglionares de la retina (denominadas intrínsecamente fotosensibles). La capacidad de sincronizarse por la luz de ciertos roedores carentes de conos y bastones dio lugar al descubrimiento de las células ganglionares de la retina intrínsecamente fotosensible, quienes directamente otorgan la capacidad de sincronización del reloj circadiano por señales luminosas ambientales. Además, dichas células reciben eferencias de los conos y bastones sirviendo como punto de integración [29, 30]. Anatómicamente, los axones de las células ganglionares de la retina son proyectados al NSQ permitiendo la sincronización directa con el fotoperiodo [31]. El pigmento presente en dichas células y que permite la detección de la luz azul es la melanopsina. Sin embargo, debido a su baja sensibilidad a la luz, en condiciones de escasa luminosidad se requiere de otras opsinas presentes por ejemplo en los bastones, para la correcta sincronización. Los bastones por sí mismos y en ausencia de otros tipos celulares fotosensibles, también permiten cierta sincronización bajo específicas condiciones luminosas [32]. Los conos contribuyen a una sincronización más fina gracias a su capacidad de discriminación de distintos colores en la luz como es el caso de variaciones en los niveles de luz azul y amarilla durante ciertos momentos del día [33].

La función del NSQ como oscilador central se ha demostrado en hamsters con la mutación  $\tau$  (tau), en los cuales los individuos heterocigotos tienen un periodo interno de 22 horas y los homocigotos de 20 horas. Se les realizó ablación de NSQ a hamsters WT, homocigotos y

heterocigotos y se observó que al transplantar células de NSQ correspondientes a hamsters con un periodo distinto, los hamsters adquirirían el ritmo en actividad locomotora con el periodo correspondiente al del animal del que recibieron el trasplante, con lo que se demuestra que el NSQ funciona como un marcapasos central en el organismo [25]. Además, neuronas aisladas de NSQ generan oscilaciones circadianas de manera individual en sus potenciales de acción [34]. En estas neuronas, conocidas como células reloj, se ha observado que el pico de la actividad es del CT6 al CT7. Dado que en el estudio mencionado anteriormente [34] se observó también que las oscilaciones de las células reloj individuales se encontraban desincronizadas, se hipotetizó que debía existir un mecanismo por el cual estas se sincronizaran. Debido a que GABA es el principal neurotransmisor del NSQ [35], se realizaron estudios para probar su papel en el acoplamiento de las células reloj y se observó que al aplicar GABA a células reloj en distintos tiempos circadianos (CT) se produce un corrimiento de fase. Se demostró también que pulsos de GABA durante un periodo de 5 días fueron capaces de sincronizar células reloj que en un inicio tenían fases opuestas de disparo [36].

#### *2.1.2.2 Sincronización de los relojes periféricos:*

La sincronización de los osciladores periféricos se lleva a cabo desde el NSQ mediante señales humorales, hormonales y neurales (Figura 2). Una de las más relevantes es la señalización por glucocorticoides; debido a ello se utiliza un corticoide sintético, la dexametasona, para sincronizar células en cultivo[37]. También se propone que podrían actuar moléculas pertenecientes a la vía de señalización de TGF-beta y activina, y se ha demostrado que dicha vía tiene un papel importante en la sincronización circadiana de los riñones y glándulas adrenales [38]. La melatonina es una hormona secretada por la glándula pineal durante la fase nocturna. La reducción en la actividad del NSQ, permite el inicio de la producción de melatonina[39]. Esta hormona también puede modular el reloj central al ser administrada por vía intravenosa en ratas, donde el efecto generado es dependiente del ZT en el que es administrada, generando cambios de fase [40]. La señalización neuronal del NSQ a tejidos periféricos se da a través del sistema nervioso autónomo mediante la liberación cronometrada de moléculas como el GABA, vasopresina y péptido intestinal vasoactivo [24].

El fotoperiodo que sincroniza al NSQ y posteriormente a todo el organismo mediante señales neuronales y humorales es el sincronizador más potente; sin embargo, hay otro tipo de estímulos que pueden servir como sincronizadores en algunos órganos y tejidos. Estos se denominan sincronizadores de segundo orden y algunos de ellos son la ingesta de alimento, interacciones sociales o la actividad física [41, 42].

De especial relevancia para esta tesis es el caso de la ingesta de alimento. Observaciones en distintos mamíferos han mostrado un comportamiento denominado actividad anticipatoria del alimento, que son variaciones en el comportamiento del animal momentos antes del periodo de disponibilidad de alimento. Este comportamiento parece ser independiente del reloj central ya que persiste en ratones *Bmal1*<sup>-/-</sup> [43]. En ratas de laboratorio, la actividad anticipatoria al alimento puede ser sincronizada a fases distintas corriendo las horas de alimentación [44]. Un hallazgo interesante que denota la importancia del alimento como sincronizador en determinados tejidos fue la observación de que, mediante la administración de alimento en momentos restringidos del día, los relojes del hígado y riñones en ratones KO para BMAL1 en el NSQ fueron sincronizados. Estos animales también conservaban la actividad anticipatoria del alimento [45]. Estudios más recientes en los que la alimentación de ratones se restringe temporalmente a la fase diurna (opuesta a la fase normal) muestran que, de manera interesante, la fase de expresión de los genes circadianos en hígado es opuesta a la de los animales con alimentación ad libitum (alimentación preferencial en la fase nocturna); sin embargo, el NSQ conserva su expresión circadiana normal y opuesta a la del hígado. Esto muestra un desacoplamiento del reloj central con el del reloj periférico del hígado, el cual se sincroniza preferencialmente por el alimento en horario restringido [46].

También se sabe que interacciones sociales son capaces de sincronizar el reloj circadiano desde etapas tempranas. En rata, se ha observado mediante la técnica de autoradiografía de 2 deoxiglucosa en el NSQ, que el metabolismo de glucosa ocurre de manera circadiana a partir del día 19 de gestación[47]. Interesantemente, dicha sincronización del reloj fetal se puede abatir mediante la ablación del NSQ de la madre durante la gestación, evidenciando la capacidad de generación de dicho ritmo del feto a partir del ritmo circadiano de la madre [48]. Posteriormente, existe evidencia del papel de la interacción social en la sincronización de los ritmos circadianos en estudios en los que grupos de animales se colocan en ciclos de

luz/luz u oscuridad/oscuridad y se observa que el ritmo de actividad para los individuos del grupo es sincrónico [49].

Otro tipo de estímulo que pueden funcionar como sincronizador es el ejercicio de resistencia en el músculo esquelético alterando la fase de expresión de algunos genes del reloj de manera independiente del NSQ, algo similar a lo mencionado anteriormente para el hígado [50].

## 2.2 Maquinaria molecular del reloj circadiano

La maquinaria del reloj circadiano se compone por loops de transcripción y traducción que se retroalimentan. El loop central activador está dado por el factor de transcripción heterodimérico CLOCK/BMAL1 formado por las proteínas CLOCK y BMAL1, ambas con motivo hélice bucle hélice básica (bHLH). El heterodímero CLOCK/BMAL1 se recluta de manera rítmica a su secuencia consenso en el genoma, denominada E-box (Figura 3).

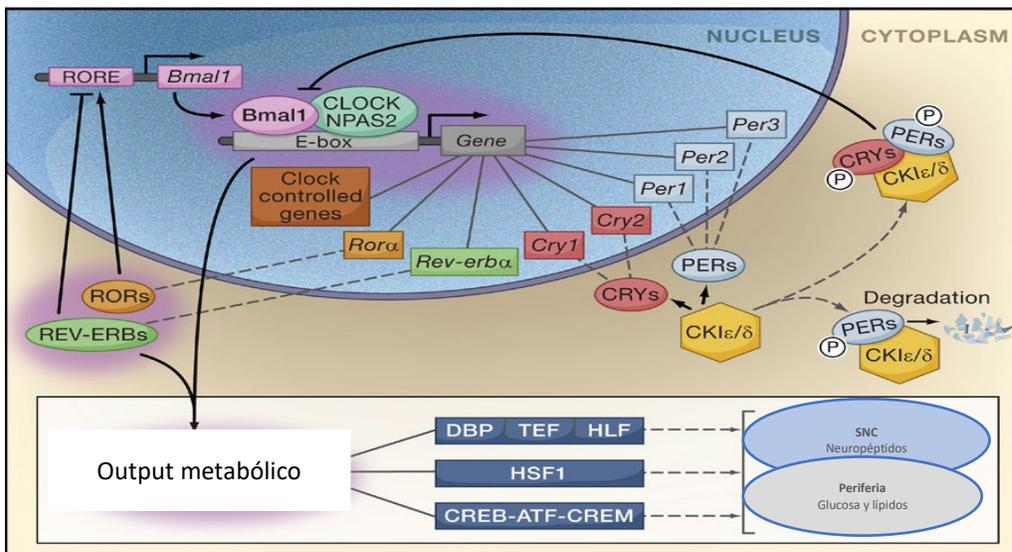


Figura 3 - *Mecanismo molecular del reloj central.*

El núcleo se muestra en color azul y el citoplasma en amarillo para diferenciar el compartimento en que ocurre cada proceso. Se ejemplifica el proceso con un CCG, el cual muestra el factor de transcripción heterodimérico CLOCK/BMAL1 unido a su secuencia consenso (E-box), entre los CCG se muestran los que dan lugar a las proteínas PER y CRY. Estas se acumulan en el citoplasma a lo largo del día y al final de este se translocan al núcleo donde inhiben la actividad de CLOCK/BMAL1 dando lugar a un loop de retroalimentación negativa. Se muestran las proteínas ROR's y REV-ERBs, que regulan la transcripción de *Bmal1* dando un nivel adicional de regulación del reloj. Por último, se muestra en la caja inferior un tercer nivel de regulación dado por CCG que codifican para factores transcripcionales en los que se encuentra DBP. Estos regulan diversos procesos metabólicos tanto en SNC como en la periferia. Figura adaptada de ([51]).

Esta se encuentra en los promotores de los genes controlados por el reloj (CCG), induciendo de esta manera su activación transcripcional. El reclutamiento rítmico de CLOCK/BMAL1

a la cromatina se ha observado en estudios de ChIP-PCR y ChIP-seq en tejidos de ratón. Las evidencias indican que el heterodímero CLOCK/BMAL1 se une de manera rítmica a la cromatina, concretamente a los elementos E-box localizados en sus genes blanco. La unión se produce entre los ZT6-8, y es entonces cuando el complejo activador puede desencadenar directamente fenómenos de expresión génica (Figura 4) [52, 53]. Entre los CCG que transcriben, se encuentran los represores de la maquinaria del reloj, que codifican para las proteínas Periodo (PER1-3) y Cryptocromo (CRY1-2) [54]. Estas proteínas comienzan a acumularse en el citosol hasta que son capaces de heterodimerizar en dímeros PER/CRY y translocarse al núcleo, donde reprimirán la actividad transcripcional de CLOCK/BMAL1. El mecanismo de inhibición no está bien definido, pero podría involucrar cascadas de fosforilación de los heterodímeros CLOCK/BMAL1, lo que podría provocar su disociación de los sitios E-box o determinar su estabilidad[55]. Los complejos PER/CRY tienen una vida media corta, son degradados por vía proteosomal [56, 57]. En general, se considera que cuando los niveles de represores comienzan a disminuir, los complejos CLOCK/BMAL1 quedarán libres para iniciar un nuevo ciclo de transcripción sobre los CCG [54]. Al analizar mediante ChIP-seq la dinámica de reclutamiento de los represores a la cromatina, se observa que aparecen durante la fase activa, a los ZT 16-20, en hígado de ratón[53]. Estos ciclos de activación y represión transcripcional mediados por la maquinaria molecular del reloj tienen una duración aproximada de 24 horas.

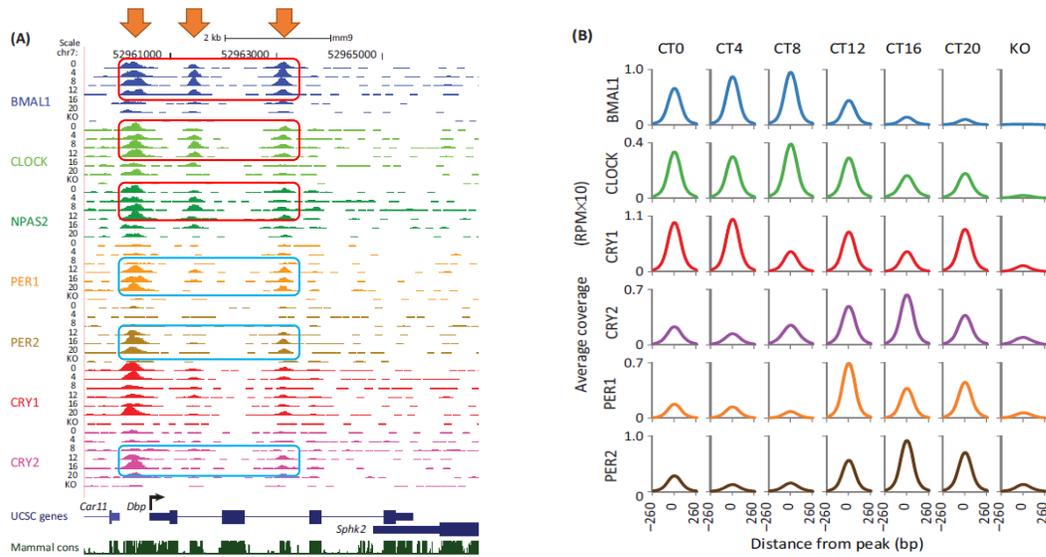


Figura 4 - Reclutamiento circadiano de la maquinaria del reloj en el gen *Dbp*.

A) Estudio de ChIP-seq en hígado de ratones para el promotor del gen *Dbp*. En el eje vertical al lado del nombre de cada proteína se muestran los tiempos circadianos (CT) del 0 al 20. Se observa ritmicidad en la unión de las proteínas mostradas a lo largo del día circadiano en distintas regiones regulatorias del gen *Dbp* (flechas). Se observa también que la fase de los activadores transcripcionales CLOCK, BMAL1 y NPAS2 (señalada en recuadros rojos) es opuesta a la de los represores PER1, PER2, CRY1 y CRY2 (recuadros azules). B) Cuantificación de la cantidad de proteína en el gen *Dbp* a distintos tiempos circadianos, mostrando las fases invertidas en las proteínas activadoras y represoras ([54]).

Un nivel adicional de regulación está dado por los receptores nucleares RORs y REV-ERBs, los cuales regulan la transcripción de BMAL1 (gen *ARNTL1*) y en menor medida de *clock*. Las proteínas ROR son un activador de la transcripción mientras que los REV-ERB funcionan como represores, y ambos actúan mediante la unión a los elementos RORE en los promotores de genes[58]. La expresión circadiana de *Rora* (ROR $\alpha$ ) y *Nr1d1* (REV-ERB $\alpha$ ) que compiten por la unión a los sitios RORE en el promotor de *ARNTL1* otorga ritmicidad a su transcripción, generando un loop de retroalimentación auxiliar que brinda mayor robustez al reloj circadiano [26]. El pico en la transcripción de *Ror* corresponde al pico en la transcripción de los genes *CLOCK* y *ARNTL1* mientras que el pico del gen *Nr1d1* corresponde con sus niveles más bajos de transcrito [59]. De manera interesante en estudios de ChIP-seq de REV-ERB $\alpha$  en hígado de ratón, también se ha observado la unión de esta proteína a elementos regulatorios muchos de los cuales están asociados a metabolismo lipídico durante el ZT 10 mientras que en la fase opuesta, a ZT22, prácticamente la señal de

REV-ERB $\alpha$  en estos sitios es nula, evidenciando la unión rítmica de esta proteína a la cromatina [60].

Adicionalmente a estos mecanismos de regulación mencionados, entre los CCG transcritos por CLOCK/BMAL1 (Figura 4) se encuentran los genes correspondientes a los factores de transcripción DBP, TEF y HLF, quienes constituyen la familia PAR-bZIP (Ricos en Prolina y aminióácidos ácidos cremallera -ZIPper- de leucina básica). Estos factores de transcripción se unen a las secuencias consenso D-Box y dan lugar a la transcripción rítmica de otra serie de genes [1]. Entre estos se ha visto que el gen *Per1* tiene un sitio de unión de proteínas PAR al cual se demostró DBP es capaz de unirse e inducir su transcripción. Dado que el gen *Per1* tiene adicionalmente 3 sitios E-box, se demostró también que DBP es capaz de potenciar la transcripción dada por la unión de CLOCK/BMAL1 a dichos sitios E-box, indicando que DBP podría tener un papel en el loop circadiano principal [61]. Por tanto, los factores de transcripción PAR constituyen un nivel adicional de regulación circadiana, ya que al estar presentes estos factores de transcripción de manera cíclica, impondrán ritmicidad a genes subordinados.

### 2.2.1 El gen *Dbp*

De los 3 factores PAR bZip, *Dbp* (D-box binding protein) es el que surgió más temprano en la evolución a partir de *Pdp1* de *Drosophila*. Posteriormente, surgieron *Hlf* y *Tef*. En algunos grupos de vertebrados se perdió *Dbp*; sin embargo, los mamíferos conservan los 3 factores transcripcionales. Por la cantidad de genes que regulan y su conservación en mamíferos, se deduce la importancia de cada uno de estos factores transcripcionales para la adecuada regulación de los procesos en que se encuentran involucrados [62].

DBP, HLF y TEF debido al motivo bZip son capaces de homo y heterodimerizar, formando preferencialmente homodímeros y heterodímeros entre ellos tres a dímeros con otros factores transcripcionales con motivo bZip. Esto aumenta la complejidad en la regulación génica que pueden ejercer estos tres factores transcripcionales [63].

Ratones KO para los tres factores PARbZip mueren prematuramente (durante los primeros tres meses), generalmente debido a crisis epilépticas espontáneas e inducidas por sonido.

Esto se atribuye a un desbalance en los niveles de neurotransmisores originado por la deficiencia de la enzima piridoxal cinasa, involucrada en la síntesis de piridoxal fosfato, un cofactor de enzimas relacionadas en la síntesis de aminoácidos y por lo tanto de neurotransmisores derivados de estos [62].

Después de tres meses, estos ratones triple KO continúan muriendo de manera prematura y muestran señales de envejecimiento prematuro. Esto se atribuye principalmente a disminución en la expresión de genes relacionados con la detoxificación de xenobióticos, proceso en el que se ha observado pertenecen la mayor parte de los genes regulados por estos factores transcripcionales. Entre los genes regulados por los factores PARbZip, se encuentran genes involucrados en las tres fases de la detoxificación de xenobióticos: modificación, conjugación y excreción. Por lo tanto, este proceso de detoxificación ocurre de manera circadiana, estando favorecido durante la fase nocturna[62, 64].

De manera interesante, se ha observado que ratones KO para los tres factores PARbZip, presentan alteraciones en el metabolismo de xenobióticos. Algunos genes regulados por estos factores presentan disminución en sus niveles, como es el caso de *Cyp2c50* y *Cyp2b10*, mientras que otros presentan alteraciones en sus perfiles circadianos de expresión como *CAR* y *Alas1*. Los animales muestran características propias de estrés debido a xenobióticos, como un aumento en la masa hepática, niveles elevados de la alanina amino transferasa y desempeño bajo en la prueba de eliminación de fenobarbital [65].

En hígado de ratón, *Dbp* (D-box binding protein) es el que presenta mayor amplitud en sus oscilaciones circadianas, y la diferencia entre el pico y el punto más bajo de concentración proteica es aproximadamente del triple [66]. En hígado, *Dbp* tiene un pico en su nivel de mRNA entre los ZT 8-9, en la misma fase que *Hlf* y *Tef* (Figura 5A) y opuesta al represor transcripcional *E4bp4* (*Nfil3*) (Figura 5A). A nivel de proteína, los niveles máximos de DBP se acumulan entre ZT 12-16, de manera opuesta al represor E4BP4 (Figura 5B) [1]. Interesantemente, durante los picos de transcripción de *Dbp*, se observó mediante CHIP que dicho gen se encuentra enriquecido en las marcas acetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9ac) y trimetilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me3), las cuales están relacionadas con cromatina transcripcionalmente activa. Por otro lado, la marca dimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me2) y proteína de heterocromatina 1 (HP1), que se

asocian a cromatina silenciada, se encuentran enriquecidas de manera antifásica a las marcas anteriores, por lo cual el gen *Dbp* experimenta transiciones entre eucromatina y heterocromatina facultativa a lo largo del día [67].

En ensayos de EMSA para la región a la que se unen los factores de transcripción PAR, se ha observado que al aplicar extracto celular de ratones control y nulos para *Dbp*, que el grupo control da una marca de alta intensidad en los ZT 16 y 20 mientras que la marca se pierde casi por completo en los ratones nulos para *Dbp*. Por lo tanto, se conoce que la proteína DBP es la que se une de manera predominante a los sitios de unión a PAR y que la proteína está presente en mayor cantidad a los ZT mencionados [68]. Ratones nulos para *Dbp* han demostrado también tener un periodo significativamente más corto, así como una disminución en su actividad locomotora en comparación a ratones WT [68]. Entre los genes transcritos por DBP se encuentran la albúmina, colesterol 7  $\alpha$  hidroxilasa, involucrada en la síntesis de colesterol, y genes del citocromo P450, implicados en la detoxificación de xenobióticos [61].

Dentro de la secuencia del gen *Dbp*, se han identificado siete sitios de hipersensibilidad a DNAsa1. Cinco de estos sitios oscilan con la misma fase de oscilación que la transcripción de *Dbp*, y en tres de ellos existen motivos E-box (CACGTG) [69]. Estas E-boxes son blancos para la unión del complejo CLOCK/BMAL1 (Figura 4) y, en ratones transgénicos con mutaciones en estos sitios, la unión de complejos CLOCK/BMAL1 y las oscilaciones en las marcas epigenéticas disminuyen, lo que genera silenciamiento transcripcional del gen[67].

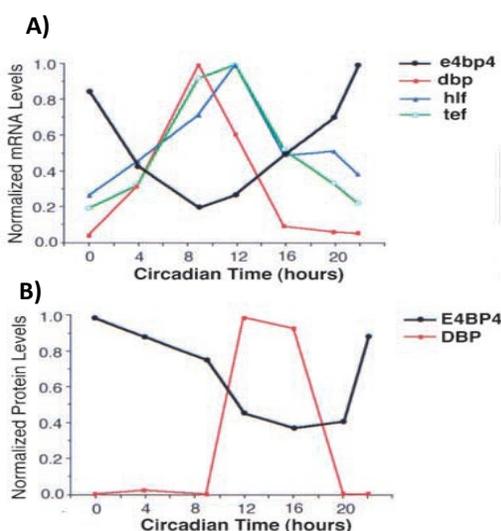


Figura 5 - Niveles circadianos de mRNA y proteína de los factores PAR-Bzip

Niveles de ARN para los distintos factores de transcripción PAR, activadores (*Dbp*, *Hlf* y *Tef*) y represor (*E4bp4*). En el caso de los activadores, el pico de transcripción es del CT 8 al 10 mientras que el represor tiene una fase inversa. En el panel inferior se muestran los niveles de proteína para DBP. DBP se acumula a CT 10-18, mientras que el represor E4BP4 presenta la fase inversa([1]).

### 2.2.1.1 Ritmos circadianos en hígado

En los relojes periféricos, la alimentación ha demostrado ser un zeitgeber importante (Figura 6). Dado que la fisiología de la mayoría de órganos está relacionada con la ingesta de alimento y agua, se ha observado en estudios en roedores (alimentación nocturna 80%) que al proveer de alimento solo durante la fase lumínica (o periodo de descanso en los roedores), los ritmos en la transcripción de genes circadianos invierten su fase en el hígado. Entre los genes que se analizaron, se encuentran *Per1-3*, *Cry1-2* y *Dbp*. Para riñón, páncreas y corazón, el gen *Dbp* también presenta dicha fase invertida [46, 70].

El hígado es el segundo órgano de mayor tamaño en el organismo, representando del 1.5 al 2.5 % del peso corporal seco. Este órgano tiene una función metabólica importante en el debido a que participa en la homeostasis de carbohidratos (glucogenogénesis, glucogenólisis y gluconeogénesis), lípidos (lipogénesis,  $\beta$  oxidación, síntesis de lipoproteínas, colesterol y fosfolípidos) y de proteínas (transaminación, desaminación y síntesis de urea) [71]. Puesto que muchos de estos procesos metabólicos que se realizan en el hígado presentan ritmicidad circadiana (Figura 6), muchos de los genes que codifican para enzimas limitantes en estos procesos se transcriben rítmicamente. En total, un 15-25% del transcriptoma hepático es rítmico. Consecuentemente, en el hígado y en distintos tejidos involucrados en la digestión, los ritmos de alimentación – ayuno del organismo son un importante zeitgeber (Figura 6) [72]. Adicionalmente, el hígado juega un papel importante en la respuesta a drogas y xenobióticos gracias a la expresión de un gran número de enzimas y receptores involucrados en su biotransformación [73].

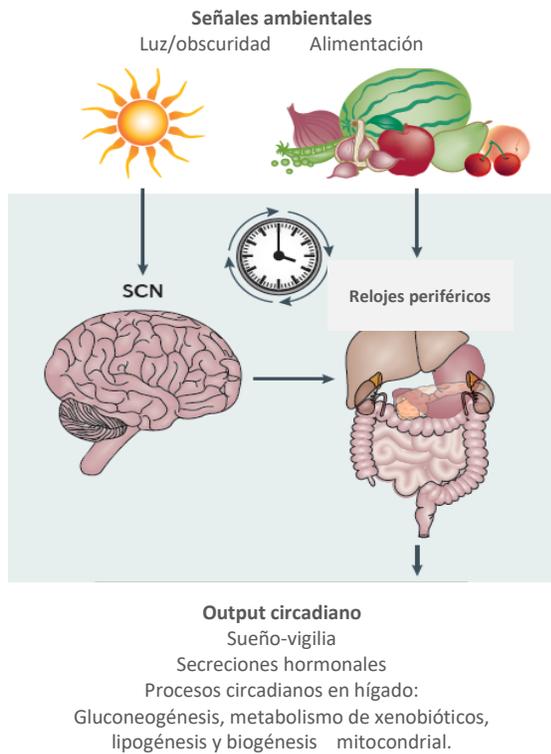


Figura 6 - *Ritmos circadianos en el hígado.*

Del lado izquierdo de la figura se muestra el reloj central (SCN) sincronizado mediante estímulos luminosos al fotoperiodo ambiental, esta estructura es la encargada de sincronizar a los relojes periféricos en el resto del organismo al ritmo ambiental. Del lado derecho se muestran relojes periféricos involucrados en el metabolismo. Adicionalmente a la sincronización dada por el SCN, el alimento es un sincronizador muy importante en estos órganos. En el recuadro inferior se muestran algunas respuestas fisiológicas del organismo que presentan ritmicidad. ([72]).

### 2.2.2 El reloj molecular regula un epigenoma circadiano

Los ritmos circadianos se basan en la generación de programas transcripcionales con especificidad temporal, es decir genes que se transcriben durante cierta fase del día y permanecen silentes durante la opuesta, esto requiere que la cromatina sea altamente dinámica. La secuenciación masiva ha permitido el descubrimiento de características asociadas a la transcripción o represión génica a nivel del genoma de manera circadiana.

#### 2.2.2.1 Elementos regulatorios que oscilan en el genoma

Una primera aproximación para determinar la presencia de elementos regulatorios (promotores, enhancers, silencers e insulators) es la búsqueda de sitios de hipersensibilidad a DNasa (DHS), los cuales corresponden a secuencias depletadas de nucleosomas, asociadas a sitios accesibles para la unión de factores de transcripción o proteínas arquitectónicas [74]. Para los genes circadianos, la señal en los DHS oscila, siendo mayor durante su periodo de actividad transcripcional, y menor en la fase opuesta en la que sus niveles transcripcionales son muy bajos o nulos [75]. Ensayos de footprinting, los cuales son indicativos de protección

de la actividad de la DNAsa por unión de proteínas al DNA como factores de transcripción, corroboran estas observaciones[75].

En hígado de ratón, se ha observado que los heterodímeros CLOCK/BMAL1 se pueden unir a elementos “enhancer”. En este sentido, se ha reportado que aproximadamente el 30% de eRNA’s (RNAs derivados de elementos enhancer) presentan oscilaciones. Además, el 76% de CCG tienen un eRNA asociado oscilando en una fase similar a la suya dentro de una distancia de 200kb del sitio de inicio de la transcripción (TSS). Los enhancers circadianos están enriquecidos en motivos E-box, D-box así como Rev-DR2 y RORE’s, lo cual apunta a que son regulados por factores transcripcionales de la maquinaria molecular circadiana (Figura 7) [76].

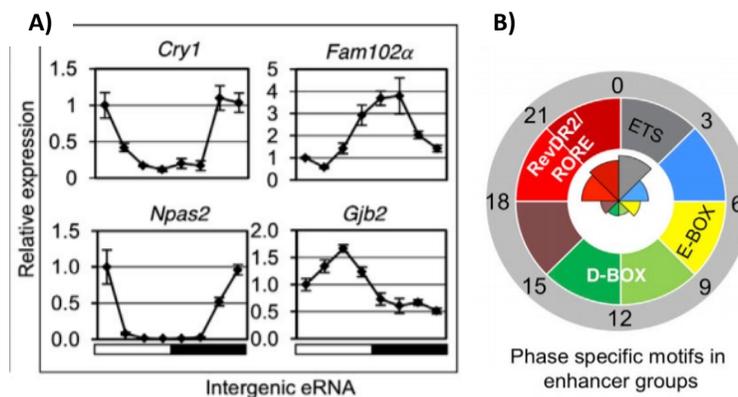


Figura 7 - eRNA's circadianos y regulación por factores transcripcionales circadianos.

En el panel A) se muestra la oscilación en los niveles de eRNA's circadianos la cual es indicativo de la actividad oscilatoria de los enhancer. En el panel B) se muestra la presencia de motivos en distintas fases del ciclo enriquecidos de acuerdo a los eRNA's expresados en dichas fases. ([76])

#### 2.2.2.2 Modificaciones postraduccionales de las histonas presentan dinámica circadiana.

Los factores transcripcionales interactúan con una serie de remodeladores de la cromatina para volver la cromatina más o menos accesible para la transcripción. Estudios de ChIP-seq demuestran que la polimerasa II (Pol II) así como las marcas de histona trimetilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me3) y de la lisina 36 y (H3K36me3), relacionadas con promotores de genes transcripcionalmente activos y elongación de la transcripción respectivamente, aparecen rítmicamente en los CCG, encontrándose enriquecidas durante la fase de mayor actividad transcripcional y disminuidas en la fase inversa [77].

Otra modificación asociada con activación transcripcional es la acetilación de histonas. La introducción de grupos acetilo en los residuos de lisina de las histonas neutraliza sus cargas positivas, y por tanto disminuye la afinidad de unión del ADN con las histonas. La acetilación de histonas confiere a la cromatina un estado laxo permitiendo la asociación de otras proteínas al ADN [78]. En este sentido, las marcas acetilación de la lisina 9 y la lisina 27 de la histona H3 (H3K9ac y H3K27ac) aparecen rítmicamente en los CCG. La primera tiene un incremento en la señal observada durante la fase diurna de acuerdo a lo esperado debido a la actividad transcripcional propiciada por la actividad del heterodímero CLOCK/BMAL1. Sin embargo, para la H3K27ac se encontró que la mayor señal está presente en la fase opuesta. Esto podría ocurrir debido a que H3K27ac es una marca enriquecida principalmente en elementos enhancer, los cuales podrían tener una fase de actividad más amplia o distinta a los CCG. También esta tendencia fue observada para la marca H3K4me1 característica de enhancers [53].

El complejo CLOCK/BMAL recluta a las acetil transferasas de histona (HATs) P300, CBP y PCAF, favoreciendo la transcripción de sus genes blanco [79]. Se ha observado que el heterodímero CLOCK/BMAL1 activa la transcripción de *Per1* mediante acetilación de la histona H3 en su promotor. Se propone como responsable de esta acetilación a la HAT P300, ya que se asocia con la proteína CLOCK, en el ZT6 que corresponde al momento en que CLOCK/BMAL1 se encuentra unido a la cromatina[80]. La acetilación de H3 también está presente en los promotores de los genes *Per2*, *Cry1* y *Dbp* cuando están transcripcionalmente activos. Además, la proteína CLOCK posee un dominio de acetil transferasa, así como motivos de unión a acetil CoA y tiene actividad HAT. Al ser mutados los dominios mencionados, se silencian los CCG. CLOCK tiene alta especificidad para introducir grupos acetilo en las histonas H3 y H4 siendo las marcas H3K14ac y H3K9ac las generadas mayoritariamente por esta proteína [81] [82].

Para la regulación circadiana de la transcripción debe existir un balance entre acetilación y desacetilación de los genes a lo largo del día (Figura 8). Una de las proteínas responsables de mantener este balance es la desacetilasa de histonas (HDAC) SIRT1, la cual tiene actividad que oscila de manera circadiana en hígado de ratón, presentado su pico durante la fase de menor actividad transcripcional de genes circadianos regulados por CLOCK/BMAL1

(ZT15). Interesantemente, al analizar la acetilación de H3 en el promotor del gen *Dbp* en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) sincronizados, se observó que oscila en fase con la transcripción del gen. Los inhibidores de SIRT1 eliminan la ritmicidad en la acetilación del promotor de *Dbp*, provocando a nivel transcripcional un aumento sostenido en los niveles de transcrito. Interesantemente, SIRT1 se recluta rítmicamente al promotor y E-box del intrón 1 de *Dbp* [83]. Estos datos revelan que SIRT1 juega un papel indispensable para la regulación circadiana del gen *Dbp*.

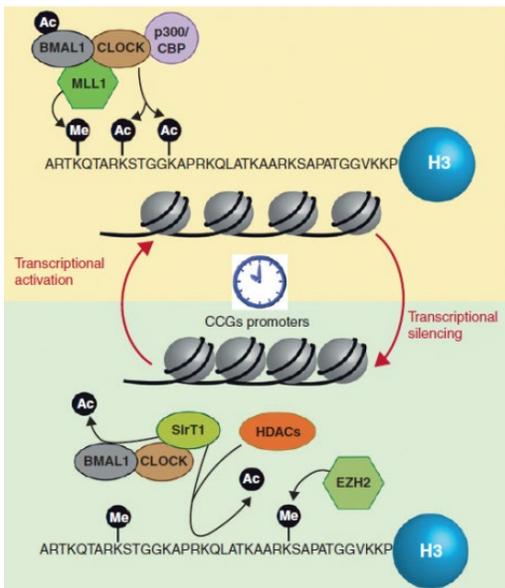


Figura 8 - Enzimas modificadoras de histonas participan en la regulación de CCG.

En la figura se muestran en la parte superior las modificaciones en la histona H3 que ocurren durante la fase diurna, los activadores CLOCK/BMAL1 reclutan a las acetilasas de histona p300 y CBP así como a la metilasa MLL1, estas HAT's junto con CLOCK que tiene función como acetilasa de histona realizan modificaciones asociadas con la activación transcripcional en los promotores de los CCG. En la fase opuesta del día circadiano el reclutamiento de Sirt1 por parte de CLOCK/BMAL1 así como de otras HDAC's remueven los grupos acetilo de las histonas, la proteína metil transferasade histona EZH2 introduce marcas represoras en las histonas. Los CCG se encuentran transcripcionalmente reprimidos ([2]).

De manera importante, SIRT1 utiliza como cofactor para sus reacciones de desacetilación al metabolito dinucleótido de nicotinamida y adenina ( $NAD^+$ ). Por ello, se postula que el  $NAD^+$  podría ligar el estado metabólico del organismo con cambios en la expresión génica [84]. El  $NAD^+$  oscila de manera circadiana debido a la oscilación de una enzima involucrada en su principal ruta biosintética en mamíferos, la NAMPT, cuyos niveles de mRNA y proteína oscilan en hígado de ratón en fase con los ritmos en la oscilación de su metabolito asociado  $NAD^+$  [85]. Esto también se ha visto en MEFs, donde adicionalmente se demostró el vínculo directo de la oscilación de  $NAD^+$  con la maquinaria central del reloj circadiano. Así, en MEFs KO para *Clock* y para *Cry1/Cry2*, la oscilación del  $NAD^+$  se pierde. El complejo CLOCK/BMAL1 se recluta al promotor de *Nampt* durante su fase transcripcionalmente activa[86]. Este mecanismo podría por lo tanto contribuir a la actividad circadiana de SIRT1, y es sensible a ciertas condiciones como la alimentación con dietas ricas en grasas [87].

Adicionalmente, REV-ERB $\alpha$  recluta a la desacetilasa HDAC3 presente en un complejo con NCoR durante su fase de unión a sus elementos blanco RORE (ZT10), promoviendo la desacetilación de H3K9 en estas regiones en hígado de ratón. En ratones KO para HDAC3, los genes regulados por REV-ERB $\alpha$  (muchos de los cuales se encuentran asociados con metabolismo lipídico) se encuentran sobreexpresados, demostrando la importancia de REV-ERB $\alpha$  en la ritmicidad transcripcional de CCG así como el proceso de metabolismo de lípidos [60].

Se ha observado también oscilación en las marcas H3K27me2 y H3K27me3 asociadas con represión transcripcional. Estas marcas aumentan en los promotores de *Per1* y *Per2* durante la fase nocturna (ZT 18-24), que correlaciona con el reclutamiento a la cromatina de la metiltransferasa de H3K27 EZH2 [88].

### 2.3. Arquitectura espacial de los genes en el núcleo

El genoma no está distribuido aleatoriamente en el núcleo celular, existen distintos niveles de organización y dominios en los que se organiza tanto a nivel nuclear como intracromosomal (Figura 9).

#### 2.3.1 Organización nuclear del genoma en territorios cromosómicos.

Desde un punto de vista del posicionamiento de los cromosomas en el núcleo, se organizan los territorios cromosómicos, que corresponden con regiones discretas del núcleo donde se ubican los cromosomas en interfase [89]. Además, se conocen algunas características definidas respecto a la posición radial de regiones cromosómicas dentro del núcleo: las regiones del cromosoma que son ricas en genes tienden a ubicarse en el centro del núcleo, mientras que las regiones con baja densidad de genes se ubican en la periferia. También los cromosomas con baja densidad génica tienen una posición periférica respecto a aquellos con alta densidad génica [90].

Estos dominios, sin embargo, no representan unidades restrictivas para el contacto de regiones pertenecientes a distintos cromosomas ya que, en los bordes de los territorios cromosómicos, secuencias de distintos cromosomas entran en contacto mediante la formación de asas de cromatina, las cuales son de relevancia para la regulación transcripcional del genoma [91].

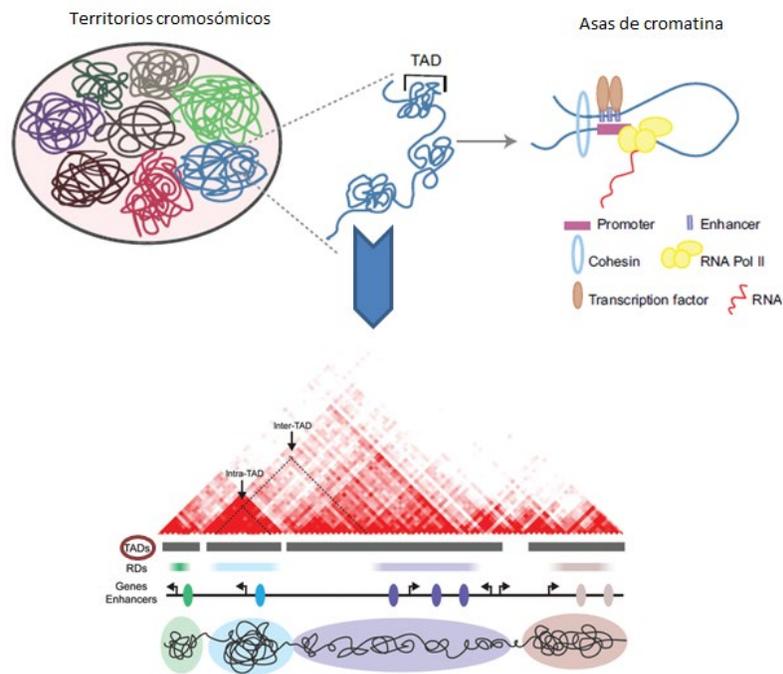


Figura 9 - *Compartimentalización del genoma.*

El genoma se encuentra organizado en varios niveles, en orden jerárquico los territorios cromosómicos, compartimentos, TAD's y asas de cromatina. Los TAD's se pueden distinguir en matrices de Hi-C como se muestra en la parte inferior de la figura. Su papel es el de restringir las interacciones enhancer promotor al interior del TAD. Las asas de cromatina generalmente ponen en contacto elementos regulatorios enhancer-promotor.

### 2.3.2 Compartimentos

Con el surgimiento de la técnica Hi-C que permite la evaluación de las interacciones de todo el genoma de manera simultánea, una de las primeras observaciones fue que los cromosomas se pueden dividir en dos distintos compartimentos, los contactos entre loci del mismo compartimento se encuentran enriquecidos mientras que al analizar los contactos entre loci de distinto compartimento estos se encuentran disminuidos. A estos compartimentos se les denominó A y B.

Los compartimentos no se restringen al nivel de cromosoma, la compartimentalización se conserva a nivel de todo el genoma, es decir, la tendencia de encontrar mayor frecuencia de interacción entre loci pertenecientes al mismo compartimento se conserva también en trans [92]. La cromatina está más densamente empaquetada en el compartimento B, mientras que el compartimento A está enriquecido en genes, presenta mayores niveles transcripcionales y es más accesible. El compartimento B también está enriquecido en las marcas H3K36me3 y H3K27me3. Por tanto, en general se acepta que el compartimento A contiene regiones transcripcionalmente activas y el B engloba regiones de heterocromatina [92].

Los compartimentos A y B pueden reorganizarse durante la diferenciación celular. De este modo, regiones que pasan del compartimento A al B presentan disminución de su actividad transcripcional mientras que el paso de B al A conlleva un aumento. En general, durante la diferenciación se gana heterocromatina, produciéndose una expansión del compartimento B, mostrando que está directamente relacionado con el estado de heterocromatina [93].

El mecanismo mediante el cual se forman los compartimentos aún no está completamente descrito. Parece ser independiente de cohesina así como de la proteína arquitectural CTCF, quienes si están involucradas en la formación de loops. Algunos de los mecanismos propuestos involucran la separación de fases [94] que podría estar dada por la formación de heterocromatina, o la transcripción [95].

### 2.3.3 Dominios asociados topológicamente

Los compartimentos están formados por segmentos de cromatina o bloques que constituyen la unidad básica de organización del genoma, denominados dominios asociados topológicamente (TAD's). El descubrimiento de estas unidades fue posible gracias a la generación de experimentos de Hi-C con mayor resolución a expensas del aumento de la profundidad de secuenciación [92]. Con estos datos, una de las observaciones realizadas fue que existen regiones que presentan frecuencias muy altas de interacción dentro de sí. A partir de cierto punto, las interacciones disminuyen abruptamente, sugiriendo la presencia de barreras en la periferia de los TAD's que los mantienen aislados de los adyacentes [96]. Los motivos de CTCF convergentes presentes en el borde de algunos TAD's dan lugar a la formación de asas de cromatina que abarcan la totalidad del TAD, a estas estructuras se les denomina dominios de loop [97].

Generalmente, en las fronteras de TAD's se encuentran sitios de unión de la proteína CTCF. A diferencia de la formación de loops que requiere de sitios de CTCF convergentes (Forward – Reverse), en las fronteras del TAD la gran mayoría de pares de sitios CTCF (90%) tienen orientación divergente (Reverse – Forward). Esto sugiere que los sitios de CTCF en esta orientación son capaces de establecer una barrera o insulador que restringe las interacciones entre los TAD's [98].

Otra característica de los TAD's es que los loci dentro de un TAD tienden a compartir el mismo estado cromatínico, la similitud en el estado cromatínico de loci dentro de un mismo TAD no se mantiene al compararlos con loci equidistantes pero localizados en otro TAD [97].

Se ha demostrado que los TAD's tienen un papel en la regulación génica, las fronteras de los TAD restringen la función de los elementos enhancer a los genes localizados dentro del TAD y evitan que activen ectópicamente genes localizados en otros TAD's, la disrupción de las fronteras genera disrupciones en la regulación génica [99].

#### 2.3.4 Asas de cromatina

Las interacciones entre dos loci dentro del TAD, típicamente enhancer-promotor, así como entre las fronteras de algunos TAD's dan lugar a estructuras denominadas loops o asas de cromatina. Dentro del TAD, estas estructuras colocan en proximidad espacial elementos regulatorios distales en la secuencia lineal (generalmente ubicados dentro de 1 Mb de distancia del gen) con sus genes blanco, permitiendo la regulación espacio-temporal de la expresión génica [76, 100, 101]. Gracias al análisis con técnicas de captura conformacional de cromosomas, se ha observado que la frecuencia de interacción entre secuencias relacionadas funcionalmente es más alta que con otras secuencias no relacionadas entre sí que tienen distancias similares de separación. El modelo más aceptado para la formación de asas de cromatina es el denominado modelo de extrusión de asa, en el cual se propone la participación de factores de extrusión de asa (complejos multiprotéicos cohesina). Aunque los mecanismos aún no se encuentran totalmente descritos, una de las ideas más apoyadas es que el complejo cohesina forma una horquilla a través de la cual transloca la fibra de cromatina, esto requiere de la hidrólisis de ATP. La elongación del asa ocurre hasta que es detenida por proteínas arquitecturales como pares de CTCF en orientación convergente,

CTCF o YY1. De esta manera, el posicionamiento de ciertas proteínas arquitectónicas determinará el alcance del asa.

Adicionalmente, el complejo cohesina sufre un recambio constante mediado por el complejo que carga cohesina Scc2/NIPBL-Scs4/MAU2 y el factor liberador de cohesina Wapl, permitiendo la remodelación dinámica de la arquitectura del genoma [102].

### 2.3.5 Fábricas transcripcionales

Otro dominio nuclear importante son las denominadas fábricas transcripcionales. Mediante marcaje con Br-UTP, se aprecia que la transcripción no ocurre de manera homogénea a lo largo de todo el núcleo, sino que se lleva a cabo en regiones discretas a las que se les denomina fábricas transcripcionales [103]. Estas regiones colocalizan con cúmulos de la enzima RNA pol II activa [104], en un promedio de 5 moléculas de RNA pol II por fábrica, así como complejos remodeladores de la cromatina, factores de transcripción y modificadores de histonas (Figura 10) [105]. Se ha observado también en células eritroides que genes distantes entre sí en la secuencia lineal (hasta 40 Mb) tienden a colocalizar en fábricas transcripcionales. Además, el porcentaje de colocalización aumenta en alelos que están transcripcionalmente activos, indicando que al momento de la transcripción los genes migran a las fábricas transcripcionales [106]. La asociación de distintos genes en las fábricas transcripcionales no es aleatoria. Por una parte, la gran mayoría de genes que se asocian se encuentran en *cis*, y se atribuyen a genes ligados debido a su cercanía en la molécula de ADN; sin embargo, también se observan ciertas asociaciones en *trans* que son relevantes, el caso más estudiado es el de los genes de receptores olfatorios y elementos enhancer intergénicos distribuidos en distintos cromosomas [107, 108] o la colocalización del gen de interferón  $\gamma$  con sitios hipersensibles a la DNAsa (correspondientes a promotores y elementos enhancer) ubicados en otros cromosomas en el locus génico de citocinas TH2 [109].

Interesantemente al hacer un análisis de motivos de las secuencias que interactúan con los genes *Hba* y *Hbb* (hemoglobina alfa y beta), se encontró enriquecimiento en el motivo del factor transcripcional KLF1 (Kruppel Like Factor 1), regulador de genes eritroides y principal input regulatorio de *Hba* y *Hbb*. Esto sugiere la presencia de asociaciones de genes co-regulados por un factor transcripcional [110]. Estos resultados demuestran que el

interactoma de una fábrica transcripcional estaría formado por una asociación funcional y específica de genes co-regulados transcripcionalmente. (Figura 9) [111].

Modelos de plegamiento de polímeros predicen un decremento en la frecuencia de contactos más allá de 1 Mb de distancia, lo cual se puede observar claramente en mapas de interacción de Hi-C o 4C [112]. Esto no excluye la posibilidad de que dichos contactos sucedan, sin embargo, estarían presentes únicamente en ciertas células en las que estas regiones distales y cromosomas (para el caso de interacciones intercromosomales) se encuentren en proximidad. Este evento daría lugar a una regulación variegada para este tipo de interacciones muy distales [113].

Más recientemente, en estudios de ChIA-PET, una técnica que permite la detección de interacciones a nivel de todo el genoma en cromatina previamente inmunoprecipitada para una proteína particular, se ha observado que secuencias de DNA con sitios de unión para el receptor de estrógenos tienden a contactarse. De manera interesante, se encuentra que las interacciones más representadas son las que presentan mayor enriquecimiento en motivos de unión a este factor transcripcional [114]. En otro estudio, se realizó ChIA-PET inmunoprecipitando PolIII, y se encontró que la mayoría de los genes involucrados en interacciones y con unión de PolIII se encuentran en complejos multigenes (más de dos genes), además de que los genes involucrados en estos complejos tienden a tener niveles mayores de transcripción. Estos resultados ponen en evidencia desde una perspectiva de análisis molecular la existencia de fábricas transcripcionales, donde genes activos transcripcionalmente se encuentran agrupados (Figura 10) [115].

Posteriormente, surgieron estudios en los que se explora la importancia de la formación de estos complejos de asociación entre genes activos y que sugieren un mecanismo de regulación de la transcripción adicional a los dados por el promotor y elementos enhancer [116, 117]. Se encontró que existe un grupo de promotores con marcas epigenéticas similares a las de los enhancer y muy enriquecidos en motivos de unión de factores transcripcionales. Estos promotores potencian la actividad transcripcional de genes con los que interactúan [118]. Además, se demostró también mediante ensayos de reportero que estas secuencias favorecen la transcripción independientemente de su orientación y al colocalizar con genes activos transcripcionalmente, se proponen como un elemento adicional de regulación en las

fábricas transcripcionales [117]. Esto ha sido probado también en células troncales embrionarias de humano mediante un ensayo masivo de delección por CRISPR-Cas9 [116].

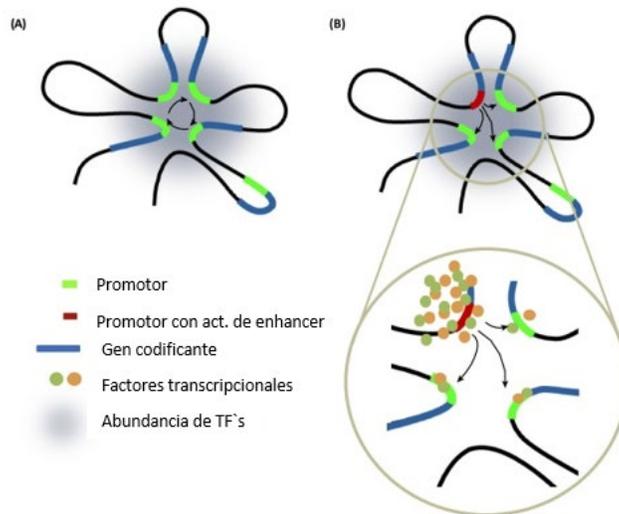


Figura 10 - Regulación génica en fábricas transcripcionales.

Modelo actualizado de una fábrica transcripcional, esta se constituye por zonas ricas en genes activos transcripcionalmente, polimerasa II, factores transcripcionales y elementos regulatorios. Genes con alta capacidad de reclutamiento de factores transcripcionales propician un nicho que favorece la transcripción de genes regulados por los factores transcripcionales enriquecidos [118].

## 2.4 Técnicas para el estudio de la arquitectura del genoma

Los primeros indicios de que el genoma se tiene una organización particular dentro del núcleo provienen de las observaciones de Emil Heitz en cromosomas de *Drosophila* en los cuales describe dos tipos de cromatina en base a su nivel de condensación en tinciones de cromosomas, a las regiones más densas les denominó heterocromatina y a aquellas con una menor densidad eucromatina [119]. Posteriormente con los primeros estudios de microscopía electrónica se observa que la periferia nuclear es más electrodensa que la región central [120], posteriormente se determinaría que la región electrodensa corresponde a heterocromatina [121].

Posteriores estudios de arquitectura del genoma se realizaron con técnicas de microscopía mediante el marcaje del ADN con sondas específicas (FISH), esto permite la visualización de secuencias que se encuentran en proximidad. Sin embargo, la resolución no permite asegurar con certeza que existe una interacción física entre dichas secuencias. Presenta

también como desventaja que el número de secuencias analizadas simultáneamente es limitado. Mediante FISH se pueden estudiar interacciones a nivel de célula única y determinar el porcentaje de la población en la cual las secuencias se encuentran en proximidad. Permite además determinar la posición radial que las secuencias ocupan en el núcleo [122, 123].

Con el desarrollo de la técnica de captura conformacional de la cromatina (3C) [124] y subsecuentes modificaciones a esta técnica (4C, 5C, Hi-C y ChIA-PET) se puede obtener un panorama detallado de las interacciones que ocurren a lo largo del genoma. De manera general, la técnica 3C consiste en el entrecruzamiento de la cromatina con un agente fijador (formaldehído), el cuál forma uniones covalentes proteína - proteína y ADN – proteína preservando así la estructura de la cromatina. De esta manera las secuencias de ADN que están próximas espacialmente permanecen ligadas. Posteriormente, se realiza una reacción de digestión con endonucleasas, con lo que quedarán los fragmentos que interactúan unidos por una proteína. Se realiza la ligación de los extremos cohesivos en concentraciones diluidas de ADN para que las ligaciones intramoleculares se vean favorecidas, posterior a esto se revierte el entrecruzamiento dejando libre la molécula de ADN. Finalmente, para identificar las moléculas circulares de ADN obtenidas se utilizan primers de una secuencia de interés denominada *bait* o punto de vista y la secuencia con que se desea conocer si interactúa, denominada captura. Se realiza una reacción cuantitativa o semicuantitativa de PCR para determinar la frecuencia de eventos de ligación [124, 125]. Esta técnica nos permite determinar la interacción entre dos loci conocidos.

Una técnica derivada del 3C denominada 4C (captura conformacional de la cromatina circular) (Figura 11) permite determinar el interactoma de un loci determinado con el resto del genoma. El inicio de la técnica es igual al de 3C sin embargo aquí se debe elegir un *bait* que tenga dentro de su secuencia sitios de corte para dos enzimas de restricción. La primera restricción se realiza generalmente con una enzima que corta en secuencias de 6pb generando moléculas circulares tras la ligación que van de 2 a 10 kb, posteriormente se revierte el entrecruzamiento y se realiza una segunda restricción con una enzima que corte en secuencias de 4pb lo cual tras la ligación generará moléculas de ADN circulares más pequeñas. Posteriormente se realizará PCR inversa a estas moléculas circulares utilizando ambos

primers para el bait que reconozcan la secuencia entre los dos sitios de restricción y que incluirán adaptadores al amplificar. Al amplificar mediante PCR se obtendrán fragmentos con una región del bait y otra con la secuencia de las distintas capturas unidas a esta así como el adaptador para secuenciar por Illumina y determinar las secuencias con las que interactúa el bait de interés [125, 126].

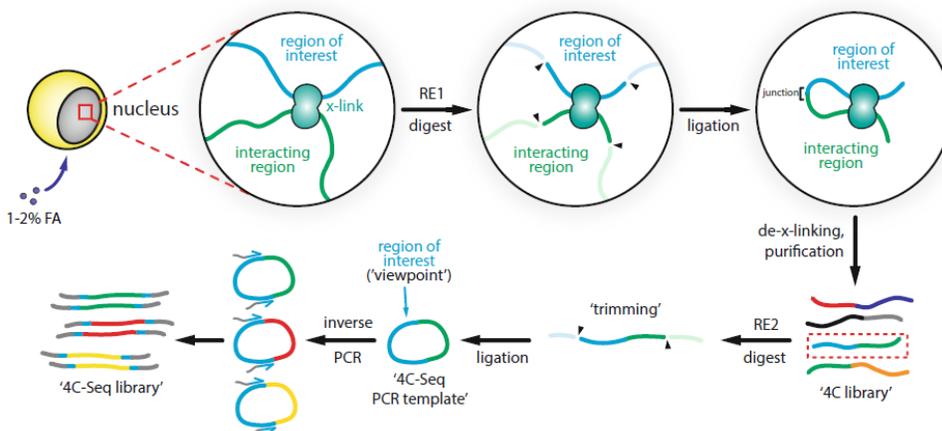


Figura 11 - *Detección del interactoma de un loci por 4C-seq.*

Esquema de los pasos básicos dentro de un protocolo de 4C-seq. El tejido es sometido a entrecruzamiento lo cual mantiene las interacciones proteína - proteína y DNA-proteína. Posteriormente se somete a la cromatina entrecruzada a una primera ronda de digestión y ligación. Esto generará moléculas híbridas con nuestro bait y una captura con la que se encontraba interactuando. Se revierte el entrecruzamiento y se somete a los fragmentos a una segunda ronda de restricción y ligación para generar moléculas que se puedan amplificar eficientemente mediante PCR inversa, los fragmentos generados contendrán los adaptadores para ser secuenciados. ([127]).

### 2.3.6 Arquitectura espacial de los genes circadianos.

Mediante Hi-C a los ZT 10 y 22 en hígado de ratón, se han encontrado loops intra TAD, de modo que, de 6510 interacciones, 527 ocurren únicamente en el ZT10; mientras que 349 ocurren únicamente en el ZT22. Se observa un enriquecimiento en las interacciones intra TAD en el ZT correspondiente a la expresión de ciertos genes circadianos (Figura 12) [128]. Por ejemplo, para los genes circadianos *Npas2* o *Cry1*, algunas interacciones con regiones no codificantes ocurren al ZT correspondiente a la expresión de dicho gen. En particular, para *Cry1* existen interacciones con una región definida como enhancer que oscilan entre dos ZT opuestos, al igual que ocurre con su transcripción. La oscilación en la formación de dicho loop se acompaña de la unión del represor transcripcional REV-ERB $\alpha$  al enhancer durante la fase de menor expresión de *Cry1* [128].

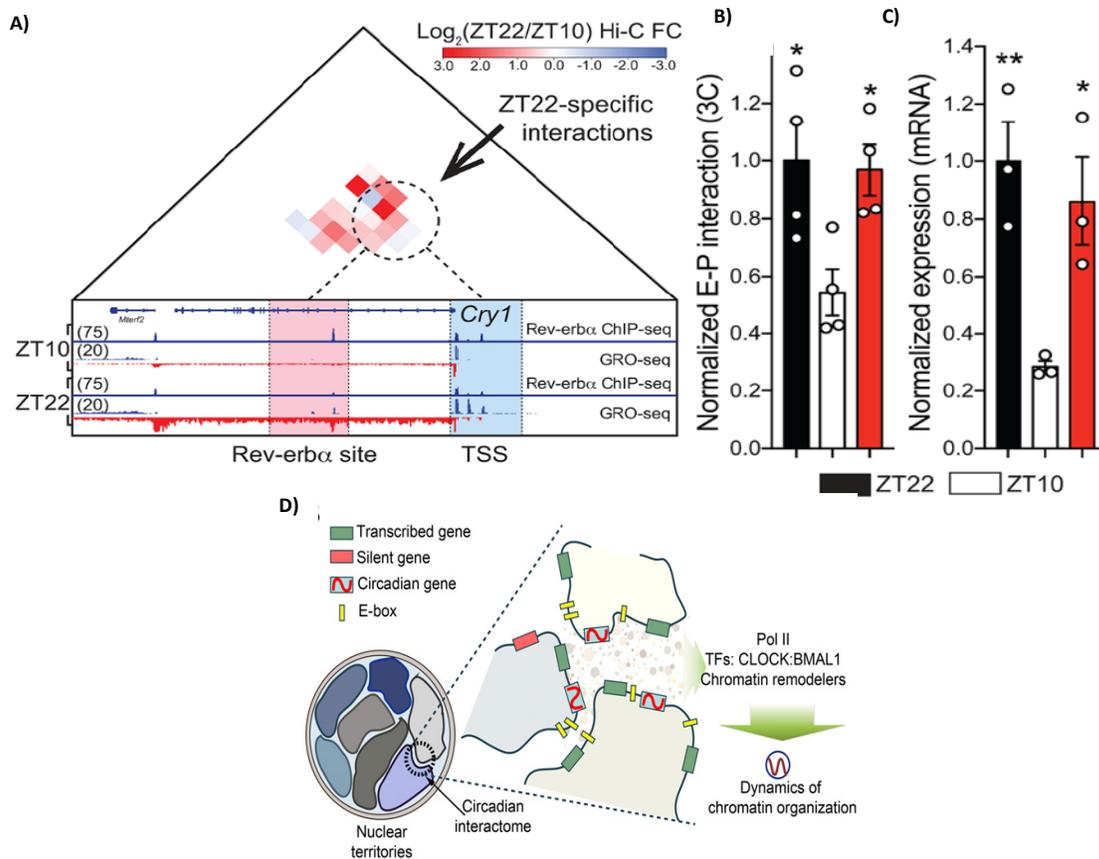


Figura 12 - La transcripción de genes circadianos requiere de contactos dinámicos entre CCG y elementos regulatorios.

En A se observa la región del TAD correspondiente a *Cry1* y su enhancer. Se muestran los tracks de CHIP-seq para Rev-erb alfa y GRO-seq. En B y C se muestra la correlación entre el loop E-P y la transcripción del locus de *Cry1* ([128]). En D se muestra un modelo del interactoma circadiano, genes regulados por la maquinaria del reloj CLOCK/BMAL1 ricos por lo tanto en secuencias E-box colocalizan en estructuras especializadas en la transcripción de estos genes. ([129]).

En genes circadianos específicos de hígado, se observa que muchos de ellos se encuentran cercanos a DHS que también son específicos de este tejido. Un análisis de los motivos de unión a factores de transcripción presentes en estos sitios muestra enriquecimiento para FOXA2, ONECUT y CUX2, los cuáles son factores transcripcionales específicos también de hígado. Esto apoya la idea de la regulación de la transcripción circadiana por factores adicionales a la maquinaria circadiana, lo cual es consistente con la función de CLOCK/BMAL1 como un factor transcripcional pionero remodelando la cromatina para que sea accesible a otros factores transcripcionales [130]. Al estudiar la conformación de algunos genes como *Mreg*, *Pik3ap1* y *Slc44a1* mediante 4C-seq, se observa que tienden a formar

contactos dinámicos con elementos enhancer que tienen unión de los factores transcripcionales mencionados previamente, específicamente durante su fase transcripcional [131].

El gen *Dbp* presenta un interactoma circadiano en fibroblastos embrionarios de ratón que varía de acuerdo a los niveles de expresión del gen. Se demostró también que en fibroblastos embrionarios de ratón *Bmal1<sup>-/-</sup>*, dicho interactoma se ve alterado, perdiéndose ritmicidad para los contactos elegidos por su oscilación acorde a los niveles de transcripción de *Dbp*. Estas evidencias muestran un papel de la maquinaria molecular del reloj circadiano en la formación del interactoma de *Dbp* [2]. Debido a esto, en el presente estudio se busca estudiar el papel de una dieta alta en grasas que desarrolla obesidad en ratones, lo cual se sabe es capaz de alterar el funcionamiento del reloj circadiano y observar su efecto en el interactoma del gen *Dbp* en hígado.

### 3. Planteamiento de problema

El reloj circadiano en mamíferos se encuentra presente en todos los tejidos y órganos, en cada uno de ellos permite la segregación temporal de ciertos procesos a lo largo del día. El hígado es uno de los órganos con mayor cantidad de transcritos que oscilan permitiendo que procesos fundamentales como el metabolismo energético y la detoxificación de xenobióticos se lleven a cabo durante fases específicas del día.

El momento del día en que se ingiere alimento, así como su composición, juegan un papel fundamental en la regulación y expresión de genes circadianos. La alimentación con dieta alta en grasas es uno de los factores capaces de generar disrupciones en el reloj y entre los mecanismos involucrados que se han reportado se encuentra la reorganización transcripcional de genes circadianos, muchos de los transcritos que se ven alterados corresponden a genes circadianos, los cuales pueden estar afectados de distintas maneras: pérdida/ganancia de oscilación en su transcripción o corrimiento de fase. Esto genera la desregulación de procesos metabólicos en los cuáles estos genes se encuentran involucrados y que en condiciones normales se encuentran favorecidos durante una fase específica del día, entre estos se ha observado una pérdida de oscilación en metabolitos relacionados con la detoxificación de xenobióticos, proceso en el que participa el factor transcripcional *Dbp*.

Se sabe por otra parte que un nivel de regulación génica está dado por la organización de los genes al interior del núcleo. Genes controlados por el reloj entre los que se encuentra *Dbp* presentan un interactoma que oscila de manera circadiana, este interactoma les permite colocalizar con elementos regulatorios o genes co-regulados de acuerdo a su fase de transcripción, lo cual tiene un efecto en la tasa y fase transcripcional de los genes.

Con estos antecedentes, en el presente estudio se busca dilucidar el papel de la alimentación con dieta alta en grasas en la regulación transcripcional del gen *Dbp* en hígado. Para ello se plantea contar con ratones de la cepa C57BL/6 a los cuales se someterá a dieta normocalórica o HFD (dieta alta en grasas) durante 12 semanas tras las cuales se obtendrá el hígado para la medición de pre-mRNA y mRNA maduro de *Dbp* mediante qPCR. Posteriormente mediante la comparación del perfil de interacciones (por la técnica 4C-seq) se busca determinar

alteraciones en la arquitectura del gen *Dbp* que podrían contribuir a la disrupción transcripcional y metabólica observada en animales alimentados con dieta alta en grasas.

## 4. Hipótesis

Similar a lo observado en líneas celulares, el gen circadiano *Dbp* tendrá un interactoma circadiano en hígado de ratones sanos, en el cual colocalizará con genes relacionados funcionalmente así como elementos regulatorios circadianos, de acuerdo al ZT. La dieta alta en grasa puede desencadenar una reorganización espacial del interactoma de *Dbp*, lo cual puede contribuir a la reprogramación transcripcional circadiana observada en animales obesos.

## 5. Objetivos

### **General:**

Determinar el interactoma del gen circadiano *Dbp* durante sus fases de mayor y menor actividad transcripcional en ratones alimentados con dieta normocalórica y con dieta alta en grasas.

### **Particulares:**

-Generar un modelo de obesidad inducida por la dieta y determinar la eficiencia del modelo propuesto mediante la medición de parámetros metabólicos.

-Determinación de los niveles de pre mRNA y mRNA de *Dbp*.

- Determinar el interactoma para el gen *Dbp* mediante la técnica 4C-seq a los ZT 6 y ZT18 en hígado de ratones sometidos a dieta normocalórica y dieta rica en grasa.

-Comparar el interactoma de *Dbp* entre hígados de ratones normales y obesos.

## 6. Materiales y Métodos:

### 6.1 Animales y dietas:

Para el estudio, se utilizaron 24 ratones de la cepa C57BL/6 los cuales se dividieron aleatoriamente en dos grupos. Un grupo de 12 ratones se alimentó con dieta normocalórica (Teklad 2018S, 18% de las calorías provenientes de la grasa y el 58% de los carbohidatos). El otro grupo de 12 ratones se alimentó con la dieta para DIO (TD.160547, 31% de las calorías provienen de carbohidatos y 53.5% provienen de la grasa). La composición exacta de las dietas se muestra en el Anexo 1.

Al comienzo del estudio los ratones tenían una edad de 8 semanas y se mantuvieron durante 12 semanas en un ciclo de luz oscuridad 12/12 horas con alimento *ad libitum* correspondiente al grupo al que pertenezcan. Durante este tiempo, se realizó el pesaje semanalmente. Los animales se sacrificaron a ZT6 y ZT18 (n=6 animales por ZT y dieta). Se extrajeron los tejidos hígado, grasa, cerebro, músculo y páncreas, se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -80°C.

### 6.2 Test de tolerancia a la glucosa e insulina

Se realizaron tests de tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina en dos ZT (1 y 13) los cuales se seleccionaron debido a que corresponden con el inicio del periodo de descanso y actividad de los ratones respectivamente. El ZT13 corresponde al tiempo de mayor sensibilidad a la insulina [132, 133].

Para el test de tolerancia a la insulina se retiró el alimento a los animales 4 horas previas al inicio del test. Para el test de tolerancia a glucosa (GTT) se retiró el alimento a los animales 12 horas previas al inicio del test.

Para la prueba de tolerancia a la insulina se realizaron mediciones de la glucosa en sangre periférica (vía caudal) con la ayuda de un glucómetro a distintos tiempos (0, 15, 30, 60 y 120 minutos) posterior a la administración vía intraperitoneal de insulina humana (Humulin) a una dosis de 0.6 U/kg de peso.

Para la prueba de tolerancia a la glucosa se realizaron mediciones de glucosa en sangre periférica a los mismos tiempos que en la prueba anterior, posterior a la administración vía intraperitoneal de glucosa a una dosis de 2 g/kg de peso.

### 6.3 Tinciones hepáticas

Para la tinción con rojo oleoso, 3 a 5 mm cúbicos de hígado fueron tomados evitando su descongelación, y fueron embebidos en Tissue-Tek (Sakura 4583). La temperatura del criostato se fijó entre -20 y -25°C, y el tejido fue cortado para generar cortes de 10 µm a tres diferentes profundidades de la muestra, estos fueron tratados en laminillas gelatinizadas.

Las laminillas fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante dos minutos y se lavaron con agua desionizada. Posteriormente fueron sumergidas en solución de trabajo de rojo oleoso (Solución saturada de rojo oleoso en isopropanol diluida al 70% en agua destilada) durante 5 minutos. Se enjuagaron finalmente por 5 minutos con agua desionizada para eliminar el exceso de rojo oleoso.

### 6.4 Extracción de mRNA

La extracción de RNA se realizó a partir de 40 mg de hígado el cual fue homogenizado con un homogenizador automático (Kimble Kontes mod. Z359971) en 400µl de TRIzol (Invitrogen). A partir de este paso la extracción se llevó a cabo siguiendo el protocolo de extracción de RNA con TRIzol proporcionado por Invitrogen. Se cuantificó el RNA en nanodrop y se almacenó a -80°C.

### 6.5 Síntesis de cDNA

La reacción para la obtención de cDNA se realizó con el kit Super Script II de Thermo Fisher. Se realizó por duplicado ya que en una de ella se utilizaron primers oligo(dT)18 (100 µM, Invitrogen) para la posterior detección de mRNA maduro por qPCR, y en otra se usaron Random Hexamers (50µM, Invitrogen) para la medición de pre mRNA.

La reacción procedió de la siguiente manera

- Oligo(dT)18/Random Hexamers	1 µl/1 µl
-1ug RNA	x µl
-dNTP`s (100µm c/u)	1 µl

-H<sub>2</sub>O grado biología molecular      Hasta 13  $\mu$ l

La reacción se incubó por 5 minutos a 62° C y posteriormente a 4° C por 1 minuto en el termociclador.

Se agregó lo siguiente:

5x First Strand Buffer (Invitrogen)      4 $\mu$ l

0.1mM DTT      2 $\mu$ l

El contenido del tubo se mezcló y se procedió a incubar por 2 minutos a 42° C/25° C para oligo (dT)/Random Hexamers respectivamente. Se añadieron 200U de SuperScript RT (Invitrogen) y se mezcló por pipeteo. Las reacciones con Random Hexamers se incubaron por 10 minutos a 25° C en el termociclador. Las reacciones se incubaron a 42° C durante 50/90 minutos para oligo(dT)/Random Hexamers respectivamente seguidos de 15 minutos a 70° C para la inactivación de la reacción. Los cDNA`s se diluyeron 1:5/1:10 respectivamente para oligo(dT)/Random Hexamers.

## 6.6 qRT-PCR

Las PCRs se realizaron con iTaq universal SYBR Green Supermix (BioRad) en un volumen final de 10  $\mu$ l los cuáles consistieron de lo siguiente:

iTaq Universal SYBR Green Supermix      5 $\mu$ l

cDNA      1.5  $\mu$ l

Primer forward      1  $\mu$ l

Primer reverse      1  $\mu$ l

H<sub>2</sub>O Biología molecular      1.5  $\mu$ l

Los primers usados se muestran en la tabla 1.

Todas las qPCR fueron realizadas en el equipo de PCR en tiempo real BioRad CFX96 con el siguiente programa:

95° C	0:30	} x45
95° C	0:15	
60° C	0:30	
Plate read		
65° C	0:31	} x60
65° C	0:05	
+0.5° C/ciclo Ramp 0.5° C/s		
Plate read		

El análisis de los datos se realizó mediante el método de  $2^{-\Delta CT}$  donde  $\Delta C_T = C_T(\text{cDNA}_1) - C_T(\text{cDNA}_2)$ , en nuestro caso el  $C_T(\text{cDNA}_1)$  corresponde al promedio de  $C_T$  normalizado respecto a la expresión del gen constitutivo (B2M). El cálculo de  $2^{-\Delta CT}$  nos arroja datos normalizados a la expresión de CD ZT6 que pueden ser comparados estadísticamente posteriormente. (Los primers usados se muestran en la Tabla 1 en rojo).

## 6.7 Captura de Conformación de la Cromatina circular: 4C-seq

### 6.7.1 Homogenización y entrecruzamiento

Para los experimentos de 4C-seq (Resumida en la Figura 13) se utilizaron 400 mg de hígado, este fue homogenizado en homogenizador dounce en un volumen de 5 ml de PBS frío hasta obtener una suspensión homogénea. El homogenizado fue filtrado con un colador celular de 70µm hacia un tubo falcon de 50 ml. El volumen se llevó hasta 30 ml con PBS frío. Las células se centrifugaron durante 8 minutos a 1800 RPM y se descartó el sobrenadante. El botón se resuspendió en 25 ml de solución de formaldehído 1%, en PBS a temperatura ambiente, y se incubó por 15 minutos en agitación. El entrecruzamiento fue detenido colocando el tubo en hielo y agregando una concentración final 0.125 M de glicina fría e incubando 5 minutos en agitación a 4° C.

### 6.7.2 Lisis celular y nuclear

La muestra se centrifugó por 8 minutos a 1800 RPM y se descartó el sobrenadante, el pellet fue resuspendido en 25 ml de PBS frío y centrifugado por 8 minutos a 1800 RPM; el pellet se resuspendió en 5 ml de buffer de lisis frío preparado el día del experimento (10mM Tris HCL, 10mM NaCl, 0.2% NP-40) y se incubó en agitación por una hora a 4° C, terminado el tiempo la muestra se centrifugó a 3500 RPM durante 8 minutos y el pellet fue resuspendido

en 2 ml de PBS frío. Se realizó el conteo de los núcleos se realizó en un hemocitómetro tiñendo previamente con azul tripano, se tomó el volumen correspondiente a 10 millones de núcleos y se centrifugó por 8 minutos a 3500 RPM. Los núcleos se resuspendieron en 500  $\mu$ l de buffer (1.1X NEBuffer 2.1). Una alícuota de 10  $\mu$ l se tomó para la verificación del DNA genómico.

### 6.7.3 Digestión y ligación

Para la digestión con la primera enzima de restricción se agregó SDS a una concentración final 0.3% y la muestra se incubó 1 hora a 37° C en agitación. Posteriormente, se añadió Triton X100 a una concentración 1.8% seguido de una incubación por una hora a 37° C en agitación. Finalmente, se añadieron 400 U de HindIII (NEB) y se incubó ON a 37° C en agitación. La enzima se inactivó incubando por 30 minutos a 65° C.

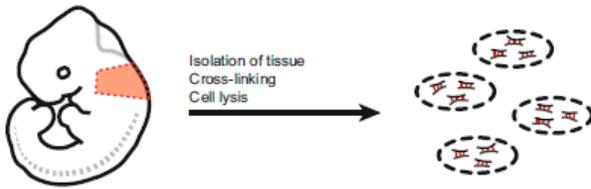
\* Para la verificación de la eficiencia de la restricción 10  $\mu$ l de la cromatina digerida así como los 10  $\mu$ l de cromatina tomados previos a la digestión se tomaron, se les agregaron 90  $\mu$ l de dH<sub>2</sub>O y 2  $\mu$ l de proteinasa K (10 mg/ml) y fueron incubados por una hora a 65° C, se agregaron 2  $\mu$ l de RNasa A y las muestras se incubaron por 30 minutos a 37° C. Se agregó un volumen equivalente a la muestra de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (Sigma) y se realizó la extracción de DNA. 20  $\mu$ l de la fase acuosa de la cromatina digerida se corrieron junto a su genómico en un gel de agarosa 0.8%.

La muestra se transfirió a un tubo falcon de 15  $\mu$ l y se añadieron 700  $\mu$ l de buffer de ligación 10X y se llevó a un volumen final de 7 ml con H<sub>2</sub>O grado biología molecular, se le añadieron 100 U de T4 ligasa (Invitrogen) y se incubó ON a 16° C.

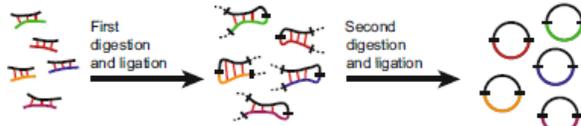
### 6.7.4 Reversión del entrecruzamiento y purificación

20  $\mu$ l de proteinasa K fueron añadidos a la muestra y esta se incubó por 8 horas a 65° C, se añadieron 30  $\mu$ l de RNasa A (10mg/ml) y se incubó por 45 minutos a 37° C. Se realizó la extracción del DNA añadiendo un volumen equivalente de PCI (7ml), vortexeando por 1 minuto y centrifugando por 40 minutos a 3500 RPM. La fase acuosa fue recuperada, se transfirió a un tubo falcon de 50 ml, se añadieron 7ml de H<sub>2</sub>O grado biología molecular, 1.5 ml de acetato de sodio (2M) y se llevó a 50ml con etanol absoluto. El DNA se precipitó incubando ON a -80° C. La muestra se centrifugó a por 45 minutos a 4500 RPM (4° C) y el pellet se lavó con 10 ml de etanol al 70%, el DNA se recuperó centrifugando 10 minutos a 4500 RPM. El pellet se dejó secar y fue resuspendido en 300  $\mu$ l de buffer TE pH8.0 incubando por 20 minutos a 55° C.

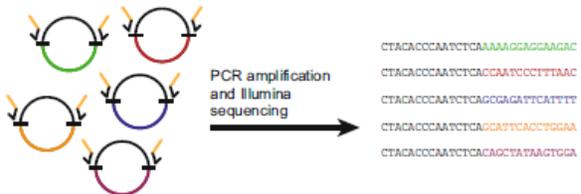
### Preparation of tissue samples:



### Preparation of circularized 3C library:



### Preparation of 4C-seq library:



### Data analysis:

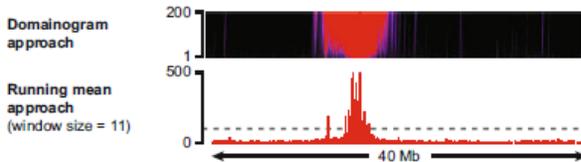


Figura 13 - Obtención y análisis de datos de 4C-seq.

Esquema mostrando de manera resumida los pasos a seguir durante un experimento de 4c, se puede partir de células o tejido, el tejido es entrecruzado con formaldehído, posteriormente se realiza la restricción de la cromatina y una primera ligación en presencia del entrecruzamiento para ligar las secuencias próximas espacialmente. A este material se le realiza una segunda ronda de digestión con una enzima de restricción distinta y ligación, los fragmentos obtenidos son amplificados mediante PCR inversa usando primers para el viewpoint seleccionado. Los fragmentos generados son secuenciados y analizados para determinar interacciones significativas del viewpoint con el resto del genoma. (Tomado de Noordermeer, D. et al. 2016).

### 6.7.5 Segunda restricción y ligación

Se agregaron 55 µl de buffer (1X NEBuffer 3.1) a la muestra y esta se llevó a 500 µl con H<sub>2</sub>O grado biología molecular. Se agregaron 100 U de la enzima CviQI (NEB) y se incubó ON a 37° C en agitación. La enzima se inactivó incubando por 30 minutos a 65° C. Se realizó la extracción de DNA con PCI, la fase acuosa fue recuperada y se le añadieron 850 µl de etanol absoluto, 50 µl de acetato de sodio (2M) y 2 µl de glucógeno (Roche). El DNA fue precipitado incubando ON a -80° C. Se centrifugó 20 minutos a 16,000g, el pellet se lavó con 100 µl de etanol 70% y se centrifugó 10 minutos a 16,000g, se dejó secar y se disolvió en 300 µl de H<sub>2</sub>O grado biología molecular. La muestra se transfirió a un tubo falcon de 15 ml, se añadieron 1.4 ml de buffer de ligación 10X y se llevó a un volumen final de 14 ml con H<sub>2</sub>O grado biología molecular. Se añadieron 150 U de T4 ligasa (Invitrogen) y se incubó ON a 16° C. El DNA ligado se transfirió a un tubo de 50 ml, se le añadieron 1.4 ml de acetato de sodio (2M), 14 µl de glucógeno y se llevó a un volumen final de 50 ml con etanol absoluto, se precipitó ON a -80° C. El tubo se centrifugó 45 minutos a 4500 RPM, el pellet se lavó con



Debido a la linealidad en la amplificación hasta 200 ng se decidió trabajar con esta concentración.

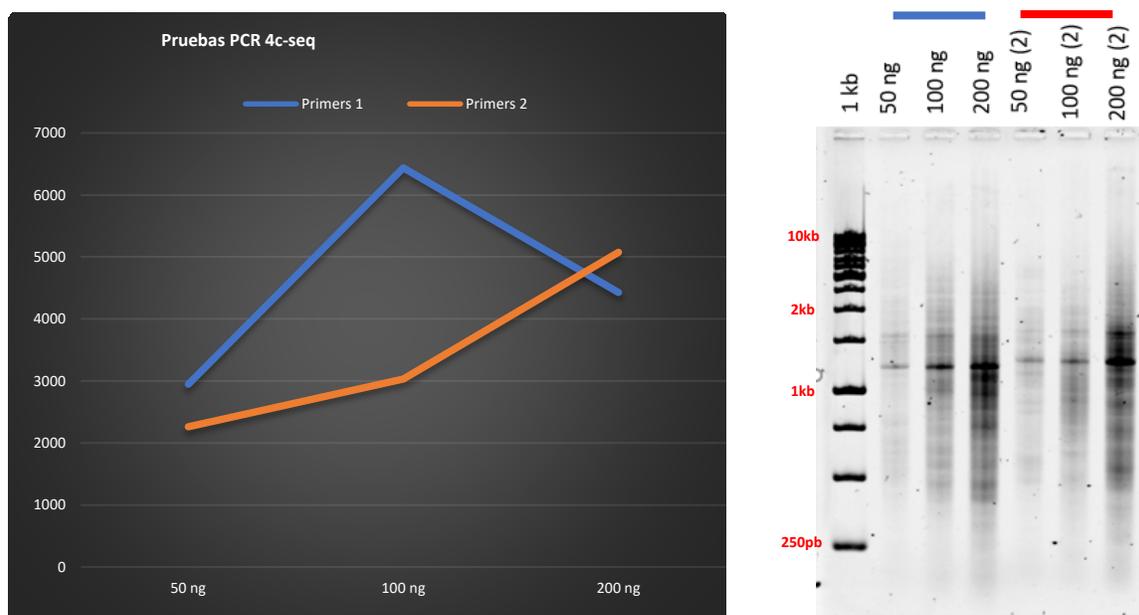
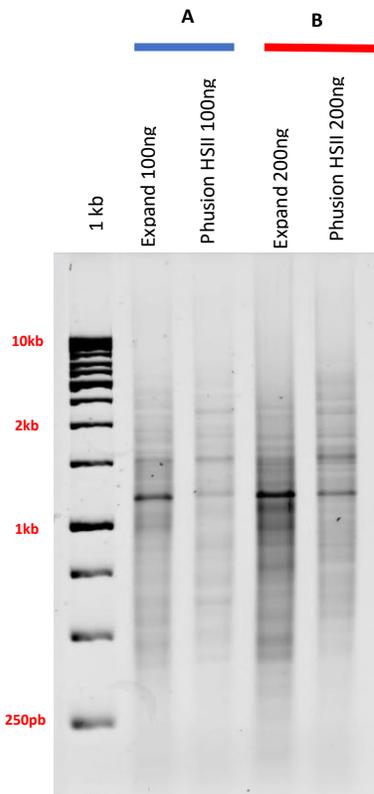


Figura 15 - Amplificación de la librería de 4c-seq.

Linearidad en los niveles de amplificación del material 4C a concentraciones crecientes. En A se muestra la amplificación con primers probados en un estudio previo y el set de primers diseñados para este experimento (B).

Las PCR se llevaron a cabo con la polimerasa Expand HF (Roche), o con la Phusion HSII (Thermo Fisher) usando los primers cortos diseñados y como control primers previamente probados en *Dbp* para verificar el patrón de amplificación de la librería (Figura 16). En [134] se demostró que con ambas se obtenían datos con buena cobertura y calidad así como alta correlación de los datos generados. Por tanto, con la polimerasa Phusion HSII se puede observar que los patrones observados son muy similares a los generados con la enzima Expand HF, por lo que esta se usó para la generación de las librerías (Figura 16).



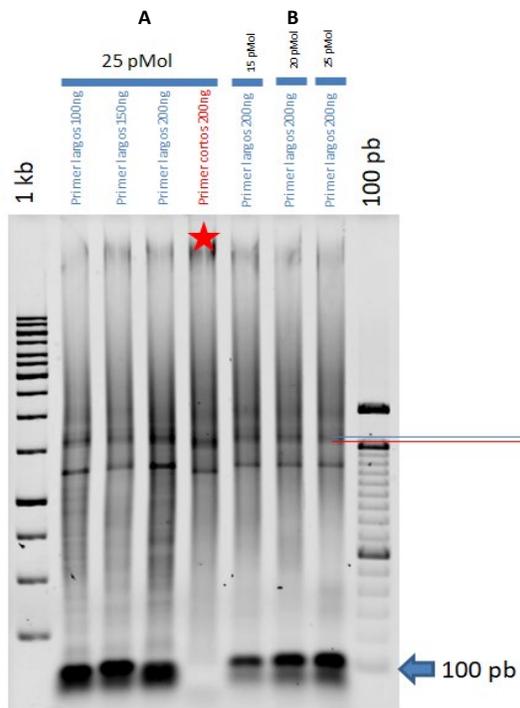
**Figura 16 - Amplificación de la librería de 4c-seq con Phusion HSII.**

Se muestran los patrones de amplificación generados con la enzima Phusion HSII al lado de los generados por la Expand HS con 100 (A) y 200 ng (B) de DNA 4C.

Posteriormente se realizó una prueba con los primers (Tabla 1, verde) que contenían un 5'overhang con el primer de secuenciación. Los productos de PCR deben presentar un corrimiento hacia pesos moleculares mayores debido a la secuencia introducida correspondiente a los primers de secuenciación.

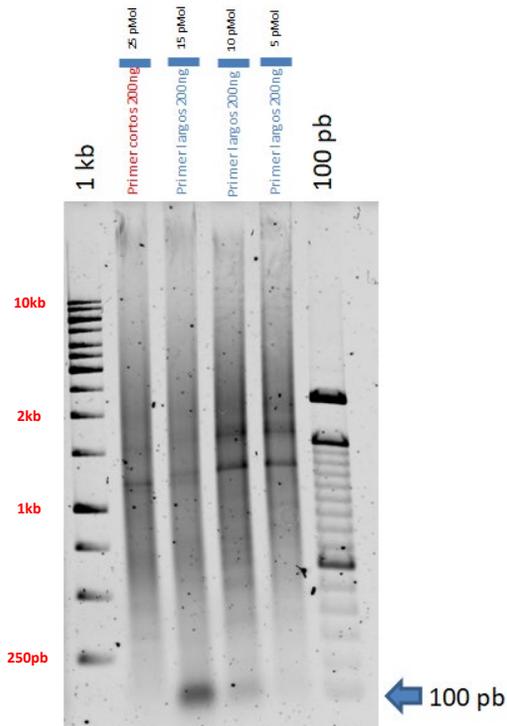
Tras la amplificación (Figura 17) se obtuvieron resultados similares a lo obtenido con los primers cortos (200ng). Se observó sin embargo que se generan dímeros con un peso de aproximado 100 pb.

Tras la disminución de la concentración de primers (10 y 15 pmoles) se observó disminución en la formación de dímeros (Figura 18) se probaron sin embargo menores concentraciones (15, 10 y 5 pmoles). A 10 pmoles se observa un patrón de amplificación similar a la concentración de 25 pmoles con disminución en la formación de dímeros. En la concentración de 5 pmoles se puede observar que los dímeros no son observables, sin embargo la composición de fragmentos se ve afectada en la fracción de menor peso molecular respecto a las demás concentraciones (Figura 18).



**Figura 10- Amplificación del DNA 4C usando los primers con adaptadores.**

En A se muestra la amplificación del material con 100, 150 y 200 ng de DNA, en el carril con la estrella se observa el patrón generado con los primers cortos. En B se muestra la muestra amplificada usando 200 ng de material con concentraciones variables de primers (15,20 y 25 pmoles). Gel de agarosa 0.8%.



**Figura 11 - Efecto de la disminución en la concentración de primers en la amplificación del material 4C.**

Se muestran los patrones de amplificación para las muestras con los primers largos usando 15, 10 y 5 pmoles de primers. Se muestra también el patrón generado con los primers cortos (200 ng/25pmoles primers). Gel de agarosa 0.8%.

Tras estas pruebas de estandarización, las condiciones elegidas para la amplificación del material para secuenciación fueron con 200 ng de DNA 4C y 10 pmoles de primers largos.

Para la generación de la librería de secuenciación se realizaron dos rondas de PCR. En la primera, se amplificó lo correspondiente a 1.6 µg de material 4C, en 8 reacciones usando 200ng por reacción. En esta se utilizaron primers compuestos por un segmento complementario al bait y overhangs con la secuencia correspondiente a los primers de secuenciación que funcionan como adaptadores para la segunda PCR. El primer con el overhang complementario al primer forward de secuenciación se encuentra sobre el sitio de HindIII, mientras que el que tiene el overhang complementario al primer reverse se encuentra en cercanía de Csp6I (Figura 14). En una segunda PCR, se utilizó el Kit de indexado Nextera XT (Illumina). En esta PCR, los primers son complementarios a los adaptadores introducidos en la primera PCR, y tienen overhangs con los códigos de barras y adaptadores de secuenciación (Figura 19).

## 6.8 Secuenciación

Las librerías fueron purificadas con perlas magnéticas AMPure XP (Beckman Coulter), para eliminar los fragmentos de menor tamaño <200 pb. La composición de las librerías fue analizada en Bioanalyzer Tapestation (Agilent). La selección de tamaño de la librería se realizó corriendo las muestras en geles de agarosa al 2% por 30 minutos. El marcador de peso molecular de 1kb fue marcado con SYBR safe, y se colocó a 3 carriles de distancia de la muestra. El carril de la muestra se cortó en la fracción correspondiente a 2 – 0.2 kb. El DNA fue purificado con el kit de purificación de gel de Qiagen. Las librerías fueron analizadas una vez más en Bioanalyzer Tapestation para verificar su composición.

Las muestras fueron secuenciadas a una profundidad de 1 millón de lecturas por muestra por un solo extremo y se usó genoma de PhiX a una concentración de 5% para el correcto balance de bases debido a la baja complejidad de la librería. Se secuenció una sola hebra a 150 pb en el secuenciador MiSeq de Illumina.

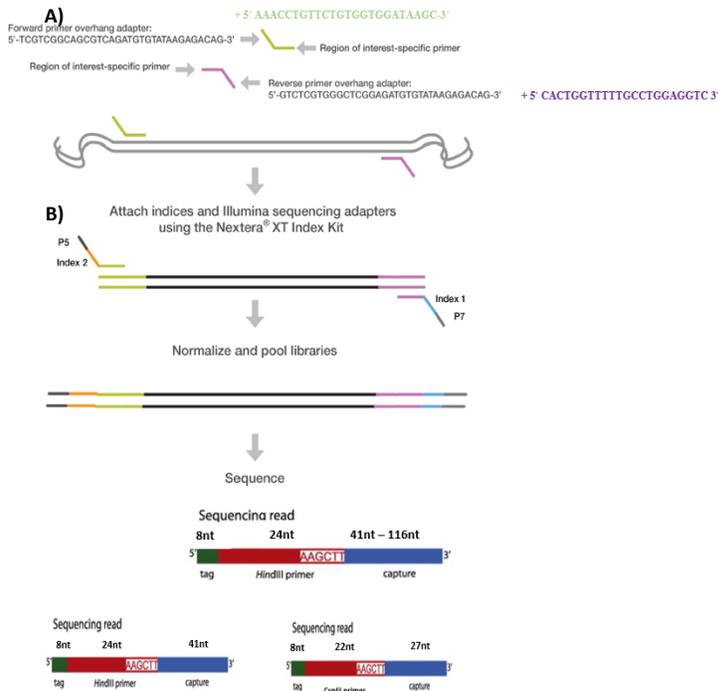


Figura 19 - Preparación de librerías para secuenciación.

Estrategia usada para la generación de la librería 4C-seq. En A se muestran los primers usados en la primera ronda de secuenciación, en verde el primer específico de bait (HindIII) y en morado (Csp6I), se muestra además la secuencia del overhang. En B se muestra el reconocimiento de la secuencia introducida en la primera PCR por los primers de indexado Nextera XT que tienen además los códigos de barra y adaptadores de secuenciación (P5 y P7). En C se muestra la composición de las secuencias resultantes, en verde el código de barra, en rojo el primer específico de bait y en azul la captura en el caso de secuenciar single end (longitud 150 nt) o paired end (75 nt por extremo).

Una segunda ronda de secuenciación fue realizada en el secuenciador HiSeq2500. Cada muestra se secuenció con una profundidad de 3 millones de reads, con una longitud de secuencia de 120bp, paired end, y se agregó genoma de PhiX a una concentración final de 1%.

### 6.9 Análisis de las secuencias

Las secuencias se obtuvieron separadas por código de barras, la calidad de las secuencias fue analizada en FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), se recortaron los primeros 20 nt de cada secuencia correspondientes al primer específico del viewpoint y las secuencias se recortaron además hasta el nt 60 para dejar secuencias de 40 nt. Se descartaron las secuencias con N y baja calidad de secuenciación.

Las reads correspondientes a la primera y segunda secuenciación se juntaron de acuerdo al experimento al que pertenecían en R, usando el paquete ShortRead[135].

Las secuencias fueron alineadas contra los genomas de ratón mm9 y mm10 en BWA[136]. Los porcentajes de reads mapeadas al cromosoma de viewpoint fueron obtenidas en R con el paquete GenomicAlignments. Se removieron las secuencias correspondientes a fragmentos ligados consigo mismos y sin digerir (fragmento del viewpoint y un fragmento adyacente upstream y downstream) usando la función *intersect intervals* de BEDtools [137].

El primer análisis de los datos fue realizado con el paquete R3Cseq [138] el cual nos permite realizar el análisis de cada una de las muestras o analizarlas de manera conjunta (replicados y comparación entre condiciones). El análisis se realizó para comparar entre las condiciones CD6vsCD18, CD6vsHF6, CD18vsHF18 y HF6vsHF6 (CD - Dieta normocalórica y HF – Dieta alta en grasas). Se introdujeron los archivos BAM de cada una de las condiciones con su respectivo duplicado.

El conteo de reads se realizó tanto por fragmento como por ventana genómica (3 kb y 5kb). Para el llamado de interacciones se utilizó un FDR de 0.05, así como el modo intersección para detectar como válidas únicamente aquellas presentes en ambos replicados. El paquete permite la visualización de las interacciones en trans así como en el cromosoma VP y en una región *Cis* cercana que se seleccionó de 0.5 y 1 mb upstream y downstream del VP.

Posteriormente se analizaron los datos con FourCseq, este permite la comparación de interacciones entre grupos con por lo menos un replicado. Crea una librería virtual generando una digestión con HindIII y tomando como válidos los fragmentos que tienen por lo menos un sitio de Csp6I.

El análisis con FourCseq es únicamente en *Cis*, para los análisis la región elegida fue a 1 mb upstream y downstream del VP. El *pipeline* trabaja con los datos normalizados por una transformación estabilizadora de la varianza, y a partir de estos se calculan los Z-score. Para el llamado de interacciones, se eligieron como válidas aquellas con un Z-score de 3 y FDR menor a 0.05.

Para las diferencias entre las condiciones se obtiene el *fold change* para cada uno de los fragmentos válidos y se realiza la prueba de Wald para determinar la significancia estadística

de las diferencias entre las condiciones. Se seleccionaron solo las diferencias con un valor de p ajustado menor a 0.05.

#### 6.10 Visualización de resultados

Tracks en formato bigWig fueron creados en FourCseq con los datos normalizados a RPM y se realizó además smoothing de los datos normalizados tomando un ancho de banda de 5 fragmentos. Estos fueron visualizados en el visualizador IGV [139] en una ventana de 2 Mb con el VP en el centro, fueron visualizados junto con datos circadianos de ChIP-seq para los ZT 8 y 20 por ser los datos disponibles más cercanos a los ZT utilizados en nuestro estudio [53], fueron visualizados BMAL1, H3K4me1, H3K4me3 y H3K27ac además de picos de CTCF [96] y ChIP-seq de REV-ERB $\alpha$ . Se visualizaron también datos de DNase-seq de los ZT 6 y 18 [75].

Para ver la transcripción naciente en las regiones de interés se utilizaron datos de Gro-seq [76, 140].

#### 6.11 Primers

En la tabla 1 se muestran los primers usados en el proyecto, en color rojo los correspondientes a los experimentos de qPCR para cuantificación de mRNA total, en verde los primers usados para la generación de librería de 4C-seq y en amarillo los utilizados para cuantificación de premRNA por qPCR.

Primer	# bases	Secuencia
mDbp RNA Fw	25	AATGACCTTTGAACCTGATCCCGCT
mDbp RNA Rv	25	GCTCCAGTACTTCTCATCCTTCTGT
mB2m Fw	22	GGTCTTTCTGGTGCTTGCTCA
mB2m Rv	19	GTTTCGGCTTCCCATTCTCC
mTbp Fw	22	CAAACCCAGAATTGTTCTCCTT
mTbp Rv	21	ATGTGGTCTTCTGAATCCCT
Dbp 4C HindIII 1	24	AAACCTGTTCTGTGGTGGATAAGC
Dbp 4C Csp6I 1	22	CACTGGTTTTTGCCTGGAGGTC
Dbp 4C HindIII 2	25	TCACAGGGTTTATGCCTGACAGGAT
Dbp 4C Csp6I 2	24	AGCACTGGTTTTTGCCTGGCGGTC
Dbp 4Cseq HindIII	57	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGAC AGAAACCTGTTCTGTGGTGGATAAGC
Dbp 4Cseq CviQI	56	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGAC

		AGCACTGGTTTTTGCCTGGAGGTC
mmDbp I1 preRNA Fw	18	GTCCACGGCACCTATCAG
mmDbp I1 preRNA Rv	18	CTCCAGGCGTCAGATTTG
mmDbp I3 preRNA Fw	18	AAGGGCTCAGGTTCCAAG
mmDbp I3 preRNA Rv	21	GCAGAGGCAGTTCTACAGATG

**Tabla 1 – Primers usados durante el estudio.** En rojo se muestran los primers usados para la medición de mRNA por qPCR, en verde los usados para la generación de la librería 4C-seq y en amarillo los utilizados para la medición de pre mRNA por qPCR.

## 7. Resultados

### 7.1 La alimentación con dieta rica en grasas genera obesidad y alteraciones metabólicas

Con el fin de obtener un modelo de obesidad para los estudios planteados, se ocuparon con 24 ratones de la cepa C57BL/6. De acuerdo a la dieta se formaron dos grupos cada uno con 12 ratones (dieta normocalórica/dieta alta en grasas).

El pesaje semanal de los animales muestra que a partir de la semana 3 existe una ganancia de peso significativa en el grupo HFD respecto a los animales control. Los animales HFD tienen en promedio un 21.8% (Figura 20A) más de peso a las 12 semanas que los animales del grupo control lo cual es consistente con lo reportado previamente sobre que un aumento del 20 al 30% en peso corporal de los animales [141] corresponde a obesidad en el modelo de ratón (C57BL/6).

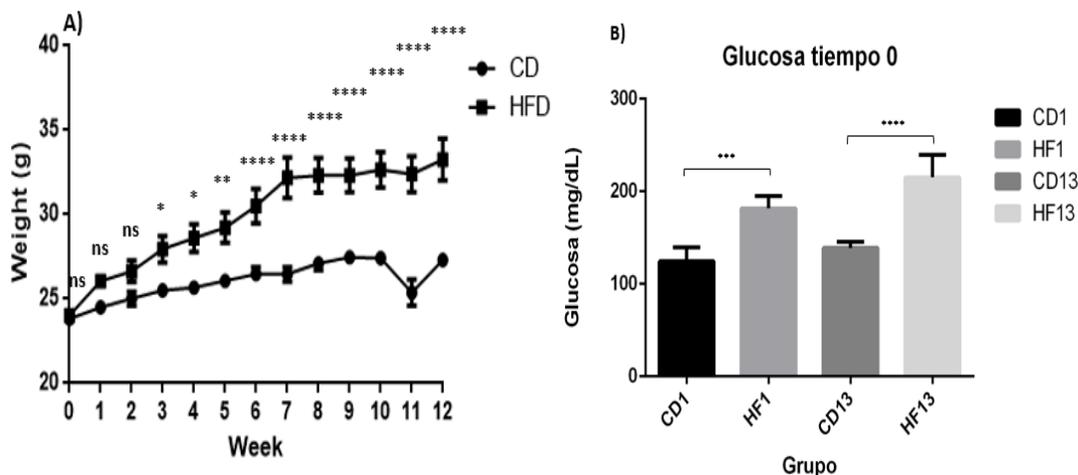


Figura 20 - Ganancia de peso y desbalance en glucosa basal en animales HFD.

En A se observa la gráfica de pesos de los animales a lo largo de un periodo de 12 semanas. Se observa que la diferencia en los pesos es significativa a partir de la tercera semana. En B se observan los niveles de glucosa al tiempo cero del GTT (Test de tolerancia a la glucosa), se observa que antes del inicio de la prueba los animales tienen ya niveles significativamente más altos de glucosa en sangre (Prueba de anova, ns – no significativo, \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$  \*\*\*-  $p < 0.001$  y \*\*\*\*-  $p < 0.0001$ , CD – Dieta normocalórica y HF, Dieta alta en grasas).

Con el fin de determinar el estado metabólico en el que se encontraban los animales, se analizaron los niveles de glucosa basal en sangre (Figura 20B). Se observó que existe una diferencia significativa en sus niveles, de modo que el grupo HFD tiene niveles más elevados de glucosa en sangre tanto en el ZT1 como en el ZT13.

Con el fin de determinar el estado metabólico de los ratones, se les realizaron tests de tolerancia a la glucosa (GTT) e insulina (ITT). Los ratones presentaron los cambios esperados en los parámetros metabólicos analizados y a lo reportado previamente para dietas ricas en grasa. En el test de tolerancia a la insulina, a ZT1 (Figura 21A) se observó que en el grupo control la insulina genera la respuesta fisiológica típica, es decir, un decremento en los niveles de glucosa en sangre. Esto no ocurre en el grupo HFD, que mantiene sus niveles de glucosa constantes a todos los tiempos medidos. Esta falta de respuesta a la insulina se define como resistencia a la insulina [142]. En el ZT 13 (Figura 21B) la inyección de insulina genera una respuesta de acuerdo a lo esperado, disminuyendo los niveles de glucosa esta vez en ambos grupos. Sin embargo, los niveles permanecen por arriba de los del grupo control durante todos los tiempos medidos a excepción de los 120 minutos. En cualquier caso, el área bajo la curva indica que los niveles de glucosa en el grupo HFD son significativamente más elevados en ambos ZT (Figura 21, histogramas).

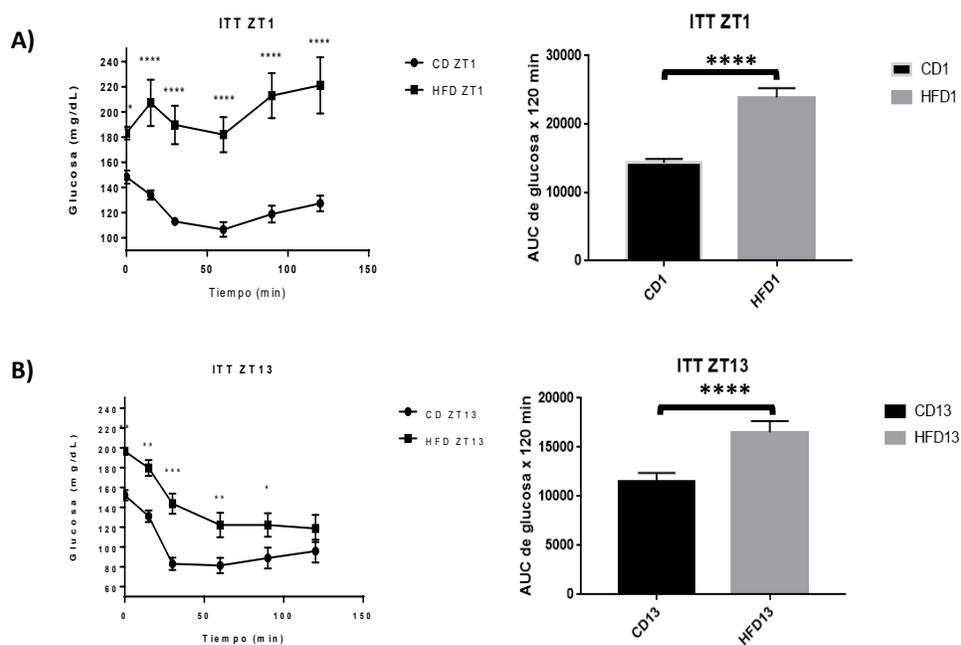


Figura 21 - Test de tolerancia a la insulina.

En A) se muestran las curvas correspondientes a las mediciones de glucosa al ZT 1 en los tiempos elegidos (0, 15, 30, 60 y 120 minutos). En el eje Y se muestran las concentraciones séricas de glucosa (mg/dL) y en el eje X el tiempo transcurrido (el tiempo 0 es la medición justo antes a la administración IP de insulina 0.6 U/kg). Del lado derecho se muestra el área bajo la curva de ambos grupos (CD y HFD) (Prueba de T, \*-p<0.05, \*\*-p<0.01, \*\*\*-p<0.001 y \*\*\*\*- p<0.0001, ITT – test de tolerancia a la insulina). En B) se observan las curvas para el ZT 13 y su respectiva área bajo la curva (AUC).

Durante la prueba de tolerancia a la glucosa, se observó que al ZT 1 (Figura 22A) los niveles de glucosa del grupo HFD son más elevados a todos los tiempos medidos que para el grupo control, y al final del experimento estos aún no regresan a los niveles basales, indicando una incapacidad del animal para regular sus niveles de glucosa en sangre adecuadamente lo cual sí ocurre en el grupo control. Para el ZT 13 (Figura 22B) la respuesta del grupo HFD es más eficiente que en ZT1, con una disminución progresiva de los niveles de glucosa al tiempo de 30 minutos. Sin embargo, los niveles de glucosa en el grupo alimentado con dieta rica en grasas son significativamente superiores a lo largo de todo el estudio. Tanto para el test de tolerancia a la insulina como para el de tolerancia a glucosa, las diferencias entre ZT se deben a que en el ZT 13 el animal tiene su pico de sensibilidad a la insulina lo que corresponde con el inicio de su periodo de actividad [133]. Debido a esto se observa que el descenso en los niveles de glucosa es más pronunciado en los dos tests y ocurre en los animales control y HFD (Figuras 21B y 22B).

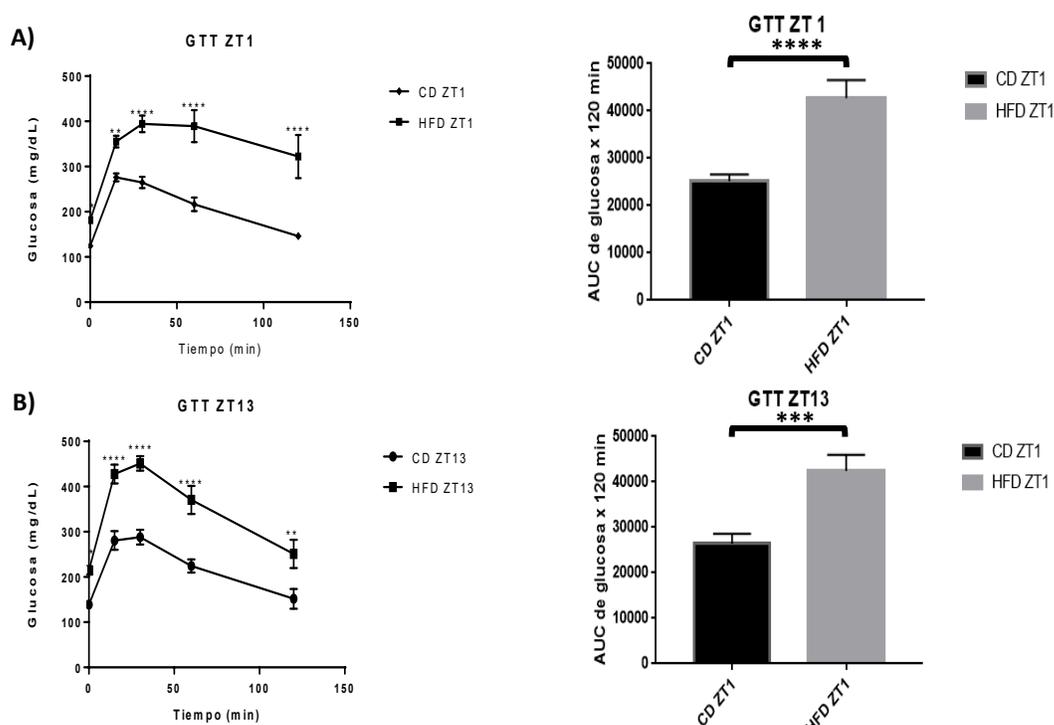
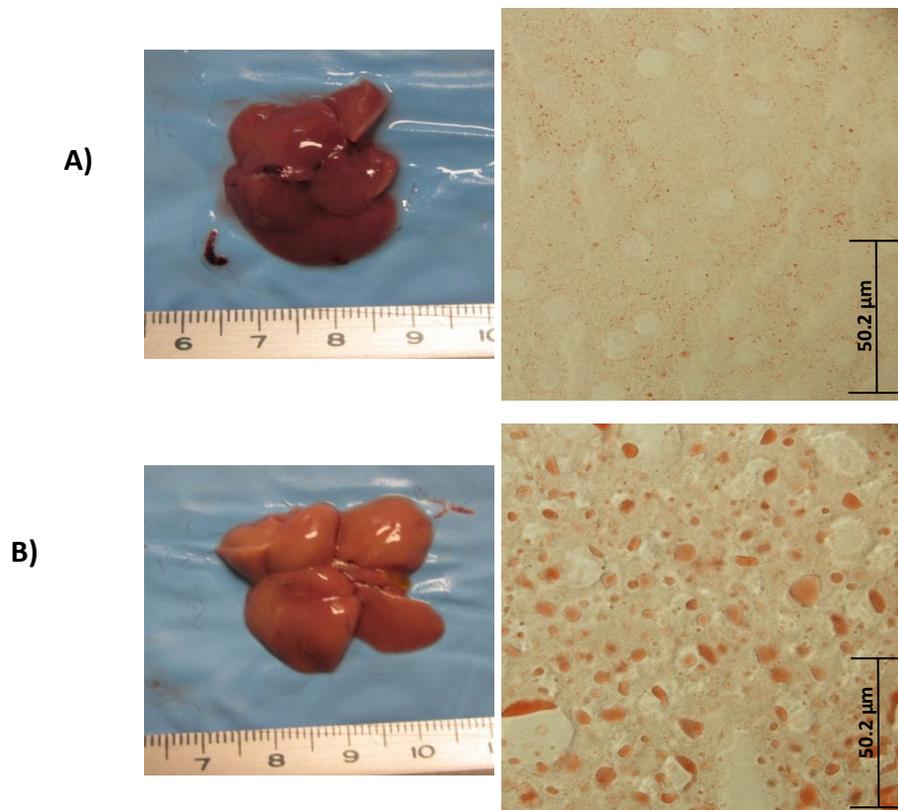


Figura 1222 - Test de tolerancia a la glucosa.

En A) se muestran las curvas correspondientes a las mediciones de glucosa al ZT 1 en los tiempos elegidos (0, 15, 30, 60 y 120 minutos). En el eje Y se muestran las concentraciones séricas de glucosa (mg/dL) y en el eje X el tiempo transcurrido (el tiempo 0 es la medición justo antes a la administración IP de glucosa 2g/kg). Del lado derecho se muestra el área bajo la curva de ambos grupos (CD y HFD) (Prueba de T, \*-p<0.05, \*\*-p<0.01, \*\*\*-p<0.001 y \*\*\*\*- p<0.0001). En B) se observan las curvas para el ZT 13 y su respectiva área bajo la curva (AUC).

En cuanto a la tinción de rojo oleoso se observó que el grupo HFD presenta mayor acumulación de lípidos respecto al grupo control, las vesículas lipídicas son de mayor tamaño y abarcan una mayor superficie, esto correlaciona con la apariencia macroscópica del hígado, en el grupo HFD este se observa amarillento a diferencia del control que tiene una coloración rojiza (Figura 23).

En conjunto, estos datos sugieren que nuestro modelo de obesidad inducida por la dieta está generando ratones no sólo con mayor peso corporal, sino con una fisiopatología propia de la obesidad y la diabetes tipo II.



*Figura 23 - Acumulación de lípidos en hígados HFD.*

Se muestra en A la apariencia macroscópica y microscópica (Rojo Oleoso) de un hígado CD. En B de un hígado HFD.

## 7.2 Cuantificación de la expresión de *Dbp*

Para determinar el estado transcripcional de *Dbp* en nuestros distintos grupos, se realizó la cuantificación de mRNA en hígado (Figura 24). Se observó que los niveles de *Dbp* son mayores en el ZT 6 para los animales HFD. En ambos grupos los resultados son acordes a lo esperado: se obtuvieron niveles de transcrito de *Dbp* significativamente más elevados a ZT6 que a ZT18 (Figura 21) [143]. Además, se observó que el mRNA de *Dbp* está significativamente más elevado al ZT6 en el grupo HFD respecto al grupo control. Esto es coherente a lo reportado previamente, donde se reporta un corrimiento de la fase de transcripción de *Dbp* cuando los animales son sometidos a una alimentación con dieta alta en grasas [87, 144] [145].

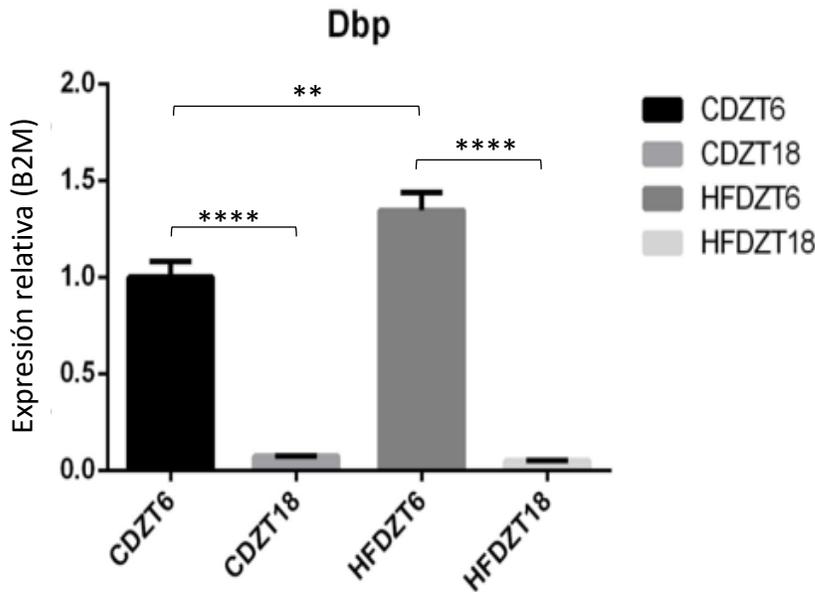


Figura 24 - Expresión de *Dbp*.

Niveles de expresión de *Dbp* en la condición control (CD) y con dieta alta en grasas (HFD), (Prueba de anova, \*\*- $p < 0.01$  y \*\*\*\*-  $p < 0.0001$ , las barras muestran el error estándar. La expresión fue normalizada por el método  $2^{-\Delta CT}$ , el gen constitutivo usado fue B2M, la expresión está normalizada respecto al grupo CDZT6.

Adicionalmente, se realizó la cuantificación de pre-mRNA (Figura 25) con RTqPCR utilizando primers diseñados en regiones intrónicas (Figura 22). Esta aproximación nos podría dar más información sobre el estado transcripcional de *Dbp* en los ZT's analizados y

descartar mecanismos post-transcripcionales [146] que impacten directamente en los niveles de acumulación de mRNA medidos previamente.

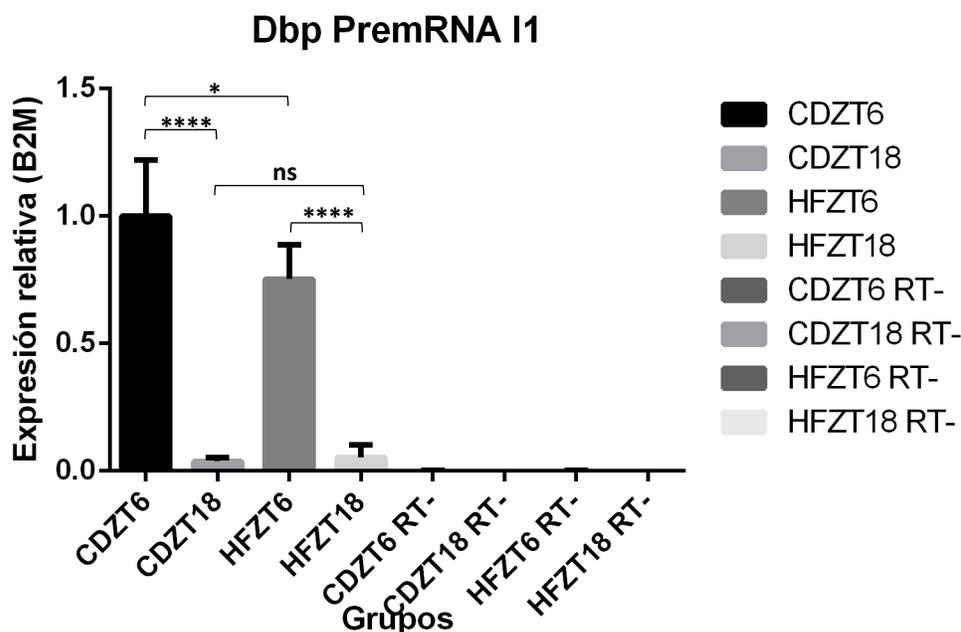


Figura 13 - Cuantificación de premRNA para Dbp.

Se muestran el pre mRNA para *Dbp*, se utilizaron primers diseñados en el intrón 1. (Prueba de anova, \*\*- $p < 0.01$ , \*\*\*\*- $p < 0.0001$ , ns – no significativo. Las barras muestran el error estándar.) La expresión fue normalizada por el método  $2^{-\Delta CT}$ , el gen constitutivo usado fue B2M, la expresión está normalizada respecto al grupo CDZT6.

En ambos grupos (CD y HF) se encontró una tendencia similar a la observada en acumulación de mRNA (Figura 24) donde los niveles son muy elevados durante el ZT6 respecto al ZT 18; Interesantemente, en el grupo HF los niveles son significativamente menores al grupo CD durante el ZT6 (Figura 25), este resultado es opuesto a lo observado en los niveles totales de mRNA (Figura 24) donde el grupo HF presenta niveles más elevados que el grupo control. Los niveles al ZT18 no presentan diferencias significativas entre los grupos.

### 7.3 El gen *Dbp* es objeto de transiciones cromatínicas altamente dinámicas entre el día y la noche en ratones sanos.

Se realizó una revisión de la región de *Dbp* a estudiar con bases de datos disponibles de hígado de ratones C57BL/6 WT para la unión de proteínas y marcas de histona en los ZT 8 (día) y 20 (noche) que corresponden a los ZT más cercanos a los tiempos de mayor/menor actividad transcripcional para el gen *Dbp* en los datos disponibles (cada 4 horas), y que

tienen una diferencia de 2 horas con los ZT elegidos para la realización de nuestro estudio (ZTs 6 y 18) [53]. Primeramente, se procedió a analizar la dinámica de unión de CLOCK y BMAL1 al promotor y ORF de *Dbp* (Figura 26). Se observó mayor señal de ambas proteínas durante el ZT 8, que corresponde con la fase

de transcripción activa de *Dbp*. Durante la fase opuesta, se observó muy poca señal para las dos proteínas. Se identificaron tres sitios de unión en la región analizada, que corresponden a la región promotora y a los intrones 1 y 2. Estos sitios contienen motivos E-box.

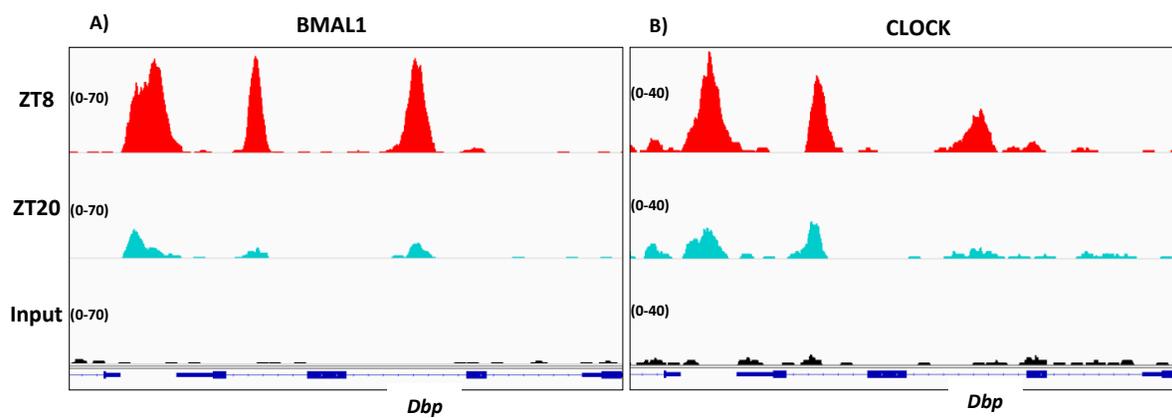


Figura 26 - ChIP-seq en el locus de *Dbp* para las proteínas *BMAL1*(A) y *CLOCK* (B).

Los datos fueron visualizados en IGV. En rojo se muestra la señal correspondiente al ZT 8, y en azul al ZT20. En el tercer track se muestra la señal correspondiente al Input. En la parte inferior se muestra la anotación génica que abarca el gen *Dbp* y parte de *Car11*. Datasets tomados de GSE39977.

Los represores transcripcionales circadianos *PER1* y *CRY1* se reclutan a las regiones regulatorias de *Dbp* en la fase opuesta a CLOCK/BMAL1, y en fase con los niveles más bajos de transcripción del gen (Figura 27). La unión de estas proteínas se da en los sitios de unión previamente identificados para CLOCK/BMAL1 en la región promotora e intrón 2 de *Dbp*. A diferencia de CLOCK/BMAL1 donde la señal es similar en sus tres sitios de unión, el reclutamiento de *PER1*/*CRY1* se observó predominantemente en la región promotora.

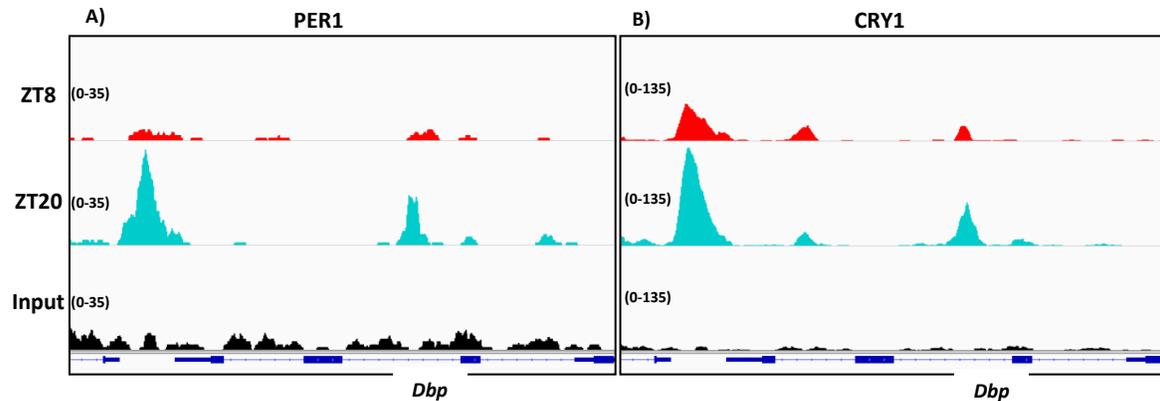


Figura 14 - Datos de ChIP-seq en el locus de *Dbp* para las proteínas *PER2*(A) y *CRY1* (B).

Los datasets fueron visualizados en IGV, en rojo se muestra la señal correspondiente al ZT 8 y en azul al ZT20. En la parte inferior se muestra la anotación génica que abarca el gen *Dbp* y parte de *Car11*. En el tercer track se muestra la señal correspondiente al Input. Datasets tomados de GSE39977.

Se sabe que el complejo CLOCK/BMAL1 recluta a la HAT P300 lo cual permite una acetilación rítmica de la cromatina en el gen *Dbp* que es mayor durante su fase transcripcional [53, 80]. Con el fin de determinar si la acetiltransferasa P300, involucrada en la regulación circadiana de CCG [147], se une en nuestra región de interés, se realizó un análisis de datos de ChIP-seq generados de manera circadiana para esta enzima [53]. En este análisis, se determinó que P300 se recluta de manera circadiana específicamente en el promotor del gen *Dbp*. (Figura 28A)

Adicionalmente, para ganar pistas sobre el reclutamiento de la maquinaria transcripcional a las regiones de interés en *Dbp*, se analizaron los datos publicados de ChIP-seq para la serina 5 fosforilada de la RNA polimerasa II (PolII Ser5P) (Figura 28B). Esta marca postraduccional en la Ser5 del extremo N-terminal de PolII es indicativa de iniciación transcripcional, y está enriquecida en genes transcripcionalmente activos [148]. De acuerdo a lo esperado, se observó un enriquecimiento en esta modificación de PolII sobre el TSS de *Dbp*, específicamente en el ZT8, coincidiendo con su periodo transcripcional (Figura 28B). A ZT20, la señal disminuye drásticamente, y corresponde con los niveles más bajos de transcripción para *Dbp*.

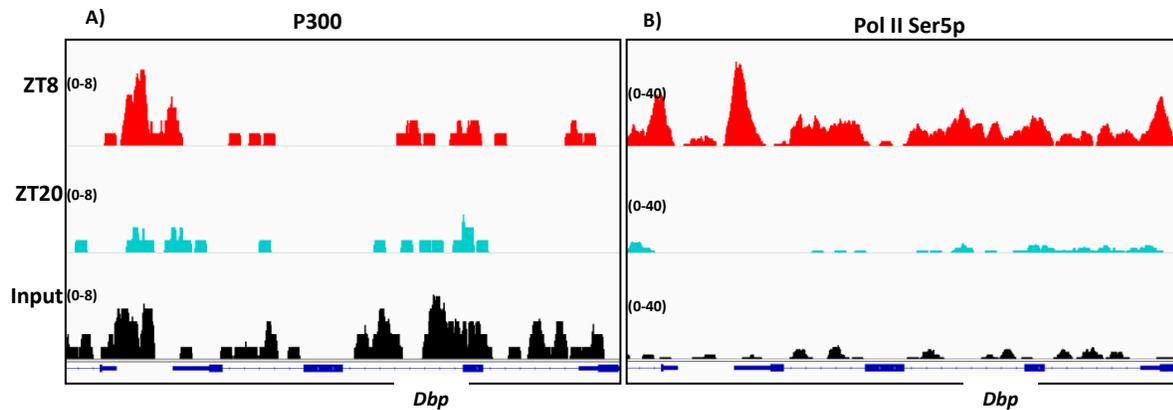


Figura 15 - Datos de ChIP-seq en el locus de *Dbp* para la HAT P300 (A) y Pol II con la serina 5 fosforilada (B).

Los datasets fueron visualizados en IGV, en rojo se muestra la señal correspondiente al ZT 8 y en azul al ZT20. En la parte inferior se muestra la anotación génica que abarca el gen *Dbp* y parte de *Car11*. En el tercer track se muestra la señal correspondiente al Input. Datasets tomados de GSE39977.

Con el objetivo de determinar el panorama regulatorio en el locus de *Dbp*, se procedió a analizar experimentos previos de ChIP-seq de H3K27ac, H3K4me1 y H3K4me3 (Figura 29). H3K27ac, se encontró flanqueando los sitios de unión de CLOCK/BMAL1 (Figura 26) en el promotor y regiones intrónicas, los niveles de esta marca son mayores durante el ZT8 en fase con la unión de CLOCK/BMAL1 (Figura 29C). La marca H3K4me3 de acuerdo a lo esperado se encuentra enriquecida bordeando la región río arriba del TSS y el sitio de unión de BMAL1 del intrón 1 (Figura 29B). La oscilación en la señal de H3K4me3 es muy evidente, estando enriquecida durante el ZT 8 y alcanzando niveles similares al resto del gen durante la fase opuesta. Finalmente, se visualizó la marca H3K4me1, la cual no mostró enriquecimiento evidente en la región visualizada, aunque se encontró en general más enriquecida al ZT20, lo esperado por la disminución de la H3K4me3 en este ZT (Figura 29A).

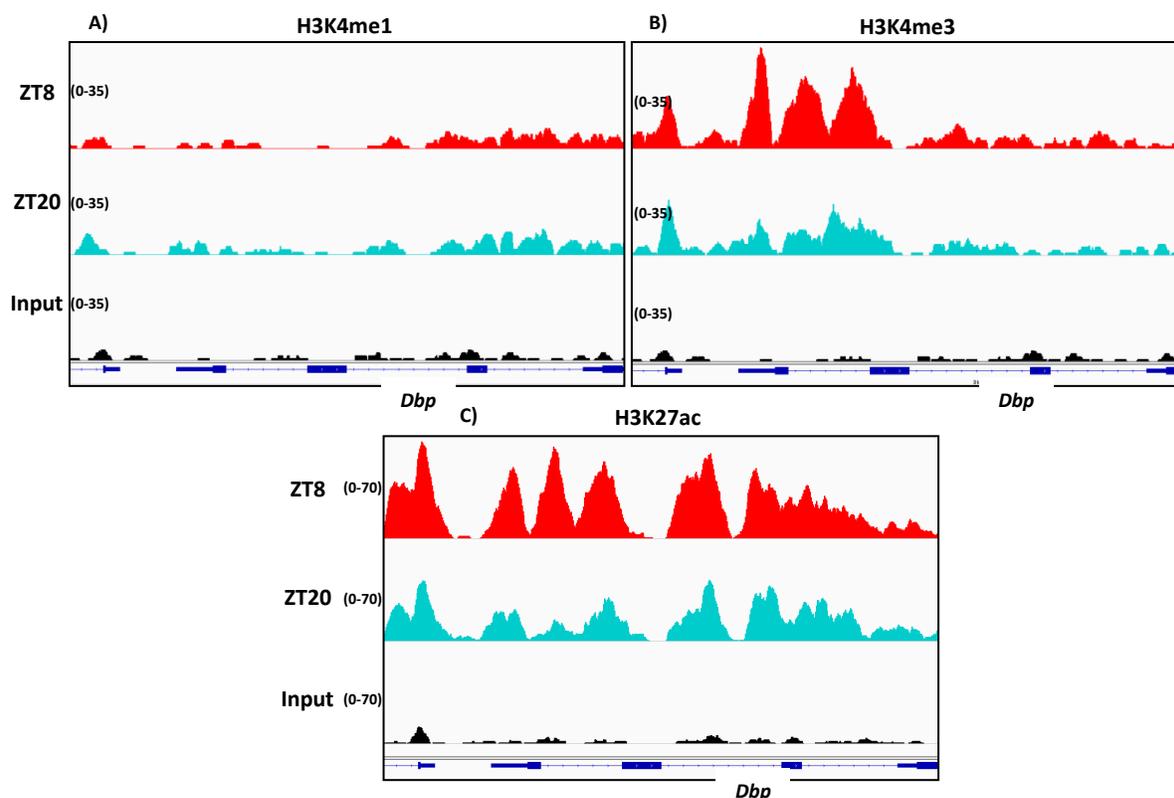


Figura 169 - Datos de ChIP-seq en el locus de *Dbp* para la H3K27ac, H3K4me3 (B) y H3K4me1 (C).

Los datasets fueron visualizados en IGV, en rojo se muestra la señal correspondiente al ZT 8 y en azul al ZT20. En el tercer track se muestra la señal correspondiente al Input. En la parte inferior se muestra la anotación génica que abarca el gen *Dbp* y parte de *Car11*. Datasets tomados de GSE39977.

### 7.3 Implementación de un protocolo de 4C-seq en hígados de ratones sanos y obesos.

Con el objetivo de determinar el interactoma del gen *Dbp* en los grupos experimentales se decidió usar la técnica 4C-seq usando como bait el gen *Dbp*. Para ello se realizó inicialmente la estandarización de la técnica, se determinó primero si existe una variación en la eficiencia con que el DNA se corta debido a las condiciones de entrecruzamiento, se probaron varios tiempos de entrecruzamiento (10, 15 y 20 minutos) (Figura 30). En los 3 casos se usó formaldehído al 2% y se comparó con un control sin entrecruzamiento. Con base en estos resultados, se decidió ocupar el tiempo de 15 minutos (Figura 30A carril 6), debido a que la restricción fue muy eficiente, lo cual garantiza que el entrecruzamiento ocurra en la mayor

parte de interacciones y no se pierdan capturas poco frecuentes para el punto de vista de nuestro interés.

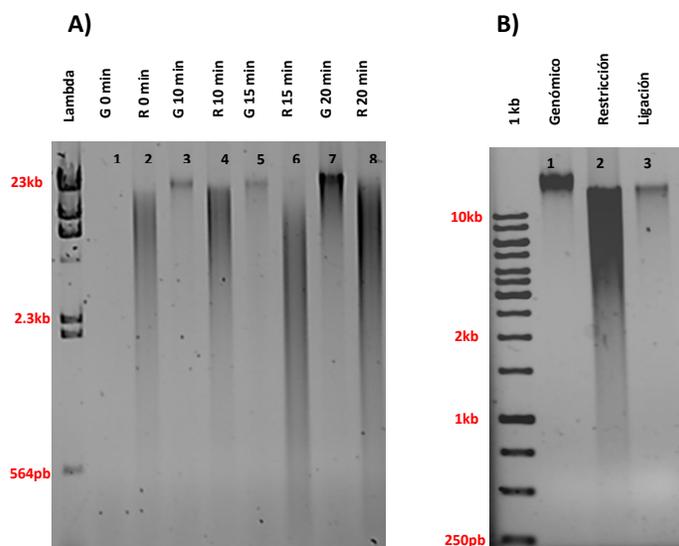


Figura 30 - Digestión con *HindIII* y ligación.

En A, se observa la digestión de las muestras entrecruzadas a 3 tiempos (10, 15 y 20 minutos), también se muestra la digestión de una muestra sin entrecruzamiento. Gel de agarosa 0.8%. G – genómico y R – Digestión con *HindIII*. En B se muestra tras la primera restricción (carril 2) y ligación (3). El DNA genómico se muestra en el carril 1.

En el paso siguiente de correspondiente a la ligación se observó un corrimiento a la fracción mayor a 10 kb (Figura 30B) de acuerdo a lo reportado previamente.

La segunda restricción y ligación generaron fragmentos de los tamaños esperados, por lo que se procedió a procesar las 8 muestras (Figura 31). Tras la primera restricción se genera un barrido de fragmentos con un enriquecimiento en el peso de 10kb, este aumenta tras la primera ligación. Tras la restricción con *Csp6I* y la ligación del material se genera un barrido que va desde fragmentos menores a 100pb hasta 10kb.

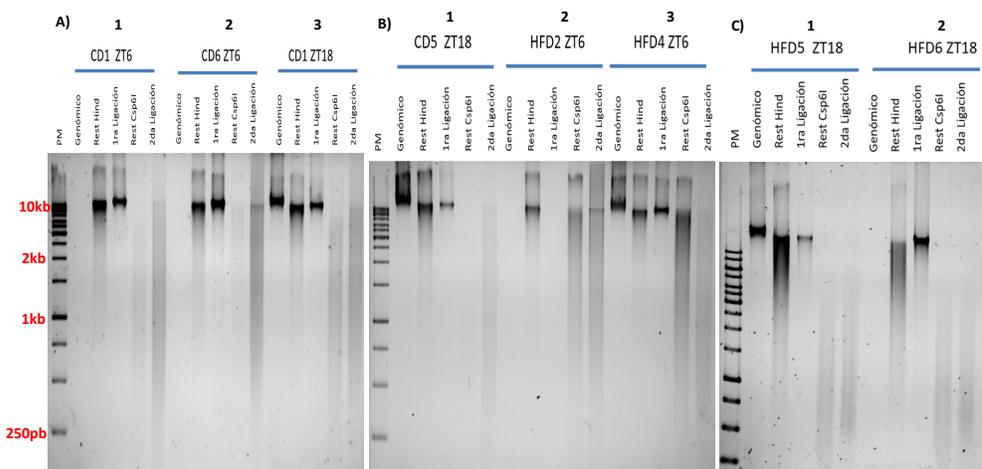


Figura 17 - *Procesamiento de muestras 4C.*

Se muestran las 8 muestras procesadas para la determinación del interactoma de *Dbp*. Para cada muestra DNA genómico, 1ra restricción (HindIII), ligación, 2da restricción (Csp6I) y 2da ligación. Gel de agarosa 0.8%.

Una vez obtenido el DNA 4C, se realizó la estandarización para la amplificación de la librería de 4C con los primers largos para todas las muestras (Ver Métodos, sección 6.7.6) (Figura 32). Hasta este paso, la composición del material 4C para nuestras muestras concuerda con lo reportado previamente con un barrido de fragmentos menores a 10kb hasta fragmentos menores a 100 pb [149]. La realización de la técnica de 4C en hígado de ratones adultos es por tanto factible y no depende del tipo de dieta. Esta es, hasta donde sabemos, la primera vez que se realiza un protocolo de 4C en hígados de ratones sometidos a obesidad inducida por la dieta.

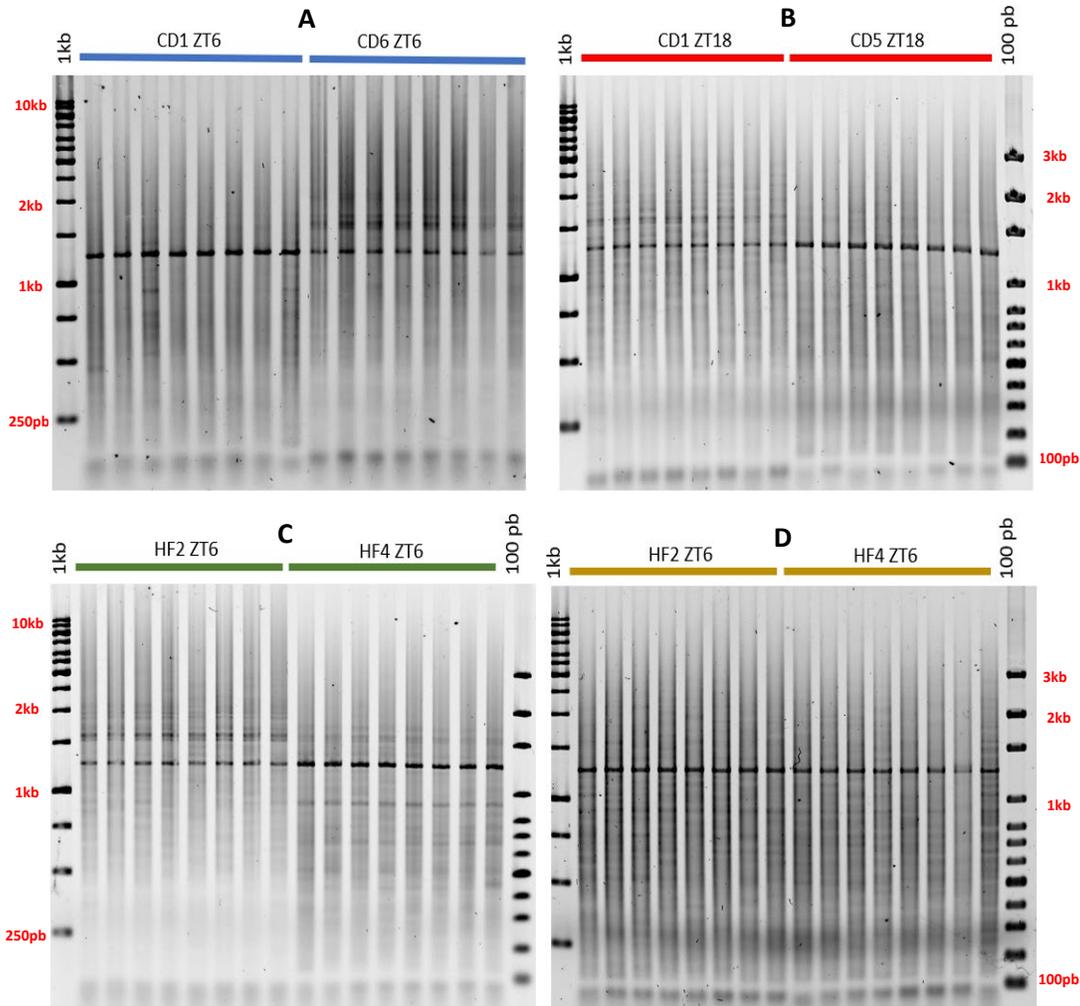


Figura 32 - Amplificación del material 4C de las muestras usadas para secuenciación.

Se muestran los patrones de amplificación para las 8 muestras usadas, A (Control ZT6), B (Control ZT18), C (HF ZT6) y D (HF ZT18). Geles de agarosa 0.8%.

### 7.6 Secuenciación de las librerías 4C de hígados de ratones sanos y obesos.

Con objeto de determinar el interactoma de *Dbp*, se procedió a la secuenciación de las librerías de 4C. Primero, se realizó una selección de tamaños de los fragmentos para conservar fragmentos menores a 2kb (ver Métodos, sección 6.5.1). Se observó que para todas las muestras, la mayor parte de fragmentos se encuentran por debajo de los 2000 pares de bases (Figura 33). Los fragmentos mayores a 10 kb fueron eliminados, y algunas muestras tienen fragmentos mayores a 2kb, sin embargo, representan un bajo porcentaje de la muestra.

Como se observa en la Tabla 2, se obtuvieron entre 900,000 y 2,5 millones de lecturas para cada muestra, lo cual está en el rango aceptado para el análisis de datos provenientes de

experimentos de 4C-seq en ratones ([125, 150]). Además, la mayor parte de la secuencia (hasta los 100nt), tuvo una calidad muy elevada para todas las muestras (Anexo 2). Se observó además que el porcentaje de alineamiento es muy elevado ( $\approx 90\%$ ) (Tabla 2). En esta línea, un parámetro de control de calidad para experimentos de 4C-seq es la determinación de las lecturas mapeadas en el cromosoma del gen de interés o “viewpoint” (VP) (cromosoma 7 para *Dbp*). Para todos los experimentos la recuperación de interacciones en el cromosoma del VP fue mayor al 45%, que corresponde a una buena calidad de experimento de acuerdo a reportes previos ( $> 40\%$  de reads en el cromosoma VP) [126]. El número total de lecturas con las que se realizó el análisis se muestra en la columna “Totales” de la Tabla 2, y sobre estas se realizó el análisis informático para la interpretación de los datos.



morado, respectivamente. Los números que aparecen sobre la gráfica corresponden a los pesos moleculares, se observa que la mayor parte de los fragmentos tienen un PM menor a 2kb.

Muestra	Reads	Alineadas	%	chr7	%	Totales
CD1 Zt6	2431966	2292990	94%	1160286	50.60%	2431966
CD2 Zt6	1375345	1277412	93%	658062	51.51%	1685319
CD1 Zt18	1222758	1167765	95%	548724	46.98%	1465547
CD2 Zt18	1182412	1120916	95%	582660	51.98%	1447688
HFD1 Zt6	822485	790897	96%	402668	50.91%	991775
HFD2 Zt6	1988612	1906043	96%	1099244	55.27%	1988612
HFD1 Zt18	2419748	2321182	96%	1162173	50.06%	2419748
HFD2 Zt18	2150580	2019773	94%	988142	45.94%	2150580

**Tabla 2 – Panorama general de las secuencias obtenidas.** Se muestra el número de lecturas obtenidas y el porcentaje de lecturas mapeadas. Se muestra también el número y porcentaje de lecturas en el cromosoma VP. En rojo se muestran muestras a las que se les añadieron lecturas obtenidas en una primera secuenciación, ya que todas las muestras fueron secuenciadas por duplicado

### 7.7 El locus *Dbp* presenta un interactoma circadiano en hígado de ratón.

En una aproximación inicial para el análisis usando R3Cseq [138] (Figuras mostradas en el anexo 3), se determinó que este *pipeline* de análisis de datos de 4C presenta algunas desventajas respecto a otros. Entre estas se puede mencionar que un gran número de interacciones son llamadas como significativas en regiones cercanas al VP, lo cual es debido al análisis poco astringente de este *pipeline*. Además, se ha demostrado previamente que muchas de las interacciones identificadas con R3Cseq carecen de significancia biológica [151]. Sin embargo, se consideró que para un primer acercamiento a los datos podría ser informativo este análisis. Interesantemente, se observó que para todas las muestras analizadas, las interacciones *downstream* del VP están restringidas a la región comprendida en las primeras 300 kb a partir del VP, y después de esta distancia la señal decae drásticamente. Este comportamiento no se observa al analizar las interacciones *upstream* del VP, en este sentido se observa un decremento gradual en la señal hasta 1 Mb de distancia del VP (anexo 2).

Debido a las desventajas mencionadas para R3Cseq, se decidió profundizar en el análisis usando el *pipeline* de FourCseq[151]. Lo primero que se analizó fue la reproducibilidad de los datos entre los replicados. El análisis mostró que los replicados son reproducibles entre sí, ya que, de acuerdo a lo esperado, la correlación fue mayor en los fragmentos con mayor

número de lecturas, los cuales corresponden a la región cercana al VP (Figura 34), de acuerdo a lo reportado previamente [151].

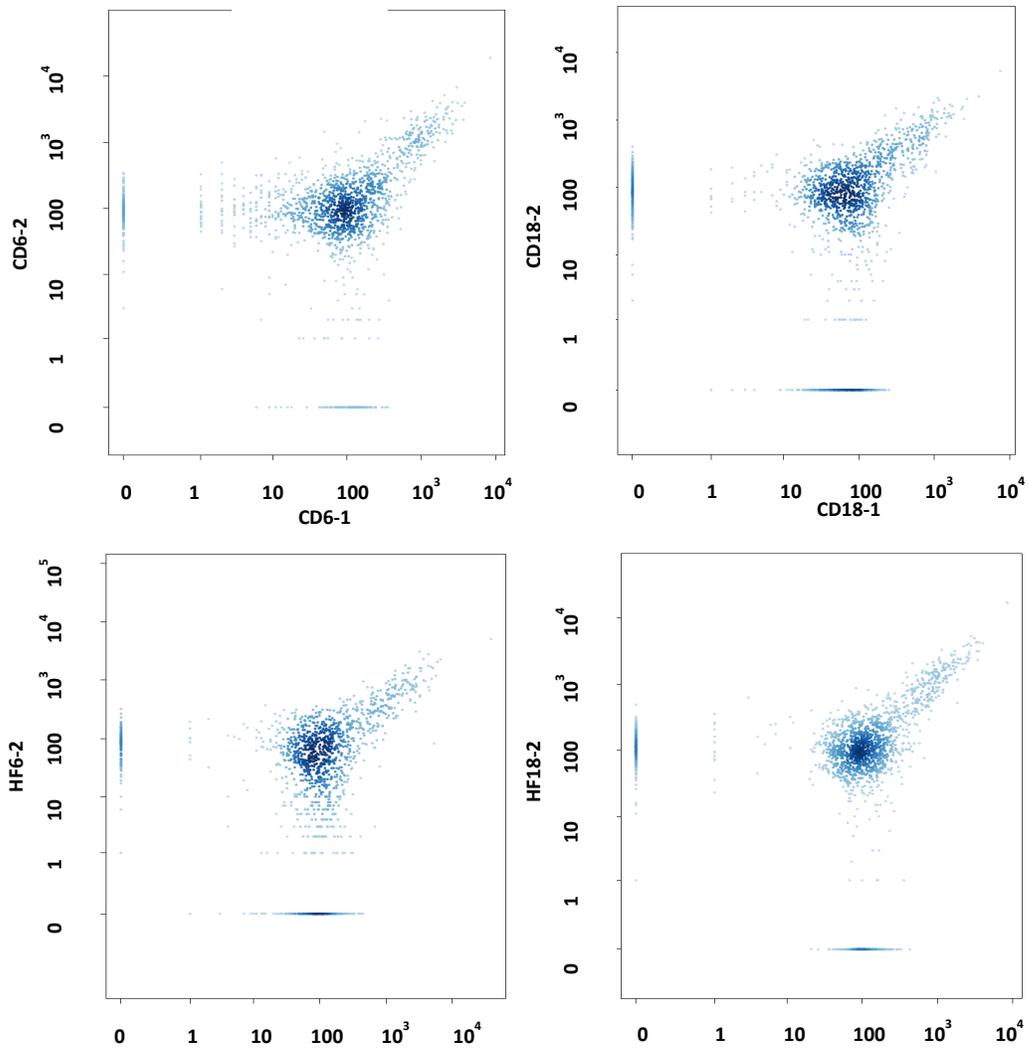


Figura 194 - Gráficos de dispersión mostrando la correlación entre los replicados.

En los ejes X y Y se encuentra el número de lecturas para los dos replicados. Cada punto corresponde a un fragmento.

El análisis para detección de interacciones detectó en el grupo control al ZT6 la presencia de 6 interacciones significativas (Z-score > 2 en ambos replicados y FDR < 0.05). Ninguno de estos fragmentos es detectado como interacción significativa en la fase opuesta, ZT18 (Figura 35A).

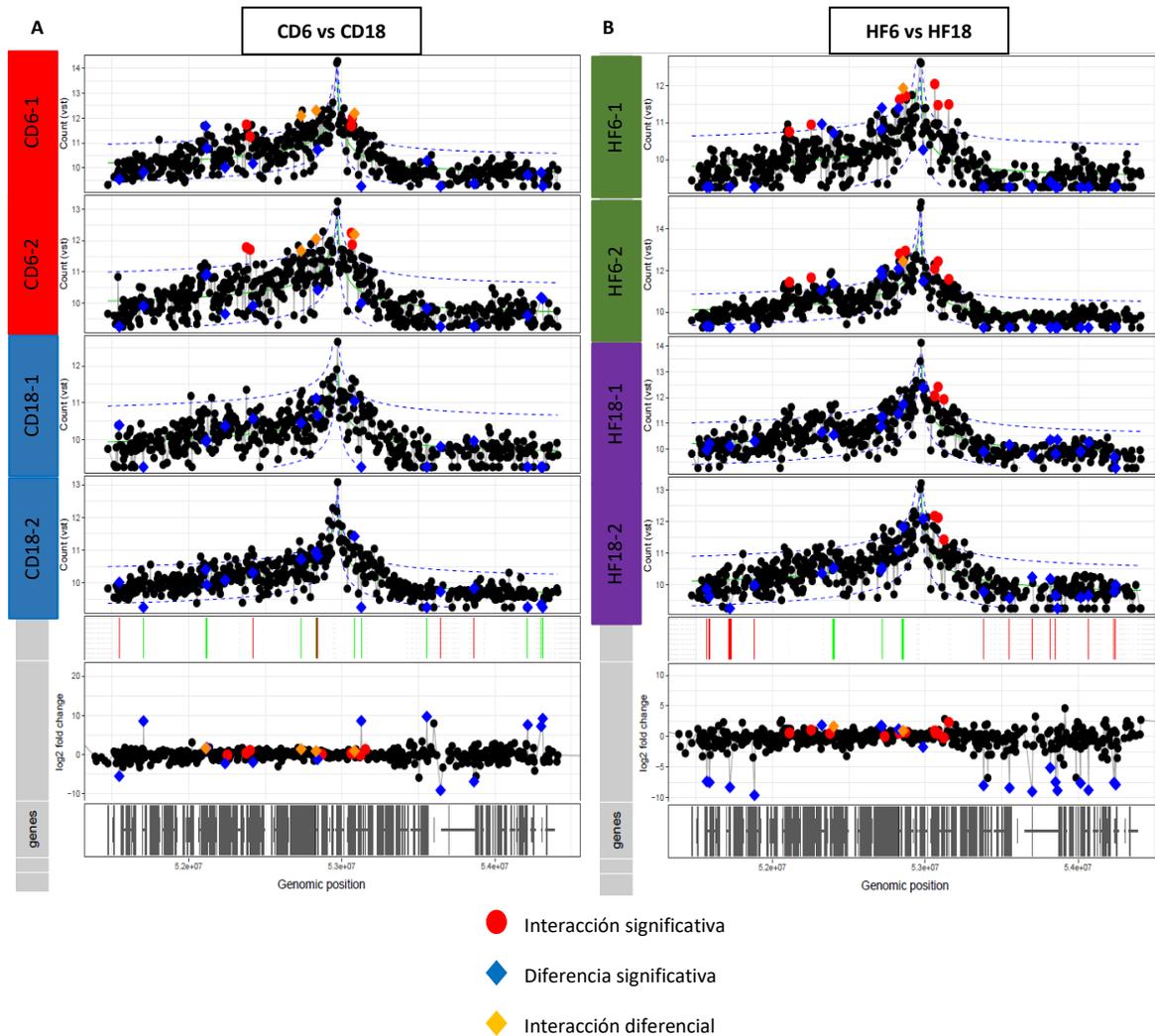


Figura 20 - Análisis de CD6 contra CD18 (A) y HF6 contra HF18 (B) en FourCseq.

Debajo de los mapas de interacción se muestran barras correspondientes al análisis diferencial (verde enriquecido en ZT6 y rojo en ZT18). La ventana mostrada corresponde a 1.5 Mb con el VP en el centro. En el eje X se muestra la posición genómica y en Y el conteo con transformación estabilizadora de la varianza para cada muestra. Cada punto negro corresponde a un fragmento bordeado por sitios de restricción de HindIII.

En los hígados de los ratones alimentados con dieta rica en grasas, se detectan 7 interacciones significativas entre el locus de *Dbp* y las regiones adyacentes al ZT6 (Figura 35B). Al igual

que en los hígados de los ratones control, el número de interacciones significativas disminuye a ZT18 (Figura 35B), presentándose tan solo 3 interacciones significativas. Esto es coherente con la dinámica circadiana de expresión de *Dbp*, ya que su máximo de expresión es a ZT6, y se ha descrito que, en general, las interacciones a distancia con elementos reguladores son mayores en la fase en que el gen se transcribe ([2, 128]). En conjunto, estos resultados indican que el experimento de 4C-seq ha funcionado correctamente, ya que los replicados son comparables, y apuntan a que el análisis con el pipeline seleccionado es correcto, ya que se obtienen resultados de una dinámica de interacciones acorde y lógica según la expresión del gen *Dbp*.

#### 7.8 El interactoma circadiano del locus de *Dbp* se reorganiza en respuesta a la dieta rica en grasas.

Para determinar si los animales alimentados con distintos tipos de dieta presentan un paisaje regulatorio diferencial en cuanto a las interacciones a distancia con el gen *Dbp*, se procedió a comparar los mismos ZT entre las distintas condiciones nutricionales (Figura 36). Se observa que los perfiles generales son más similares entre ZTs, con la mayoría de interacciones conservadas en el ZT6 y un menor número de interacciones durante la fase opuesta en ambas condiciones (Figura 36).

En el análisis comparativo sobre las interacciones de *Dbp* entre las dos condiciones de alimentación, se identificaron 3 escenarios distintos para las interacciones; 1) Interacciones que persisten entre los animales alimentados con dieta control y los alimentados con dieta HFD 2) Interacciones específicas para la dieta control 3) Interacciones específicas de la dieta HFD.

Este resultado muestra que la alimentación con dieta rica en grasas juega un papel importante en la regulación del gen *Dbp*, la formación de nuevos contactos en este grupo sugiere que la obesidad inducida por la dieta tiene un efecto en la arquitectura de este loci genómico posiblemente mediada por la acción de factores transcripcionales regulados a la alta por la dieta obesogénica [140].

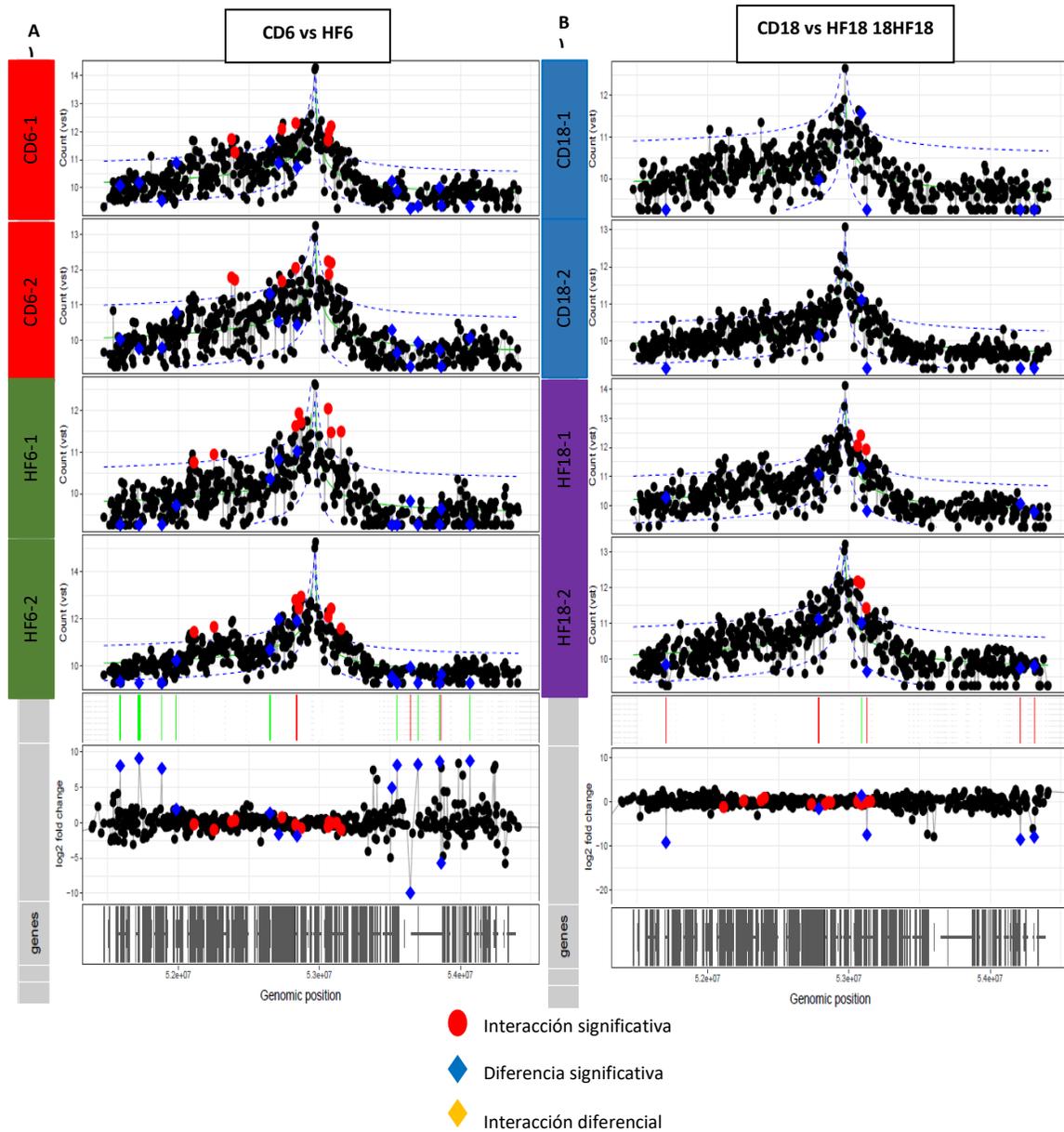


Figura 21 - Análisis de CD6 contra HF6 (A) y CD18 contra HF18 (B) en FourCseq.

Debajo de los mapas de interacción se muestran barras correspondientes al análisis diferencial (verde enriquecido en grupo control y rojo en HFD). La ventana mostrada corresponde a 1.5 Mb con el VP en el centro. En el eje X se muestra la posición genómica y en Y el conteo con transformación estabilizadora de la varianza para cada muestra.

## 7.9 Las interacciones detectadas muestran características cromatínicas propias de elementos regulatorios.

Para identificar las interacciones detectadas con potencial regulatorio, se mapearon los sitios de interacción con los datos circadianos previamente publicados de ChIP-seq para factores de transcripción (BMAL1 ZT8/20) y modificaciones postraduccionales de las histonas asociadas a elementos regulatorios (H3K27ac, H3K4me1, H3K4me3 y P300 ZT8/20), así como accesibilidad de la cromatina (DNase-seq ZT7/19) y transcripción nascente (ZT 7/19) (Figura 37).

Interesantemente, de 12 interacciones encontradas en total, 5 coincidieron con sitios de unión de BMAL1, o bien presentaron marcas asociadas a elementos regulatorios activos (DHS y H3K27ac). Particularmente las interacciones 1 a 4 coincidieron con sitios de unión de BMAL1 y presencia H3K27ac. Ciertamente, algunas de las interacciones a distancia de *Dbp* no sobrelaparon con las características de elementos reguladores revisadas, por lo que no podemos determinar su significado biológico con las herramientas disponibles.

Se procedió a analizar más detalladamente las interacciones con potencial regulatorio, todas ellas encontradas a ZT6 en alguna de las condiciones de dieta. Se distribuyeron en tres grupos:

- 1) Interacciones constantes: presentes en los hígados de ratones independientemente del tipo de dieta, 2 en total que corresponden a los identificadores 4 y 5/6 de la figura 37.
- 2) Interacciones específicas de ratones sanos: Presentes específicamente en hígados de ratones control, 2 en total que corresponden a los identificadores 1 y 2 de la figura 37.
- 3) Interacciones específicas de ratones obesos: Nuevas interacciones que se producen en hígado de ratones obesos tras la alimentación con dieta rica en grasas, 4 en total que corresponden a los identificadores 6, 8, 9 y 10 de la figura 37.

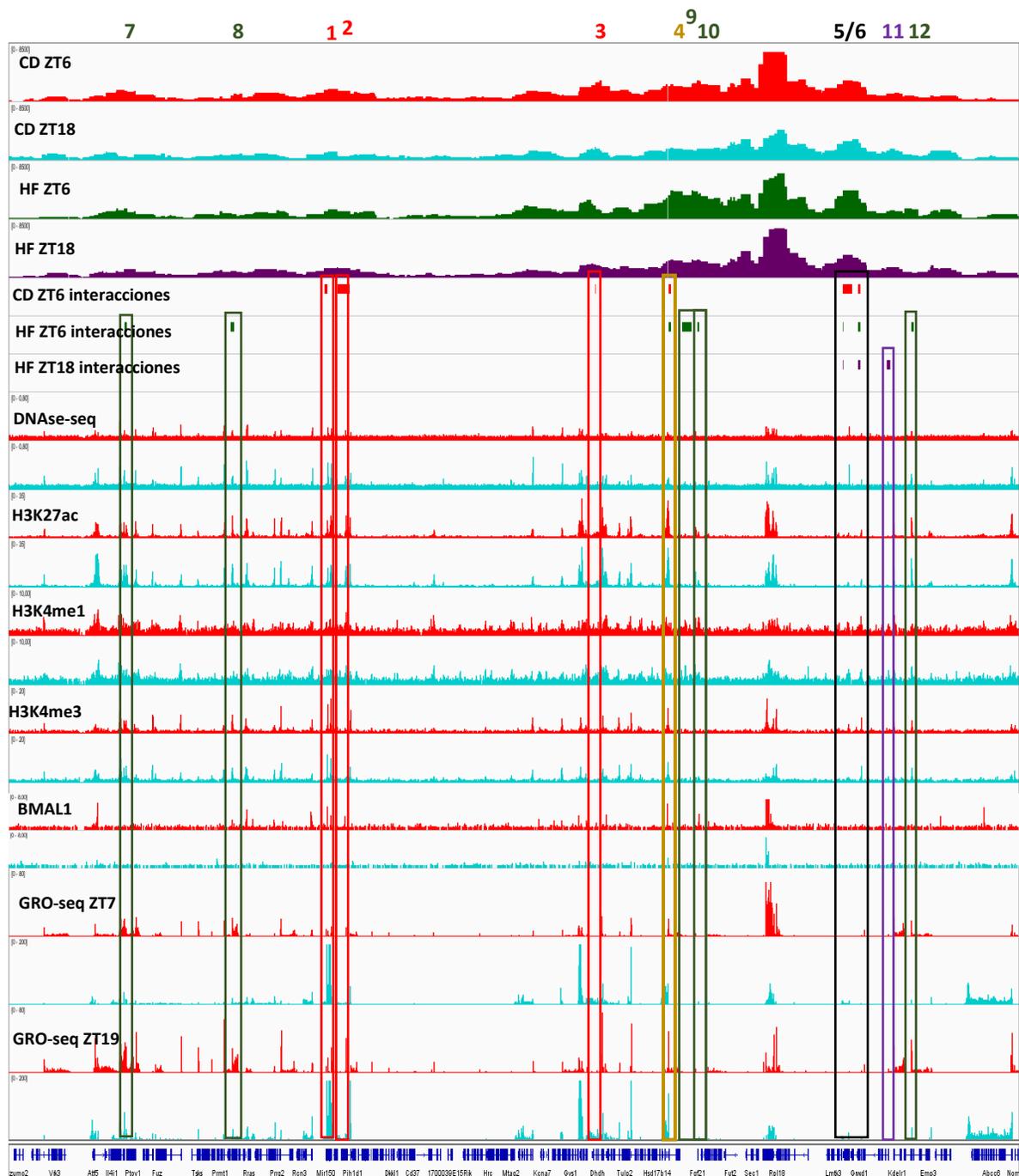


Figura 22 - Interacciones sobrelapan con marcas de interés.

Visualización de las interacciones en IGV junto con marcas de histona, factores y modificadores de la cromatina y transcripción nascente (GRO-seq). En rojo se muestran las marcas que ocurren durante la fase diurna y en azul la fase nocturna. Los recuadros que rodean las interacciones son rojos (CD ZT6), verdes (HFD ZT6), morados (HFD ZT18), amarillo (CD y HFD ZT6) y negro (CD, HF ZT6 y HFD ZT18). Las interacciones 5 y 6 se referirán de manera conjunta debido a que están muy cercanas y comparten características cromatínicas.

Entre las interacciones correspondientes al grupo 1), encontramos las tres identificadas como 4, 5/6 (Figura 37).

La interacción 4 (Figura 38A), corresponde a los genes *Bcat2* y 0610005C13Rik, un gen que codifica un RNA largo no codificante (ncRNA). Interesantemente, se observa unión de BMAL1 y CLOCK en el fragmento adyacente en un intrón de 0610005C13Rik (Figura 40A, flecha roja), que coincide con un sitio accesible a la DNAsa y con presencia de H3K27ac, por estas características parecería ser un elemento enhancer sin embargo no está enriquecido en la monometilación de H3K4, en los tracks de GRO-seq se observa transcripción en esta región antisentido al gen 0610005C13Rik, que es mayor durante el ZT7. Este fragmento podría ser el verdadero blanco de la interacción sin embargo carece de sitios de Csp6I, por lo que fue eliminado durante el análisis. Es por ello que el fragmento adyacente pudiera haber sido detectado como el fragmento de interacción.

La interacción 5/6 corresponde a dos contactos significativos con características cromatínicas similares, por lo que se los analizamos de manera conjunta. Este contacto fue también detectado en hígados de ratones de ambos grupos, CD y HFD, al ZT6. Corresponde a tres fragmentos muy cercanos entre sí que abarcan los genes *Cyth2*, *Kcnj14* y *Grwd1* (Figura 38B). Al analizar las marcas epigenéticas, se observó que *Cyth2* y *Grwd1* tienen el perfil de genes activos, con hipersensibilidad a DNAsa y H3K27ac en sus promotores. Es interesante que el gen *Cyth2* no muestra enriquecimiento de H3K4me3 sobre H3K4me, pero presenta un pico de unión de P300. Ambos genes muestran transcripción naciente que permanece invariable en los ZT observados. El gen *Kcnj14* no presenta enriquecimiento en ninguna de las marcas analizadas ni transcripción naciente.

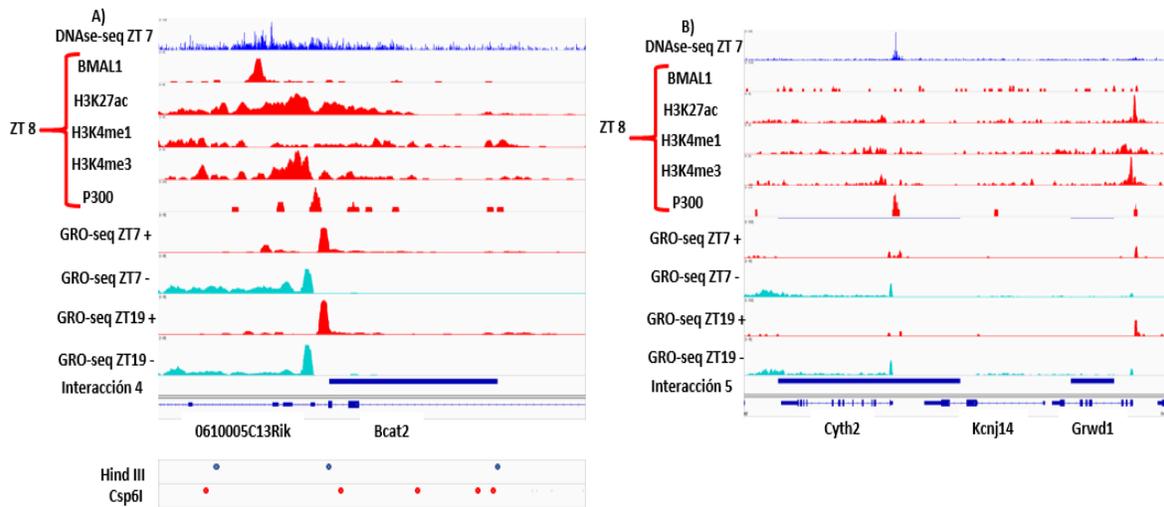


Figura 23 - Interacciones compartidas por los grupos CD y HFD del ZT6.

Se muestran los perfiles de las 3 interacciones compartidas, corresponden a las interacciones 4, 5/6 (A y B respectivamente). En A se muestran los sitios de HindIII/rojo y Csp6I/azul.

En el grupo 2) se identificaron 2 contactos que se detectaron únicamente en las muestras de hígado de ratón sometido a dieta normocalórica, a ZT6. Estas interacciones fueron identificadas con los números 1 y 2 (figura 37). La interacción 1 abarca parte del gen *Rps11* y *Mir150* (Figura 39A). *Rps11* tiene unión de BMAL1 y CLOCK durante la fase diurna en la región del promotor. Transcripcionalmente, se observa que para *Rps11* no existen diferencias entre los ZT observados. Al revisar a más detalle esa región, se encontró que en el intrón 3 de *Rps11* se encuentra un gen de snoRNA llamado *Snord35b* (Figura 40). Interesantemente, la transcripción de esta región si está aumentada durante el ZT7, en fase con *Dbp*. La interacción 2, abarca el gen *Aldh16a1* (Figura 39B). Se identificó en esta interacción una región intergénica con las marcas típicas de enhancer, accesibilidad a la DNAsa que sobrelapa con H3K27ac y con la marca H3K4me1. También tiene unión de las proteínas BMAL1 y CLOCK. Se observa en los tracks correspondientes a GRO-seq que en la región mencionada existe un transcrito antisentido al gen *Aldh16a1*, sin embargo, tanto este como la señal observada en el TSS del gen parecerían ser mayores al ZT19.

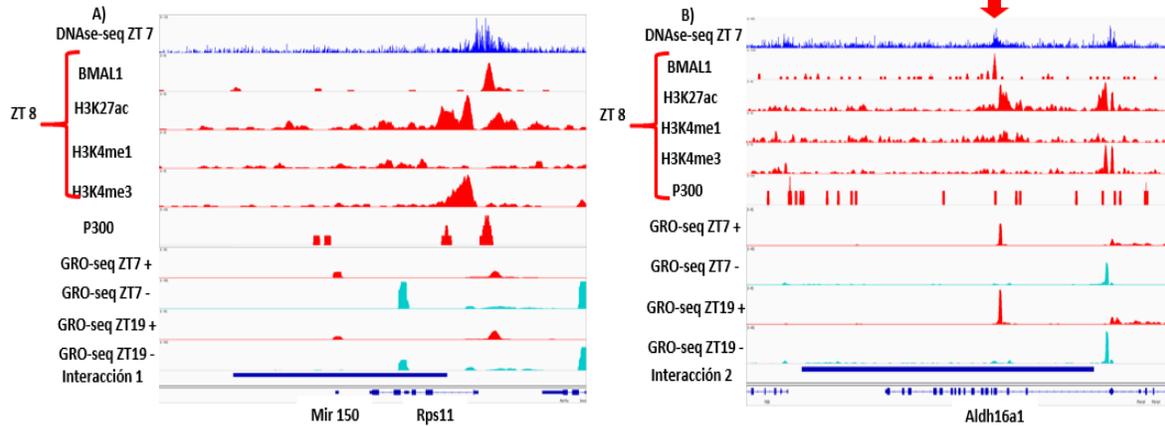


Figura 24 - Interacciones del grupo CD ZT6.

Se muestran los perfiles de 2 interacciones presentes solo en este grupo. Corresponden a las interacciones 1 (A) y 2 (B). La flecha en rojo muestra una región intragénica de interés.

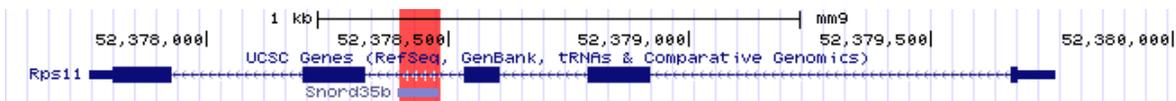


Figura 40 - Ubicación del snoRNA Snord35b en el intrón 2 de Rps11.

Se muestra el gen Rps11 visualizado en el visualizador de la UCSC, en rojo se señala la región donde se localiza el gen de Snord35b.

Por último, las interacciones del grupo 3, son tres regiones que se encuentran interaccionando con *Dbp* únicamente a ZT6 en los hígados de ratones alimentados con dieta rica en grasas (Figura 41).

La interacción 7 (Figura 41A) presente de manera exclusiva en el grupo HFD al ZT6 abarca el extremo 3' del gen *Akt1s1* y el promotor de *Pnkp*. El último intrón de *Akt1s1* presenta accesibilidad y enriquecimiento de H3K4me3 así como H3K27ac. En el GRO-seq se observa que esta región genera transcrito antisentido al del gen *Akt1s1* (flecha).

La interacción 8 abarca el promotor de los genes *Bcl2l12* y *Lrf3* (Figura 41B). Interesantemente, en el intrón 1 de *Lrf3* se observa un sitio hipersensible a la DNasa con unión de BMAL1. Al observar la transcripción naciente se vio que en esta región se genera un transcrito antisentido a *Lrf3*. La interacción 9 corresponde a una región sin genes anotados (intragénica) (Figura 41C), sin embargo, presenta accesibilidad a la DNasa con unión de BMAL1, H3K27ac y con enriquecimiento de la H3K4me sobre la H3K4me3. Tiene también

unión de P300 y presenta transcripción bidireccional en el ZT7, por lo que podría tratarse de un elemento enhancer. Por último es interesante resaltar la interacción 10 (Figura 41D), la cual corresponde al gen *Fgf21*, el cual tiene unión de BMAL 1 en su promotor, sobrelapa además con la marca H3K27ac y unión de P300. Presenta también mayores niveles de H3K4me sobre H3K4me3 (flecha). En el GRO-seq se puede observar que su transcripción es claramente circadiana, estando favorecida en el ZT7.

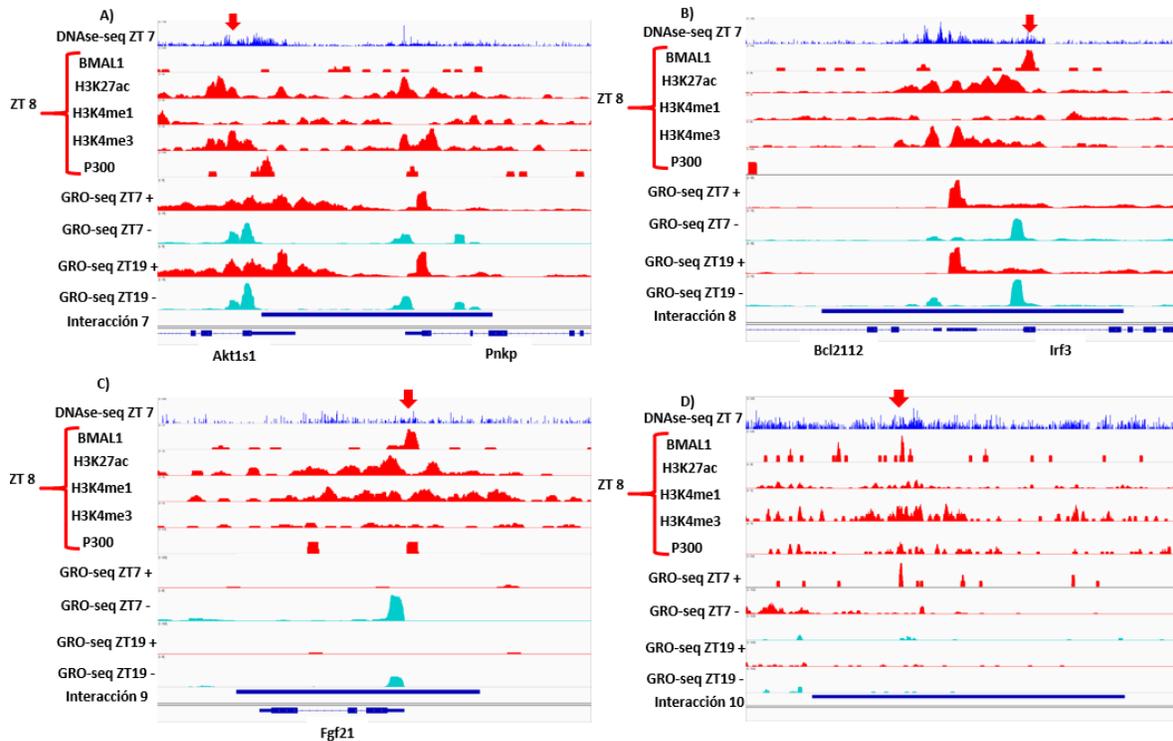


Figura 41 - Interacciones del grupo HF ZT6.

Se muestran los perfiles de 3 interacciones presentes solo en este grupo. Corresponden a las interacciones 8 (A), 9 (B) y 10 (C). Las flechas rojas muestran regiones de interés.

## 8. Discusión de resultados

En este trabajo, hemos abordado la pregunta fundamental de cómo los estímulos nutricionales podrían estar teniendo un impacto sobre la definición de programas de expresión génica a través de la reorganización de elementos regulatorios del genoma. Para ello, primeramente generamos un modelo de obesidad inducida por la dieta, y se obtuvieron los resultados esperados en los parámetros analizados, de acuerdo a condiciones reportadas previamente para animales obesos [152]. Así, se observó el aumento de peso al final del experimento (21.8%) tras 12 semanas, acorde con previos reportes [153], y el desempeño de los animales en las pruebas de tolerancia a glucosa e insulina, el cual se realizó al ZT1 y ZT13 debido a que el comienzo de la actividad de los ratones al ZT13, y es entonces cuando presentan mayor sensibilidad a la insulina [133]. Los animales alimentados con HFD muestran desempeño significativamente bajo en ambas pruebas: en la prueba de tolerancia a la glucosa durante el ZT1 los niveles de glucosa en sangre permanecen mucho más elevados que al inicio del test, aunque a ZT13, la respuesta es más efectiva. En contraste, los animales alimentados con la dieta control recuperan sus niveles de glucosa basales al final del test, y permanecen significativamente más bajos que los HFD durante todo el test en ambos ZT's. Esta alteración denominada intolerancia a la glucosa se ha reportado también previamente para animales obesos [154]. En el caso de la insulina se observa un comportamiento similar: en el ZT1, los niveles de glucosa permanecen elevados en los animales alimentados con HFD, y a lo largo de todo el test no disminuyen más allá de los niveles basales. En contraste, el grupo control presenta un rápido decremento de la glucosa sanguínea. En el ZT13, sí se observa una disminución en los niveles de glucosa de ambos grupos; sin embargo, los niveles del grupo HFD son significativamente más elevados durante la mayor parte del experimento. Esto pone en evidencia otra alteración de los animales alimentados con HFD que es la resistencia a la insulina [155, 156].

En cuanto a los niveles de transcrito de *Dbp* se observa algo similar a lo reportado en referencias anteriores [87, 144] donde a los ZT utilizados durante este trabajo los animales alimentados con la dieta alta en grasa muestran niveles más elevados al compararlos con los del grupo control. En las referencias mencionadas más que un incremento de los niveles de mRNA total de *Dbp*, se observa un adelanto de dos horas en su acrofase, de ZT8 a ZT6, de

acuerdo a los resultados que obtuvimos en el estudio, con un aumento significativo en los niveles de mRNA en el grupo HF al ZT6 (Figura 24), se observa un comportamiento similar a dichos antecedentes, sin embargo no se puede asegurar si el avance de fase ocurre en realidad debido a que nuestro estudio está acotado únicamente a los ZT 6 y 18.

Se decidió revisar el pre mRNA para *Dbp* dado que es un indicativo más claro del estado transcripcional del gen. Las diferencias en los niveles de transcrito naciente entre los dos ZT's, son muy similares a los obtenidos para mRNA maduro con niveles muy elevados en el ZT 6 respecto al ZT 18.

Para el grupo control, los resultados obtenidos son consistentes con datos revisados de RNA naciente [76, 157], donde para *Dbp*, el pico se encuentra dos horas antes que para mRNA total, es decir, al ZT6.

Al visualizar datos de Gro-seq (GSE59486) (Figura 42A) de hígado de ratones C57BL/6 sanos generados cada 3 horas, se observa que interesantemente el enriquecimiento en la transcripción naciente de *Dbp* está restringido a la medición del ZT7, respecto a este tiempo, las mediciones anterior y posterior (ZT4 y ZT10) muestran un decremento drástico. Estos resultados sugieren que *Dbp* se transcribe en un periodo muy particular que en ese estudio con resolución de 3 horas es observado al ZT7.

Por otro lado, opuesto a los niveles significativamente más elevados observados para el grupo HF en mRNA maduro, los niveles de pre mRNA del grupo HF al ZT6 son significativamente menores que en el grupo control (Figura 25).

De manera interesante, al visualizar datos de Gro-seq de hígado de ratones C57BL/6 con obesidad inducida por la dieta (DIO) (Figura 42B, GSE108878) generados cada 3 horas, se observó que los niveles de transcrito naciente de *Dbp* son más bajos que en el grupo control al ZT7, esto es consistente con nuestra medición de pre mRNA (Figura 25), adicionalmente se observó que a diferencia del grupo control donde el enriquecimiento en transcripción naciente en este locus se restringe al ZT7, en el grupo DIO este abarca las mediciones de los ZT 4, 7 y 10. Esto sugiere que la alimentación con la dieta alta en grasas es capaz de desregular la transcripción de *Dbp* de dos maneras, por una parte disminuyendo su nivel de transcripción naciente durante la acrofase y por otra parte ampliando su fase de transcripción.

Esta ampliación de la fase, en particular el enriquecimiento en la transcripción al ZT4 podría impactar en la acumulación de mRNA pudiendo explicar los niveles más elevados en el nivel de mensajero maduro que observamos al ZT6 (Figura 24).

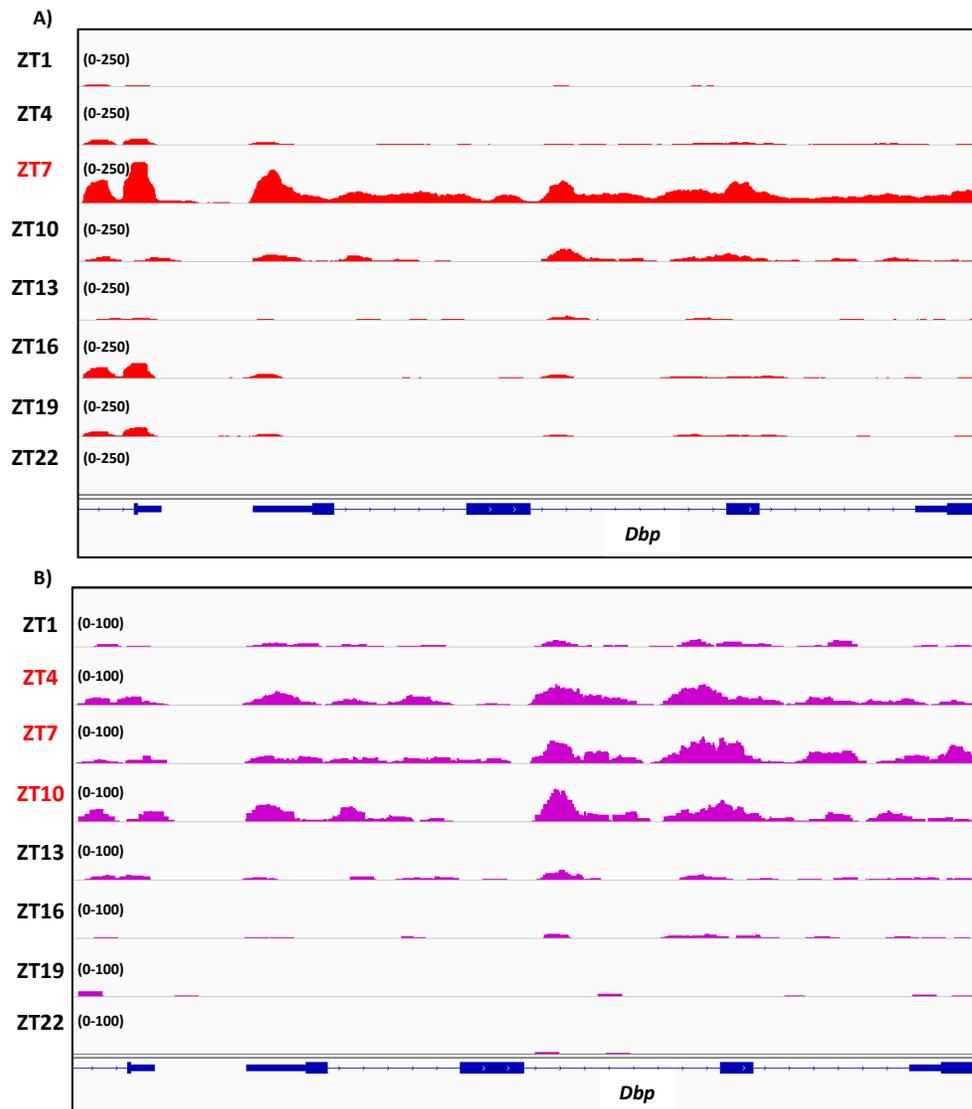


Figura 25 – La dieta alta en grasas reorganiza la transcripción de *Dbp*.

GRO-seq mostrando la transcripción naciente en *Dbp* en hígado de ratón C57BL/6 control (A) y con obesidad inducida por la dieta (B). Las muestras fueron tomadas cada 3 horas durante 1 día. En rojo se muestran los ZT en donde la transcripción está enriquecida.

Para el 4C-seq se corroboró en todos los pasos lo esperado de acuerdo a lo reportado para la técnica [126, 158, 159]. La generación de librerías con indexado para cada muestra se realizó exitosamente mediante la estrategia para la generación de librerías para metagenómica con 16S de Illumina. La variación en el número de reads obtenidas para cada muestra se podría atribuir a la composición de las librerías observada en el Bioanalyzer, puesto que las librerías con fragmentos de mayor tamaño tienden a generar menor número de lecturas durante la secuenciación. Esto podría resolverse posiblemente recalculando la molaridad relativa de cada muestra, tomando en cuenta su composición de tamaños, antes de cargarlas en el secuenciador.

La calidad de las secuencias fue muy elevada, así como su mapeabilidad al genoma. La calidad de las muestras a nivel del experimento es buena también tomando como parámetro el porcentaje de lecturas mapeadas al cromosoma del viewpoint (cromosoma 7 para *Dbp*) [126] (>45%). Una estrategia a tomar en cuenta en base a experimentos recientes es la disminución de profundidad de la secuenciación a cambio de la generación de mayor enriquecimiento de la librería aumentando el material 4C amplificado por PCR, lo cual ha demostrado generar mayor rendimiento para la detección de interacciones significativas [150].

Respecto a los análisis realizados, inicialmente se realizó un llamado de interacciones significativas con el paquete R3Cseq. Al igual que otros paquetes usados para el análisis estadístico de interacciones de 4C-seq, este análisis se basa en la utilización de un algoritmo para la modelación de la señal teórica a lo largo del cromosoma VP, el cual se basa en la observación de la disminución de probabilidad de interacciones conforme se aleja del VP, y otro algoritmo adicional para la modelación de las probabilidades de interacción en *cis* lejano y en *trans* [138, 160]. Se realiza una normalización de los datos a RPM para contender con las diferencias en la profundidad de secuenciación entre muestras, y se realiza el conteo de lecturas por fragmento o por ventana genómica. El análisis por ventana genómica permite la detección de interacciones en ventanas de tamaño variable para detectar significancia de interacciones en regiones de mayor tamaño del genoma, típicamente se usa una ventana de 5kb que puede variar para adecuarse a la reproducibilidad de las interacciones entre experimentos [161]. En el caso del presente trabajo se eligieron las ventanas 5kb y 3kb, y en

la segunda fue donde se llamaron mayor número de interacciones en el análisis Batch (con replicados y comparando condiciones).

Se observaron varias desventajas en los análisis generados por este pipeline, siendo la más evidente la identificación de un gran número de interacciones en todas las condiciones, muchas de las cuales carecían de significancia biológica al sobrelaparlas con marcas epigenéticas y anotaciones génicas. Esto imposibilitó la interpretación de los datos y es acorde a lo descrito previamente [151] por el grupo que implementó el pipeline FourCseq, donde se reporta que R3Cseq carece de parámetros lo suficientemente estrictos para detectar interacciones reales, así como un método adecuado de normalización para evitar sesgo en los datos, generando muchos falsos positivos. Debido a esto, se decidió revisar un pipeline alternativo para el análisis de los datos.

En el análisis por FourCseq, el algoritmo usado para el modelaje de la señal en *cis* es más estricto que en R3cSeq y detecta un menor número de interacciones, sin embargo, se ha demostrado mayor validez en las interacciones detectadas en comparación con R3cSeq [151]. La principal bondad de este paquete es que permite el análisis comparativo entre condiciones.

El resultado más evidente al analizar los datos de nuestros distintos grupos es que existen claras diferencias entre ZT6 y ZT18 independientemente del tipo de dieta. En concreto, durante la fase transcripcional de *Dbp* (ZT6) se detectan interacciones en *cis* que desaparecen en la fase opuesta. Esto sugiere un interactoma circadiano y dinámico para *Dbp* en ratones, similar a lo reportado previamente para este gen en MEFs [2] y para otros genes en hígado [128, 162]. Estos reportes previos ilustran que los genes circadianos tienden a formar contactos durante su fase transcripcional con elementos que favorecen su transcripción o con los que colocalizan en fábricas transcripcionales, mientras que, en la fase opuesta, estos contactos ocurren con menor frecuencia lo que correlaciona con la disminución en la transcripción del gen.

Para determinar el papel de las interacciones, se utilizaron bases de datos previamente generadas por otros grupos, las cuales nos permitieran discernir el estado cromatínico de las regiones contactadas y determinar a qué tipo de secuencia genómica corresponden. Para ello, ocupamos como marcador de la accesibilidad de la cromatina datos de DNase-seq, que permite determinar qué tan accesible es una región analizada a la DNase1. Regiones

hipersensibles a la actividad de esta enzima generalmente corresponden a elementos regulatorios (enhancer, promotor, insulador) que se encuentran desprovistos de nucleosomas [74, 75]. Algunos elementos, sin embargo, aunque se encuentran en sitios de cromatina accesible no se encuentran activos. Por ello, un marcador adicional que nos permitió determinar si dicho elemento se encuentra activo en las condiciones analizadas es la marca de histona H3K27ac [163, 164].

Un parámetro que se ha usado ampliamente para la identificación de elementos enhancer y promotor es el estado de metilación de H3K4. Se sabe que los promotores generalmente tiene mayor nivel de la trimetilación de H3K4 (H3K4me3) que de monometilación (H3K4me1)[165], mientras que los enhancer tienen mayores niveles de la H3K4me1. Se ha mostrado que la H3K4me juega un papel importante en la formación de asas enhancer-promotor [166]. Además, existe un subgrupo de promotores con la capacidad de funcionar como enhancer que presentan niveles mayores de H3K4me1, apoyando el papel que desempeña esta marca para la función de enhancer [167]. Un parámetro adicional que permite discernir elementos enhancer es la presencia la proteína P300, por lo cual se decidió visualizar también [168].

Se visualizó también BMAL1, parte del complejo CLOCK/BMAL1 que se une de manera circadiana al promotor de *Dbp*, por lo que se le atribuye la transcripción circadiana de este gen. Se ha reportado además que los enhancers circadianos con fase entre los ZT 6-9 están enriquecidos en elementos E-box [76], por lo que algunos de los enhancer a cargo de la regulación de *Dbp* que tiene esa fase de transcripción podrían estar regulados por BMAL1. Además de esto, se ha reportado que *Dbp* podría estar incluido durante su fase transcripcional en fábricas transcripcionales enriquecidas en genes circadianos con la misma fase transcripcional y que contienen en sus secuencias por lo tanto elementos E-box, el motivo de unión de BMAL1 ([2]). Dada esta evidencia, BMAL1 es un elemento interesante para analizar en las interacciones obtenidas.

Se distinguen tres tipos de interacciones: 1) interacciones conservadas en ZT6, 2) interacciones específicas de los hígados de ratones sanos 3) interacciones específicas de los hígados de ratones obesos.

El primer grupo contiene 2 interacciones, en la primera interacción (Figura 38A) se observó accesibilidad a la DNAsa así como enriquecimiento de H3K27ac y unión de BMAL1. Está ubicada en una región intrónica compartida por *Bcat2* y 061005C13Rik. Esta región se está transcribiendo mayoritariamente al ZT7, esto es consistente con los hallazgos [75] sobre la correlación de la fase de transcripción de enhancer circadianos con genes circadianos en cercanía. La interacción se conserva en las dos condiciones pero ocurre únicamente al ZT6, lo que sugiere un papel importante en la activación transcripcional de *Dbp*.

La siguiente interacción que se conserva dieta control y HFD del ZT6, (figura 38B) abarca 2 genes, en ellos no se observa unión de BMAL1 y muestran únicamente las características típicas de promotores activos para los 2 genes que abarca, estos muestran transcripción divergente en sus promotores pero favorecida en el sentido del gen. *Cyth2* presenta en su región promotora niveles similares de mono y trimetilación de H3K4, tiene además unión de P300, estas características podrían sugerir un posible rol regulatorio para para contactos distales, sin embargo no son concluyentes [117]. Los mecanismos de regulación para ambos genes no están reportados por lo que la funcionalidad de esta interacción no es clara, incluso podría tener únicamente un papel estructural y carecer de efecto sobre la regulación de *Dbp*.

En el grupo 2 se encuentran las interacciones presentes únicamente en el grupo control al ZT6. La primera de estas (Figura 39A) corresponde al gen *Rps11*, que tiene unión circadiana de BMAL1 en su región promotora. Curiosamente, la transcripción de este gen se observa invariable a los 2 tiempos observados. Sin embargo, en la región correspondiente al intrón 3 se observa transcripción en el mismo sentido de *Rps11* que se encuentra claramente favorecida durante el ZT7 (Figura 39A). Este transcrito corresponde al gen *Snord35b* (Figura 40), que previamente se ha reportado [169] pertenece a un grupo de snoRNAs circadianos involucrados en la maduración de rRNAs. Esta interacción solo es significativa en el grupo control al ZT6. De manera interesante el gen *Rps11* no parece transcribirse de manera circadiana, aunque la unión de BMAL1 ocurre en su región promotora y no sobre el gen *Snord35b*.

La segunda interacción encontrada (Figura 39B) abarca parte del gen *Aldh16a1*, y contiene una región accesible a la DNAsa con las características epigenéticas propias de un elemento enhancer, además de la unión de BMAL1 durante el ZT8. Esta región se encuentra en el exón

4 del gen *Aldh16a1*. Aunque comúnmente los enhancer intragénicos se encuentran en regiones intrónicas, se sabe que también algunos colocalizan con exones de genes codificantes [170]. Se observa también en el GRO-seq que la región genera transcrito antisentido al gen *Aldh16a1*, sin embargo, contrario a lo esperado se observan niveles más altos de transcripción durante el ZT19.

Mientras que la transcripción de eRNAs en la mayoría de los reportes correlaciona con la actividad del enhancer [171, 172], se ha reportado también que la transcripción del enhancer no es indispensable para su función, y que enhancer activos pueden no presentar transcripción [173]. La mayoría de la evidencia al respecto es durante procesos de desarrollo o diferenciación celular, donde la actividad del enhancer está restringida a un evento. Los genes circadianos requieren mayor dinamismo en su regulación al estar activos durante una fase específica día tras día. En este sentido, se ha reportado para la transcripción circadiana de eRNAs que su fase generalmente correlaciona con la fase del gen más cercano. Se reporta que un 76% de genes circadianos oscilan en fase con menos de 3 horas de diferencia con eRNA's localizados en un rango de 200kb de su sitio de inicio de la transcripción [76]. Sin embargo, en estos reportes no se interpretan los pares enhancer-promotor cuyas fases de transcripción no tienen correlación, además de que no se comprueba que los contactos entre los elementos mencionados ocurran realmente. Se habla además de que los eRNAs circadianos tienden a estar enriquecidos en ciertos motivos de unión de factores de transcripción de acuerdo a su fase de transcripción. Los eRNAs enriquecidos en motivos E-box se encuentran en la fase ZT6-9, mientras que en la fase ZT 18-24 el motivo enriquecido es el RORE [76]. Se ha observado que el motivo RORE de unión de RORs y REV-ERBs está presente en muchos de los enhancers circadianos particularmente aquellos con fase transcripcional ZT22 [128], es posible por lo tanto que esta región pueda estar regulada adicionalmente por estos factores transcripcionales lo cual pueda alterar su fase transcripcional.

Interesantemente, al revisar la unión de REV-ERB $\alpha$  a ZT10 (Figura 43A) en este contacto [174], se observa que en la región de unión de BMAL1 también se une REV-ERB  $\alpha$ . Esto podría explicar lo observado en los análisis de GRO-seq, que muestran que la transcripción es mayor durante el ZT19 (fase de los eRNA regulados por motivos RORE [76]). La

ocurrencia de esta interacción cuya actividad transcripcional está favorecida durante la fase opuesta a *Dbp* se desconoce [175, 176]. En esta misma línea, los enhancer regulados por REV-ERB $\alpha$  interactúan preferencialmente con sus promotores blanco durante la fase correspondiente al periodo de menor unión de REV-ERB  $\alpha$  a la cromatina, ZT22 [128], favoreciendo la transcripción de dichos genes durante esta fase que es corresponde a la de menor actividad transcripcional de *Dbp*.

La colocalización de estos dos factores transcripcionales ha sido reportada anteriormente para un tipo de regulación denominada represión facilitada, en la cual REV-ERB  $\alpha$  requiere del reclutamiento de factores como CLOCK/BMAL1 o ROR  $\alpha$  para volver accesibles sus sitios de unión y ser reclutado a la cromatina [177].

Esta interacción es interesante también debido a que coincide con lo que se ha reportado previamente, contrario a lo esperado únicamente un 26% de los sitios de unión de CLOCK/BMAL1 tienen transcripción circadiana en fase con la unión de estos factores e importantemente el 38% presentan transcripción durante la fase opuesta [178].

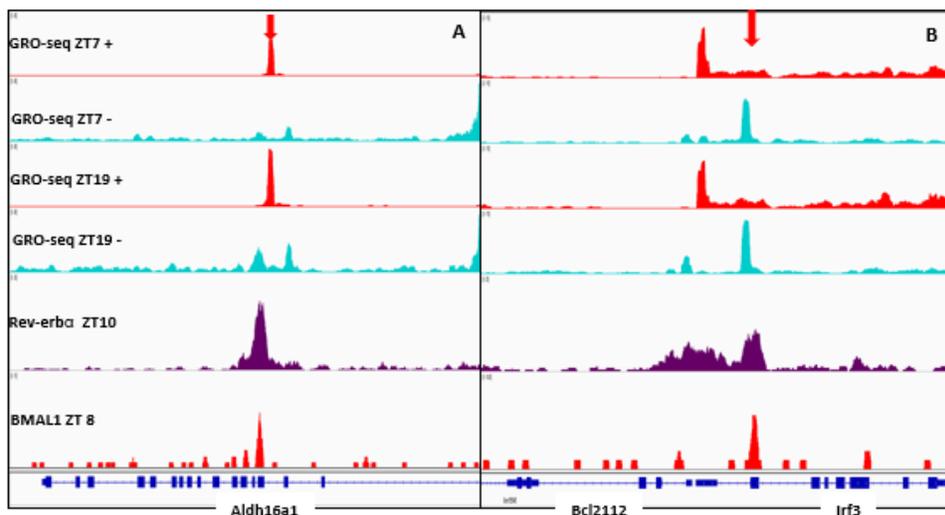


Figura 26 - Colocalización de *BMAL1/Rev-erba*.

Las interacciones 2 y 8, se muestran los tracks de GRO-seq del ZT y 19 además de la unión de BMAL1 ZT6 y Rev-erba ZT10.

En este trabajo, resulta muy interesante la detección de nuevos contactos formados ente el locus de *Dbp* y regiones adyacentes, específicamente en los animales obesos. La primera de estas corresponde a la interacción 7 mostrada en la figura 41A, se localiza en el extremo 3'

UTR del gen *Akt1s1* y el promotor de *Pnkp*. Se observa transcripción naciente antisentido del gen *Akt1s1*. Por la región y las características de cromatina de la región, podría corresponder a un elemento enhancer. Aunque la presencia de H3K4me3 no es canónica en estos elementos, se ha reportado que algunos enhancers activos sí presentan esta característica [184, 185].

La interacción 8 (Figura 41B), también únicamente en el grupo HF6, sobrelapa con el gen *lrf3*, y en su intrón 1 se observa hipersensibilidad a la DNAsa, así como unión de BMAL1 en el ZT6. Los niveles de monometilación y trimetilación de H3K4 son muy similares y se observa transcrito antisentido a *lrf3*, como ocurre en la interacción 2 parece haber más transcripción antisentido durante el ZT19 que en el 7. Al revisar la unión de REV-ERB  $\alpha$ , se observó algo similar a lo descrito para interacción 2 (Figura 42).

La tercera interacción de este grupo sobrelapa con el gen *Fgf21* (Figura 41C). Este contacto es de particular interés debido a que *Fgf21* pertenece a la familia de factores de crecimiento, y los tejidos que lo producen mayormente son metabólicamente activos, incluyendo los tejidos adiposos y el hígado. Juega un papel en el metabolismo energético, y se ha visto que en condiciones de ayuno el hígado secreta este factor a la circulación [179]. Adicionalmente, en ratones alimentados con dieta cetogénica, la cual promueve la oxidación lipídica como fuente de energía, se observa un aumento de hasta 25 veces en los niveles de *Fgf21* [180]. Particularmente, la administración intravenosa de FGF21 en ratones ob/ob y db/db, disminuye los niveles de glucosa y triglicéridos séricos [181]. Además, ratones transgénicos que sobreexpresan *Fgf21* tienen peso significativamente menor a los ratones WT, y menores niveles de glucosa en sangre. Interesantemente, al analizar el tejido adiposo se observó que tenían mayores niveles de grasa marrón y menores niveles de tejido adiposo blanco subcutáneo así como menor acumulación de grasa en el hígado [181]. En cuanto a su regulación transcripcional en hígado, el factor más estudiado que regula la expresión de *Fgf21* es PPAR $\alpha$ . El bezafibrato, un agonista de PPAR $\alpha$ , incrementa significativamente los niveles de mRNA de *Fgf21* en hepatocitos [180]. Además, ratones KO para PPAR $\alpha$  muestran niveles muy disminuidos de FGF21 en condiciones normales y de ayuno [180]. Interesantemente, se ha mostrado que la función de PPAR $\alpha$  tiene un componente circadiano ya que la administración del agonista bezafibrato solo incrementa los niveles de FGF21 al

ser administrado al ZT14 y no al ZT2 [182]. Otro factor transcripcional que se ha visto involucrado en la regulación de *Fgf21* es ChREPB [183]. Los datos de GRO-seq para este gen muestran claras diferencias en su transcripción naciente, estando favorecida durante el ZT7. La formación de este contacto en HFD ZT6 es interesante, ya que se ha reportado en modelos de obesidad inducida por la dieta el aumento en los niveles de PPAR $\alpha$  así como la adquisición de ritmicidad en elementos regulados por este factor transcripcional[140]. Adicionalmente, ChREBP muestra también un incremento en sus niveles de transcripción en condiciones de obesidad inducida por la dieta [140]. Este hecho junto con la observación de enriquecimiento de la H3K4me sobre la H3K4me3 en la región promotora de *Fgf21* hacen esta interacción interesante para el estudio de su posible implicación en la regulación de *Dbp* en condiciones de obesidad a través de asas de cromatina.

Por último la interacción 10 sobrelapa con una región intergénica (Figura 41D) que presenta accesibilidad en el track de DNase-seq, y está enriquecida H3K4me1 y P300. Además, en parte de la región se observa también unión de BMAL1. A nivel de transcripción, se observa transcripción bidireccional que parece estar enriquecida durante el ZT7, la ganancia de esta interacción en la condición HFD podría favorecer su transcripción, por lo observado en el GRO-seq la actividad de esta región está favorecida en la fase diurna lo cual es acorde a la fase de *Dbp*[184, 185].

Es interesante remarcar que seis de las ocho interacciones encontradas muestran unión de BMAL1 (1, 2, 4, 7, 8 y 9). Adicionalmente, dos de estas se localizan en promotores (1 y 8) y las demás en regiones intergénicas. Esto concuerda con lo reportado previamente [2, 186], ya que se propone que se da una congregación espacial al interior del núcleo celular de secuencias reguladas de manera circadiana (promotores) durante la fase transcripcional de los genes involucrados en estos contactos, los cuales disminuyen su frecuencia de interacción en la fase opuesta y transcripcionalmente silente. Adicionalmente, algunas de estas secuencias muestran transcripción en fase con *Dbp* (consistente también con [2, 76, 140]) mientras que otras (2 y 6) muestran niveles más elevados de transcripción en la fase opuesta pese a que presentan unión de BMAL1. Todas estas interacciones descritas en nuestro trabajo podrían regular la transcripción de *Dbp*, tanto sus niveles transcripcionales como en su fase de transcripción a lo largo del ciclo circadiano, y de manera diferencial en respuesta a distintos

estados metabólicos, aunque su papel necesita ser corroborado para poder asegurarlo. Sin embargo, considero que este trabajo es una primera aproximación para entender cómo el metabolismo celular señala a la cromatina para generar respuestas en programas de expresión génica y, en este caso, a través de la formación de interacciones específicas entre genes concretos y elementos regulatorios para coordinar una respuesta adecuada.

## 9. Conclusiones

- El efecto de una dieta alta en grasa durante 12 semanas genera parámetros metabólicos alterados (obesidad, aumento en la glicemia y resistencia a la insulina).
- Los niveles de mRNA para *Dbp* oscilan de acuerdo a lo reportado previamente, presentando un incremento en sus niveles al ZT6 en los animales alimentados con la dieta alta en grasas.
- A nivel de pre mRNA se observa que los niveles de transcrito naciente al ZT6 son mayores en el grupo control.
- El protocolo implementado para la técnica de 4C genera resultados confiables de acuerdo a la homogeneidad en los datos obtenidos entre los distintos replicados biológicos.
- En el hígado de ratón, el análisis de interacciones entre el gen *Dbp* y secuencias del genoma a distancia revela claras diferencias entre los dos tiempos analizados, estando favorecidas durante la fase transcripcional de *Dbp* (ZT6) independientemente del tipo de dieta.
- Existen 3 escenarios para las interacciones detectadas: 1) Interacciones que permanecen constantes a ZT6, independientemente del tipo de dieta, 2) interacciones específicas de *Dbp* con elementos reguladores en hígados de ratones sanos y 3) interacciones específicas de *Dbp* con elementos reguladores en hígados de ratones obesos.

## 10. Perspectivas:

- Determinación de la unión de BMAL1 en regiones reguladoras de *Dbp* e interacciones encontradas con unión previamente reportada en animales con dieta control y alta en grasas.
- Análisis de motivos de CTCF y su direccionalidad para explicar mejor la formación de interacciones.
- Análisis en *trans* de los datos de 4C-seq para determinación del panorama de interacciones a lo largo de todo el genoma con los datos obtenidos en este estudio.
- Generación de datos circadianos de características que den información del estado cromatínico en animales control y con dieta alta en grasas: GRO-seq, ChIP-seq con marcas de cromatina, ATAC-seq, etc.

-Determinación de la función de las interacciones encontradas con particular énfasis en las diferenciales entre las condiciones estudiadas.

## 11. Bibliografía:

1. Mitsui, S., et al., *Antagonistic role of E4BP4 and PAR proteins in the circadian oscillatory mechanism*. *Genes Dev*, 2001. **15**(8): p. 995-1006.
2. Aguilar-Arnal, L., et al., *Cycles in spatial and temporal chromosomal organization driven by the circadian clock*. *Nat Struct Mol Biol*, 2013. **20**(10): p. 1206-13.
3. Lowrey, P.L. and J.S. Takahashi, *Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization*. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2004. **5**: p. 407-41.
4. Maniscalco, M., et al., *Light-dependent expression of four cryptic archaeal circadian gene homologs*. *Front Microbiol*, 2014. **5**: p. 79.
5. Pittendrigh, C.S., *The photoperiodic phenomena: seasonal modulation of the "day within"*. *J Biol Rhythms*, 1988. **3**(2): p. 173-88.
6. Wulund, L.a.R.B.A., *A brief history of circadian time: The emergence of redox oscillations as a novel component of biological rhythms*. *Perspectives in Science*, 2015(6): p. 27-37.
7. Aschoff, J., *[Daily periodicity in mice strains under constant environmental conditions]*. *Pflugers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere*, 1955. **262**(1): p. 51-9.
8. De Mairan, J.J., *Observation botanique*. *Histoire de l'Académie royale des sciences avec les mémoires de mathématique et de physique tirés des registres de cette Académie*, 1729: p. 35-36.
9. Albrecht, U., *The circadian clock*. *Protein reviews*. 2009, New York, NY: Springer Science+Business Media, LLC. xi, 300 p.
10. Pittendrigh, C.S., *Circadian rhythms and the circadian organization of living systems*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1960. **25**: p. 159-84.
11. Pittendrigh, C.S., *Circadian rhythms and the circadian organization of living systems*. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 1960. **25**: p. 159 - 184.
12. Tannenbaum, G.S. and J.B. Martin, *Evidence for an endogenous ultradian rhythm governing growth hormone secretion in the rat*. *Endocrinology*, 1976. **98**(3): p. 562-70.
13. Gachon, F., et al., *The mammalian circadian timing system: from gene expression to physiology*. *Chromosoma*, 2004. **113**(3): p. 103-12.
14. Bains, R.S., et al., *Assessing mouse behaviour throughout the light/dark cycle using automated in-cage analysis tools*. *J Neurosci Methods*, 2018. **300**: p. 37-47.
15. Krzeptowski, W., G. Hess, and E. Pyza, *Circadian Plasticity in the Brain of Insects and Rodents*. *Front Neural Circuits*, 2018. **12**: p. 32.
16. Chen, L. and G. Yang, *Recent advances in circadian rhythms in cardiovascular system*. *Front Pharmacol*, 2015. **6**: p. 71.
17. Benstaali, C., et al., *Circadian rhythms of body temperature and motor activity in rodents their relationships with the light-dark cycle*. *Life Sci*, 2001. **68**(24): p. 2645-56.
18. Kalsbeek, A., S. la Fleur, and E. Fliers, *Circadian control of glucose metabolism*. *Mol Metab*, 2014. **3**(4): p. 372-83.
19. Gnocchi, D. and G. Bruscalupi, *Circadian Rhythms and Hormonal Homeostasis: Pathophysiological Implications*. *Biology (Basel)*, 2017. **6**(1).
20. Sharma, V.K., *Adaptive significance of circadian clocks*. *Chronobiol Int*, 2003. **20**(6): p. 901-19.
21. DeBruyne, J.P., D.R. Weaver, and S.M. Reppert, *Peripheral circadian oscillators require CLOCK*. *Curr Biol*, 2007. **17**(14): p. R538-9.
22. Yamazaki, S., et al., *Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats*. *Science*, 2000. **288**(5466): p. 682-5.

23. Reinke, H. and G. Asher, *Circadian Clock Control of Liver Metabolic Functions*. *Gastroenterology*, 2016. **150**(3): p. 574-80.
24. Laermans, J. and I. Depoortere, *Chronobesity: role of the circadian system in the obesity epidemic*. *Obes Rev*, 2016. **17**(2): p. 108-25.
25. Ralph, M.R., et al., *Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period*. *Science*, 1990. **247**(4945): p. 975-8.
26. Preitner, N., et al., *The orphan nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator*. *Cell*, 2002. **110**(2): p. 251-60.
27. Golombek, D.A. and R.E. Rosenstein, *Physiology of circadian entrainment*. *Physiol Rev*, 2010. **90**(3): p. 1063-102.
28. Lazzarini Ospri, L., G. Prusky, and S. Hattar, *Mood, the Circadian System, and Melanopsin Retinal Ganglion Cells*. *Annu Rev Neurosci*, 2017. **40**: p. 539-556.
29. Panda, S., et al., *Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting*. *Science*, 2002. **298**(5601): p. 2213-6.
30. Berson, D.M., F.A. Dunn, and M. Takao, *Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock*. *Science*, 2002. **295**(5557): p. 1070-3.
31. Schmidt, T.M., et al., *Melanopsin-positive intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: from form to function*. *J Neurosci*, 2011. **31**(45): p. 16094-101.
32. Altimus, C.M., et al., *Rod photoreceptors drive circadian photoentrainment across a wide range of light intensities*. *Nat Neurosci*, 2010. **13**(9): p. 1107-12.
33. Walmsley, L., et al., *Colour as a signal for entraining the mammalian circadian clock*. *PLoS Biol*, 2015. **13**(4): p. e1002127.
34. Welsh, D.K., et al., *Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms*. *Neuron*, 1995. **14**(4): p. 697-706.
35. Moore, R.Y. and J.C. Speh, *GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system*. *Neurosci Lett*, 1993. **150**(1): p. 112-6.
36. Liu, C. and S.M. Reppert, *GABA synchronizes clock cells within the suprachiasmatic circadian clock*. *Neuron*, 2000. **25**(1): p. 123-8.
37. Balsalobre, A., et al., *Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling*. *Science*, 2000. **289**(5488): p. 2344-7.
38. Kon, N., et al., *Activation of TGF-beta/activin signalling resets the circadian clock through rapid induction of Dec1 transcripts*. *Nat Cell Biol*, 2008. **10**(12): p. 1463-9.
39. Zhdanova, I.V. and V. Tucci, *Melatonin, Circadian Rhythms, and Sleep*. *Curr Treat Options Neurol*, 2003. **5**(3): p. 225-229.
40. Redman, J.R. and S.M. Armstrong, *Reentrainment of rat circadian activity rhythms: effects of melatonin*. *J Pineal Res*, 1988. **5**(2): p. 203-15.
41. Carneiro, B.T. and J.F. Araujo, *Food entrainment: major and recent findings*. *Front Behav Neurosci*, 2012. **6**: p. 83.
42. Husse, J., G. Eichele, and H. Oster, *Synchronization of the mammalian circadian timing system: Light can control peripheral clocks independently of the SCN clock: alternate routes of entrainment optimize the alignment of the body's circadian clock network with external time*. *Bioessays*, 2015. **37**(10): p. 1119-28.
43. Storch, K.F. and C.J. Weitz, *Daily rhythms of food-anticipatory behavioral activity do not require the known circadian clock*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(16): p. 6808-13.
44. Stephan, F.K., *Phase shifts of circadian rhythms in activity entrained to food access*. *Physiol Behav*, 1984. **32**(4): p. 663-71.

45. Izumo, M., et al., *Differential effects of light and feeding on circadian organization of peripheral clocks in a forebrain Bmal1 mutant*. Elife, 2014. **3**.
46. Damiola, F., et al., *Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus*. Genes Dev, 2000. **14**(23): p. 2950-61.
47. Reppert, S.M. and W.J. Schwartz, *Maternal coordination of the fetal biological clock in utero*. Science, 1983. **220**(4600): p. 969-71.
48. Davis, F.C. and R.A. Gorski, *Development of hamster circadian rhythms: role of the maternal suprachiasmatic nucleus*. J Comp Physiol A, 1988. **162**(5): p. 601-10.
49. Mistlberger, R.E. and D.J. Skene, *Social influences on mammalian circadian rhythms: animal and human studies*. Biol Rev Camb Philos Soc, 2004. **79**(3): p. 533-56.
50. Zambon, A.C., et al., *Time- and exercise-dependent gene regulation in human skeletal muscle*. Genome Biol, 2003. **4**(10): p. R61.
51. Green, C.B., J.S. Takahashi, and J. Bass, *The meter of metabolism*. Cell, 2008. **134**(5): p. 728-42.
52. Takahashi, J.S., *Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock*. Nat Rev Genet, 2017. **18**(3): p. 164-179.
53. Koike, N., et al., *Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals*. Science, 2012. **338**(6105): p. 349-54.
54. Partch, C.L., C.B. Green, and J.S. Takahashi, *Molecular architecture of the mammalian circadian clock*. Trends Cell Biol, 2014. **24**(2): p. 90-9.
55. Lee, C., et al., *Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock*. Cell, 2001. **107**(7): p. 855-67.
56. Shirogane, T., et al., *SCFbeta-TRCP controls clock-dependent transcription via casein kinase 1-dependent degradation of the mammalian period-1 (Per1) protein*. J Biol Chem, 2005. **280**(29): p. 26863-72.
57. Godinho, S.I., et al., *The after-hours mutant reveals a role for Fbxl3 in determining mammalian circadian period*. Science, 2007. **316**(5826): p. 897-900.
58. Guillaumond, F., et al., *Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors*. J Biol Rhythms, 2005. **20**(5): p. 391-403.
59. Sato, T.K., et al., *A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock*. Neuron, 2004. **43**(4): p. 527-37.
60. Feng, D., et al., *A circadian rhythm orchestrated by histone deacetylase 3 controls hepatic lipid metabolism*. Science, 2011. **331**(6022): p. 1315-9.
61. Yamaguchi, S., et al., *Role of DBP in the circadian oscillatory mechanism*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(13): p. 4773-81.
62. Gachon, F., *Physiological function of PARbZip circadian clock-controlled transcription factors*. Ann Med, 2007. **39**(8): p. 562-71.
63. Newman, J.R. and A.E. Keating, *Comprehensive identification of human bZIP interactions with coiled-coil arrays*. Science, 2003. **300**(5628): p. 2097-101.
64. Kondratov, R.V., et al., *Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock*. Genes Dev, 2006. **20**(14): p. 1868-73.
65. Gachon, F., et al., *The circadian PAR-domain basic leucine zipper transcription factors DBP, TEF, and HLF modulate basal and inducible xenobiotic detoxification*. Cell Metab, 2006. **4**(1): p. 25-36.
66. Wuarin, J., et al., *The role of the transcriptional activator protein DBP in circadian liver gene expression*. J Cell Sci Suppl, 1992. **16**: p. 123-7.

67. Ripperger, J.R.A. and U. Schibler, *Rhythmic CLOCK-BMAL1 binding to multiple E-box motifs drives circadian Dbp transcription and chromatin transitions*. Nature Genetics, 2006. **38**(3): p. 369-374.
68. Lopez-Molina, L., et al., *The DBP gene is expressed according to a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus and influences circadian behavior*. EMBO J, 1997. **16**(22): p. 6762-71.
69. Ripperger, J.A., et al., *CLOCK, an essential pacemaker component, controls expression of the circadian transcription factor DBP*. Genes Dev, 2000. **14**(6): p. 679-89.
70. Schibler, U., J. Ripperger, and S.A. Brown, *Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food*. J Biol Rhythms, 2003. **18**(3): p. 250-60.
71. Mitra, V.M., Jane., *Metabolic functions of the liver*. Anaesthesia and intensive care medicine, 2009. **10**(7).
72. Tahara, Y. and S. Shibata, *Circadian rhythms of liver physiology and disease: experimental and clinical evidence*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2016. **13**(4): p. 217-26.
73. Grant, D.M., *Detoxification pathways in the liver*. J Inher Metab Dis, 1991. **14**(4): p. 421-30.
74. Song, L. and G.E. Crawford, *DNase-seq: a high-resolution technique for mapping active gene regulatory elements across the genome from mammalian cells*. Cold Spring Harb Protoc, 2010. **2010**(2): p. pdb prot5384.
75. Sobel, J.A., et al., *Transcriptional regulatory logic of the diurnal cycle in the mouse liver*. PLoS Biol, 2017. **15**(4): p. e2001069.
76. Fang, B., et al., *Circadian enhancers coordinate multiple phases of rhythmic gene transcription in vivo*. Cell, 2014. **159**(5): p. 1140-1152.
77. Le Martelot, G., et al., *Genome-wide RNA polymerase II profiles and RNA accumulation reveal kinetics of transcription and associated epigenetic changes during diurnal cycles*. PLoS Biol, 2012. **10**(11): p. e1001442.
78. Bowman, G.D. and M.G. Poirier, *Post-translational modifications of histones that influence nucleosome dynamics*. Chem Rev, 2015. **115**(6): p. 2274-95.
79. Feng, D. and M.A. Lazar, *Clocks, metabolism, and the epigenome*. Mol Cell, 2012. **47**(2): p. 158-67.
80. Etchegaray, J.P., et al., *Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock*. Nature, 2003. **421**(6919): p. 177-82.
81. Doi, M., J. Hirayama, and P. Sassone-Corsi, *Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase*. Cell, 2006. **125**(3): p. 497-508.
82. Hardin, P.E. and W. Yu, *Circadian transcription: passing the HAT to CLOCK*. Cell, 2006. **125**(3): p. 424-6.
83. Nakahata, Y., et al., *The NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control*. Cell, 2008. **134**(2): p. 329-40.
84. Peleg, S., et al., *The Metabolic Impact on Histone Acetylation and Transcription in Ageing*. Trends Biochem Sci, 2016. **41**(8): p. 700-711.
85. Ramsey, K.M., et al., *Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD<sup>+</sup> biosynthesis*. Science, 2009. **324**(5927): p. 651-4.
86. Nakahata, Y., et al., *Circadian control of the NAD<sup>+</sup> salvage pathway by CLOCK-SIRT1*. Science, 2009. **324**(5927): p. 654-7.
87. Eckel-Mahan, K.L., et al., *Reprogramming of the circadian clock by nutritional challenge*. Cell, 2013. **155**(7): p. 1464-78.
88. Etchegaray, J.P., et al., *The polycomb group protein EZH2 is required for mammalian circadian clock function*. J Biol Chem, 2006. **281**(30): p. 21209-15.

89. Cremer, T. and M. Cremer, *Chromosome territories*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(3): p. a003889.
90. Cremer, M., et al., *Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells*. Chromosome Res, 2001. **9**(7): p. 541-67.
91. Branco, M.R. and A. Pombo, *Intermingling of chromosome territories in interphase suggests role in translocations and transcription-dependent associations*. PLoS Biol, 2006. **4**(5): p. e138.
92. Lieberman-Aiden, E., et al., *Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome*. Science, 2009. **326**(5950): p. 289-93.
93. Dixon, J.R., et al., *Chromatin architecture reorganization during stem cell differentiation*. Nature, 2015. **518**(7539): p. 331-6.
94. Rada-Iglesias, A., F.G. Grosveld, and A. Papantonis, *Forces driving the three-dimensional folding of eukaryotic genomes*. Mol Syst Biol, 2018. **14**(6): p. e8214.
95. Hnisz, D., et al., *A Phase Separation Model for Transcriptional Control*. Cell, 2017. **169**(1): p. 13-23.
96. Shen, Y., et al., *A map of the cis-regulatory sequences in the mouse genome*. Nature, 2012. **488**(7409): p. 116-20.
97. Rao, S.S., et al., *A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping*. Cell, 2014. **159**(7): p. 1665-80.
98. Guo, Y., et al., *CRISPR Inversion of CTCF Sites Alters Genome Topology and Enhancer/Promoter Function*. Cell, 2015. **162**(4): p. 900-10.
99. Lupianez, D.G., et al., *Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions*. Cell, 2015. **161**(5): p. 1012-1025.
100. Williamson, I., et al., *Shh and ZRS enhancer colocalisation is specific to the zone of polarising activity*. Development, 2016. **143**(16): p. 2994-3001.
101. Thormann, V., et al., *Genomic dissection of enhancers uncovers principles of combinatorial regulation and cell type-specific wiring of enhancer-promoter contacts*. Nucleic Acids Res, 2018. **46**(6): p. 3258.
102. Haarhuis, J.H.I., et al., *The Cohesin Release Factor WAPL Restricts Chromatin Loop Extension*. Cell, 2017. **169**(4): p. 693-707 e14.
103. Jackson, D.A., et al., *Visualization of focal sites of transcription within human nuclei*. EMBO J, 1993. **12**(3): p. 1059-65.
104. Iborra, F.J., et al., *Active RNA polymerases are localized within discrete transcription 'factories' in human nuclei*. J Cell Sci, 1996. **109** ( Pt 6): p. 1427-36.
105. Melnik, S., et al., *The proteomes of transcription factories containing RNA polymerases I, II or III*. Nat Methods, 2011. **8**(11): p. 963-8.
106. Osborne, C.S., et al., *Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription*. Nat Genet, 2004. **36**(10): p. 1065-71.
107. Lomvardas, S., et al., *Interchromosomal interactions and olfactory receptor choice*. Cell, 2006. **126**(2): p. 403-13.
108. Monahan, K., A. Horta, and S. Lomvardas, *LHX2- and LDB1-mediated trans interactions regulate olfactory receptor choice*. Nature, 2019.
109. Spilianakis, C.G., et al., *Interchromosomal associations between alternatively expressed loci*. Nature, 2005. **435**(7042): p. 637-45.
110. Schoenfelder, S., et al., *Preferential associations between co-regulated genes reveal a transcriptional interactome in erythroid cells*. Nat Genet, 2010. **42**(1): p. 53-61.
111. Sexton, T. and G. Cavalli, *The role of chromosome domains in shaping the functional genome*. Cell, 2015. **160**(6): p. 1049-59.

112. Barbieri, M., et al., *Polymer models of chromatin organization*. *Front Genet*, 2013. **4**: p. 113.
113. Denker, A. and W. de Laat, *The second decade of 3C technologies: detailed insights into nuclear organization*. *Genes Dev*, 2016. **30**(12): p. 1357-82.
114. Fullwood, M.J., et al., *An oestrogen-receptor-alpha-bound human chromatin interactome*. *Nature*, 2009. **462**(7269): p. 58-64.
115. Li, G., et al., *Extensive promoter-centered chromatin interactions provide a topological basis for transcription regulation*. *Cell*, 2012. **148**(1-2): p. 84-98.
116. Diao, Y., et al., *A tiling-deletion-based genetic screen for cis-regulatory element identification in mammalian cells*. *Nat Methods*, 2017. **14**(6): p. 629-635.
117. Dao, L.T.M., et al., *Genome-wide characterization of mammalian promoters with distal enhancer functions*. *Nat Genet*, 2017. **49**(7): p. 1073-1081.
118. Medina-Rivera, A., et al., *Widespread Enhancer Activity from Core Promoters*. *Trends Biochem Sci*, 2018. **43**(6): p. 452-468.
119. Passarge, E., *Emil Heitz and the concept of heterochromatin: longitudinal chromosome differentiation was recognized fifty years ago*. *Am J Hum Genet*, 1979. **31**(2): p. 106-15.
120. Monneron, A. and W. Bernhard, *Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells*. *J Ultrastruct Res*, 1969. **27**(3): p. 266-88.
121. Belmont, A.S., Y. Zhai, and A. Thilenius, *Lamin B distribution and association with peripheral chromatin revealed by optical sectioning and electron microscopy tomography*. *J Cell Biol*, 1993. **123**(6 Pt 2): p. 1671-85.
122. Dekker, J. and T. Misteli, *Long-Range Chromatin Interactions*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015. **7**(10): p. a019356.
123. Giorgetti, L. and E. Heard, *Closing the loop: 3C versus DNA FISH*. *Genome Biol*, 2016. **17**(1): p. 215.
124. Dekker, J., et al., *Capturing chromosome conformation*. *Science*, 2002. **295**(5558): p. 1306-11.
125. van de Werken, H.J., et al., *Robust 4C-seq data analysis to screen for regulatory DNA interactions*. *Nat Methods*, 2012. **9**(10): p. 969-72.
126. Splinter, E., et al., *Determining long-range chromatin interactions for selected genomic sites using 4C-seq technology: from fixation to computation*. *Methods*, 2012. **58**(3): p. 221-30.
127. Brouwer, R.W.W., et al., *Unbiased Interrogation of 3D Genome Topology Using Chromosome Conformation Capture Coupled to High-Throughput Sequencing (4C-Seq)*, in *Eukaryotic Transcriptional and Post-Transcriptional Gene Expression Regulation*, N. Wajapeyee and R. Gupta, Editors. 2017, Springer New York: New York, NY. p. 199-220.
128. Kim, Y.H., et al., *Rev-erbalpha dynamically modulates chromatin looping to control circadian gene transcription*. *Science*, 2018. **359**(6381): p. 1274-1277.
129. Aguilar-Arnal, L. and P. Sassone-Corsi, *Chromatin landscape and circadian dynamics: Spatial and temporal organization of clock transcription*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(22): p. 6863-70.
130. Menet, J.S., S. Pescatore, and M. Rosbash, *CLOCK:BMAL1 is a pioneer-like transcription factor*. *Genes Dev*, 2014. **28**(1): p. 8-13.
131. Yeung, J., et al., *Transcription factor activity rhythms and tissue-specific chromatin interactions explain circadian gene expression across organs*. *Genome Res*, 2018. **28**(2): p. 182-191.
132. Ayala, J.E., et al., *Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice*. *Dis Model Mech*, 2010. **3**(9-10): p. 525-34.

133. Zhou, B., et al., *CLOCK/BMAL1 regulates circadian change of mouse hepatic insulin sensitivity by SIRT1*. Hepatology, 2014. **59**(6): p. 2196-206.
134. Schwartz, M., et al., *Comparative analysis of T4 DNA ligases and DNA polymerases used in chromosome conformation capture assays*. Biotechniques, 2015. **58**(4): p. 195-9.
135. Morgan, M., et al., *ShortRead: a bioconductor package for input, quality assessment and exploration of high-throughput sequence data*. Bioinformatics, 2009. **25**(19): p. 2607-8.
136. Li, H. and R. Durbin, *Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform*. Bioinformatics, 2009. **25**(14): p. 1754-60.
137. Quinlan, A.R. and I.M. Hall, *BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features*. Bioinformatics, 2010. **26**(6): p. 841-2.
138. Thongjuea, S., et al., *r3Cseq: an R/Bioconductor package for the discovery of long-range genomic interactions from chromosome conformation capture and next-generation sequencing data*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(13): p. e132.
139. Robinson, J.T., et al., *Integrative genomics viewer*. Nat Biotechnol, 2011. **29**(1): p. 24-6.
140. Guan, D., et al., *Diet-Induced Circadian Enhancer Remodeling Synchronizes Opposing Hepatic Lipid Metabolic Processes*. Cell, 2018. **174**(4): p. 831-842 e12.
141. Weichhart, T., *mTor : methods and protocols*. Methods in molecular biology,. 2012, New York: Humana Press. xiii, 464 p.
142. Wang, C.Y. and J.K. Liao, *A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance*. Methods Mol Biol, 2012. **821**: p. 421-33.
143. Stratmann, M., et al., *Circadian Dbp transcription relies on highly dynamic BMAL1-CLOCK interaction with E boxes and requires the proteasome*. Mol Cell, 2012. **48**(2): p. 277-87.
144. Murakami, M., et al., *Gut microbiota directs PPARgamma-driven reprogramming of the liver circadian clock by nutritional challenge*. EMBO Rep, 2016. **17**(9): p. 1292-303.
145. Ripperger, J.A. and U. Schibler, *Rhythmic CLOCK-BMAL1 binding to multiple E-box motifs drives circadian Dbp transcription and chromatin transitions*. Nat Genet, 2006. **38**(3): p. 369-74.
146. Green, C.B., *Circadian Posttranscriptional Regulatory Mechanisms in Mammals*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018. **10**(6).
147. Hosoda, H., et al., *CBP/p300 is a cell type-specific modulator of CLOCK/BMAL1-mediated transcription*. Mol Brain, 2009. **2**: p. 34.
148. Harlen, K.M., et al., *Comprehensive RNA Polymerase II Interactomes Reveal Distinct and Varied Roles for Each Phospho-CTD Residue*. Cell Rep, 2016. **15**(10): p. 2147-2158.
149. Gheldof, N., et al., *Detecting Long-Range Chromatin Interactions Using the Chromosome Conformation Capture Sequencing (4C-seq) Method*, in *Gene Regulatory Networks: Methods and Protocols*, B. Deplancke and N. Gheldof, Editors. 2012, Humana Press: Totowa, NJ. p. 211-225.
150. Geeven, G., et al., *peakC: a flexible, non-parametric peak calling package for 4C and Capture-C data*. Nucleic Acids Res, 2018. **46**(15): p. e91.
151. Klein, F.A., et al., *FourCSeq: analysis of 4C sequencing data*. Bioinformatics, 2015. **31**(19): p. 3085-91.
152. Montgomery, M.K., et al., *Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding*. Diabetologia, 2013. **56**(5): p. 1129-39.
153. Breslin, W.L., et al., *Weight gain in response to high-fat feeding in CD-1 male mice*. Lab Anim, 2010. **44**(3): p. 231-7.
154. Williams, L.M., et al., *The development of diet-induced obesity and glucose intolerance in C57BL/6 mice on a high-fat diet consists of distinct phases*. PLoS One, 2014. **9**(8): p. e106159.

155. Winzell, M.S. and B. Ahren, *The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes*. *Diabetes*, 2004. **53 Suppl 3**: p. S215-9.
156. Liu, Z., et al., *High-fat diet induces hepatic insulin resistance and impairment of synaptic plasticity*. *PLoS One*, 2015. **10**(5): p. e0128274.
157. Menet, J.S., et al., *Nascent-Seq reveals novel features of mouse circadian transcriptional regulation*. *Elife*, 2012. **1**: p. e00011.
158. Matelot, M. and D. Noordermeer, *Determination of High-Resolution 3D Chromatin Organization Using Circular Chromosome Conformation Capture (4C-seq)*. *Methods Mol Biol*, 2016. **1480**: p. 223-41.
159. Stadhouders, R., et al., *Multiplexed chromosome conformation capture sequencing for rapid genome-scale high-resolution detection of long-range chromatin interactions*. *Nat Protoc*, 2013. **8**(3): p. 509-24.
160. van de Werken, H.J., et al., *4C technology: protocols and data analysis*. *Methods Enzymol*, 2012. **513**: p. 89-112.
161. Raviram, R., et al., *Interpreting 4C-Seq data: how far can we go?* *Epigenomics*, 2014. **6**(5): p. 455-7.
162. Mermet, J., et al., *Clock-dependent chromatin topology modulates circadian transcription and behavior*. *Genes Dev*, 2018. **32**(5-6): p. 347-358.
163. Creyghton, M.P., et al., *Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(50): p. 21931-6.
164. King, A.D., et al., *Reversible Regulation of Promoter and Enhancer Histone Landscape by DNA Methylation in Mouse Embryonic Stem Cells*. *Cell Rep*, 2016. **17**(1): p. 289-302.
165. Guenther, M.G., et al., *A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells*. *Cell*, 2007. **130**(1): p. 77-88.
166. Yan, J., et al., *Histone H3 lysine 4 monomethylation modulates long-range chromatin interactions at enhancers*. *Cell Res*, 2018. **28**(3): p. 387.
167. Dao, L.T.M., et al., *Genome-wide characterization of mammalian promoters with distal enhancer functions*. *Nature Genetics*, 2017. **49**(7): p. 1073-+.
168. Visel, A., et al., *ChIP-seq accurately predicts tissue-specific activity of enhancers*. *Nature*, 2009. **457**(7231): p. 854-8.
169. Aitken, S. and C.A. Semple, *The circadian dynamics of small nucleolar RNA in the mouse liver*. *J R Soc Interface*, 2017. **14**(130).
170. Birnbaum, R.Y., et al., *Coding exons function as tissue-specific enhancers of nearby genes*. *Genome Res*, 2012. **22**(6): p. 1059-68.
171. Wang, D., et al., *Reprogramming transcription by distinct classes of enhancers functionally defined by eRNA*. *Nature*, 2011. **474**(7351): p. 390-4.
172. Arner, E., et al., *Transcribed enhancers lead waves of coordinated transcription in transitioning mammalian cells*. *Science*, 2015. **347**(6225): p. 1010-4.
173. Mikhaylichenko, O., et al., *The degree of enhancer or promoter activity is reflected by the levels and directionality of eRNA transcription*. *Genes Dev*, 2018. **32**(1): p. 42-57.
174. Zhang, Y., et al., *HNF6 and Rev-erbalpha integrate hepatic lipid metabolism by overlapping and distinct transcriptional mechanisms*. *Genes Dev*, 2016. **30**(14): p. 1636-44.
175. Everett, L.J. and M.A. Lazar, *Nuclear receptor Rev-erbalpha: up, down, and all around*. *Trends Endocrinol Metab*, 2014. **25**(11): p. 586-92.
176. Xiong, W., et al., *BMAL1 regulates transcription initiation and activates circadian clock gene expression in mammals*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016. **473**(4): p. 1019-1025.

177. Zhu, B., et al., *Coactivator-Dependent Oscillation of Chromatin Accessibility Dictates Circadian Gene Amplitude via REV-ERB Loading*. Mol Cell, 2015. **60**(5): p. 769-783.
178. Trott, A.J. and J.S. Menet, *Regulation of circadian clock transcriptional output by CLOCK:BMAL1*. PLoS Genet, 2018. **14**(1): p. e1007156.
179. Maratos-Flier, E., *Fatty liver and FGF21 physiology*. Exp Cell Res, 2017. **360**(1): p. 2-5.
180. Badman, M.K., et al., *Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states*. Cell Metab, 2007. **5**(6): p. 426-37.
181. Kharitonov, A., et al., *FGF-21 as a novel metabolic regulator*. J Clin Invest, 2005. **115**(6): p. 1627-35.
182. Oishi, K., D. Uchida, and N. Ishida, *Circadian expression of FGF21 is induced by PPARalpha activation in the mouse liver*. FEBS Lett, 2008. **582**(25-26): p. 3639-42.
183. Iroz, A., et al., *A Specific ChREBP and PPARalpha Cross-Talk Is Required for the Glucose-Mediated FGF21 Response*. Cell Rep, 2017. **21**(2): p. 403-416.
184. Siersbaek, M., et al., *High fat diet-induced changes of mouse hepatic transcription and enhancer activity can be reversed by subsequent weight loss*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 40220.
185. Leung, A., et al., *Open chromatin profiling in mice livers reveals unique chromatin variations induced by high fat diet*. J Biol Chem, 2014. **289**(34): p. 23557-67.
186. Aguilar-Arnal, L. and P. Sassone-Corsi, *Chromatin Dynamics of Circadian Transcription*. Curr Mol Biol Rep, 2015. **1**(1): p. 1-9.

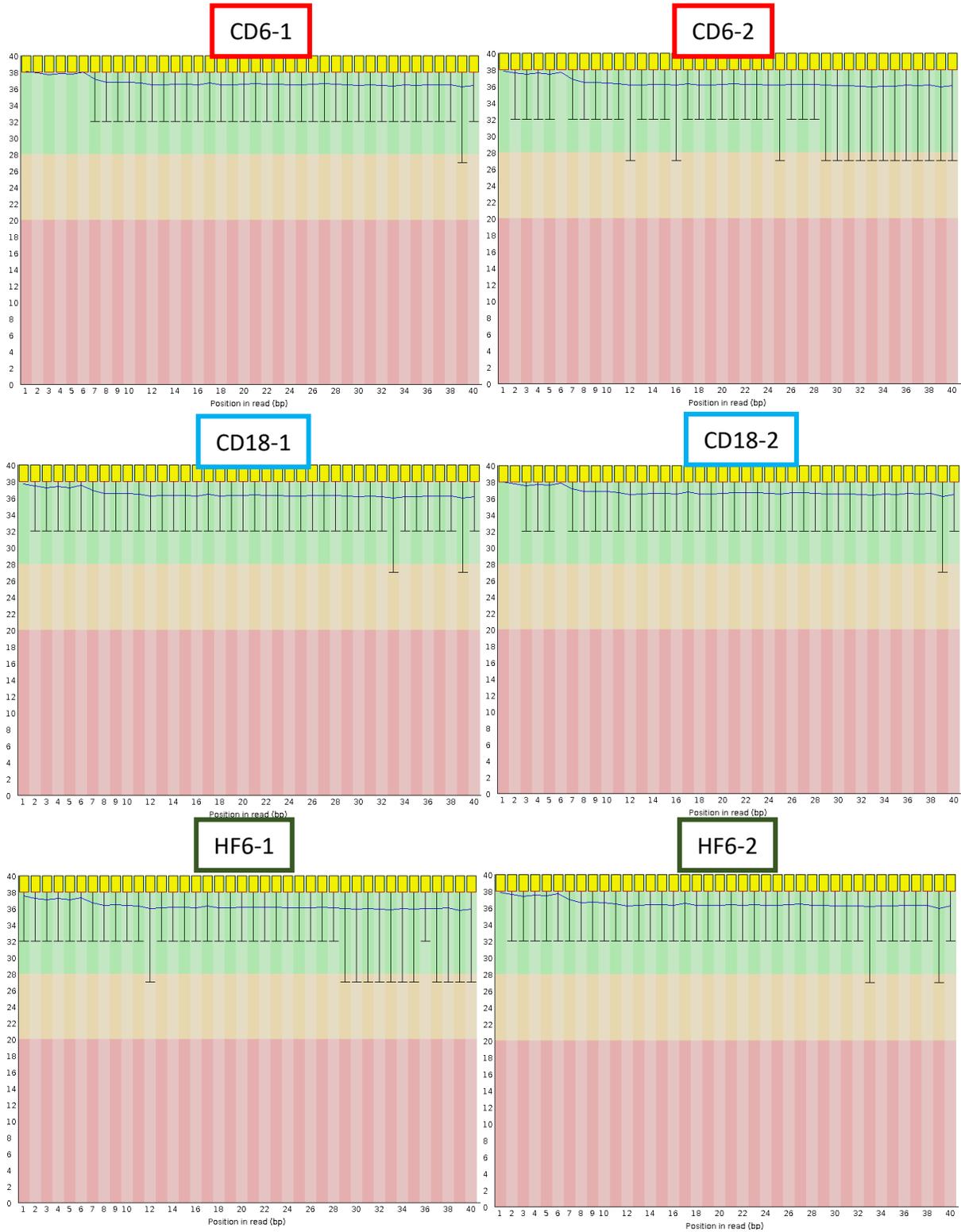
## Anexo 1 – Composición de las dietas

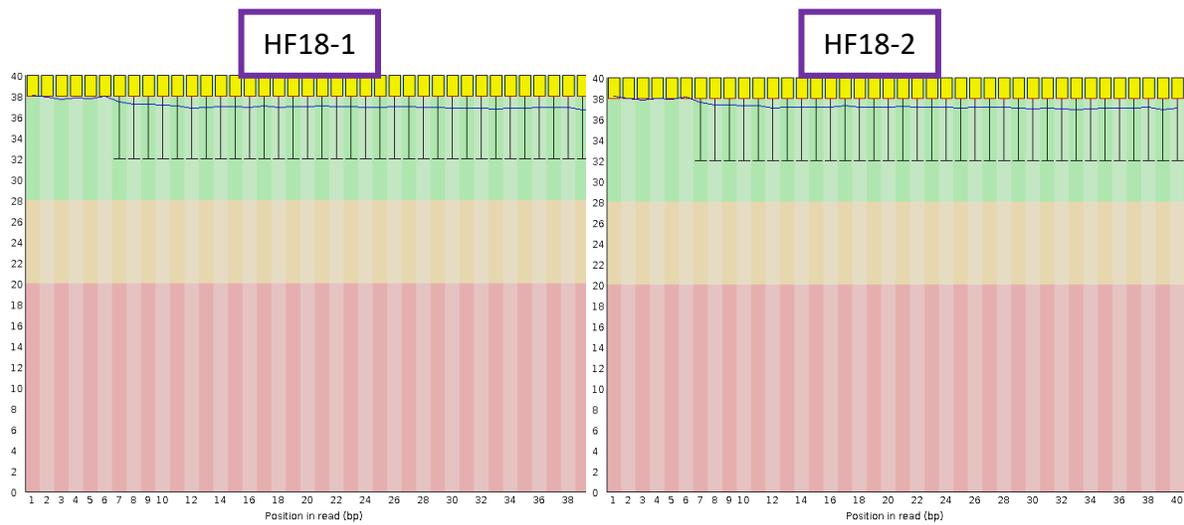
Macronutrientes	%	Densidad energética	% Kcal/g
Proteína cruda	18,6	Proteínas	24
Grasa (extracto de eter)	6,2	Grasas	18
Carbohidratos (disponibles)	44,2	Carbohidratos	58
Fibra cruda	3,5		
Fibra neutra detergente	14,7		
Ceniza	5,3		

Formula	g/Kg	Densidad energética	% Kcal/g
Caseína	216	Proteínas	15
DL-Metionina	2,5	Carbohidratos	31
Maltodextrina	3.007.372	Grasas	53,5
Sacarosa	90,5		
Grasa vegetal hidrogenada	274,1		
Aceite de maíz	16		
Celulosa	53,12		
Mezcla mineral	35		
Carbonato de calcio	5		
Vitamina B12 (0,1% en manitol)	0,0396		
Vitamina E (500 IU/g)	0,323		
Vitamina A (500,000 IU/g)	0,053		
Niacina	0,07		
Pantotenato de calcio	0,0881		
Ácido fólico	0,0026		
Vitamina D3 (500,000 IU/g)	0,0059		
Riboflavina	0,029		
Tiamina (81%)	0,029		
Piridoxina HCl	0,029		
Vitamina C (97,5%)	1.355		
Biotina	0,0006		
Colina	4,66		
Vitamina J3	0,066		
Inositol	0,146		
Ácido p-aminobenzoico	0,146		

**Tabla 3** - Se muestra la composición y densidad energética de las dietas usadas en el estudio. En azul la dieta normocalórica (Teklad 2018S) y en verde la dieta alta en grasas (Teklad TD.160547).

## Anexo 2 – Control de calidad de la secuenciación





*Figura 44 - Control de calidad de las secuencias.*

Se muestran los gráficos correspondientes al análisis de calidad con FastQC para las 8 muestras secuenciadas, las secuencias corresponden a 40pb después del primer específico del bait. En el eje X se muestra el número de la base revisada y en Y el puntaje de calidad, la región verde corresponde a calidad muy buena, amarillo a razonable y rojo baja calidad.

Anexo 3 – Análisis con R3Cseq

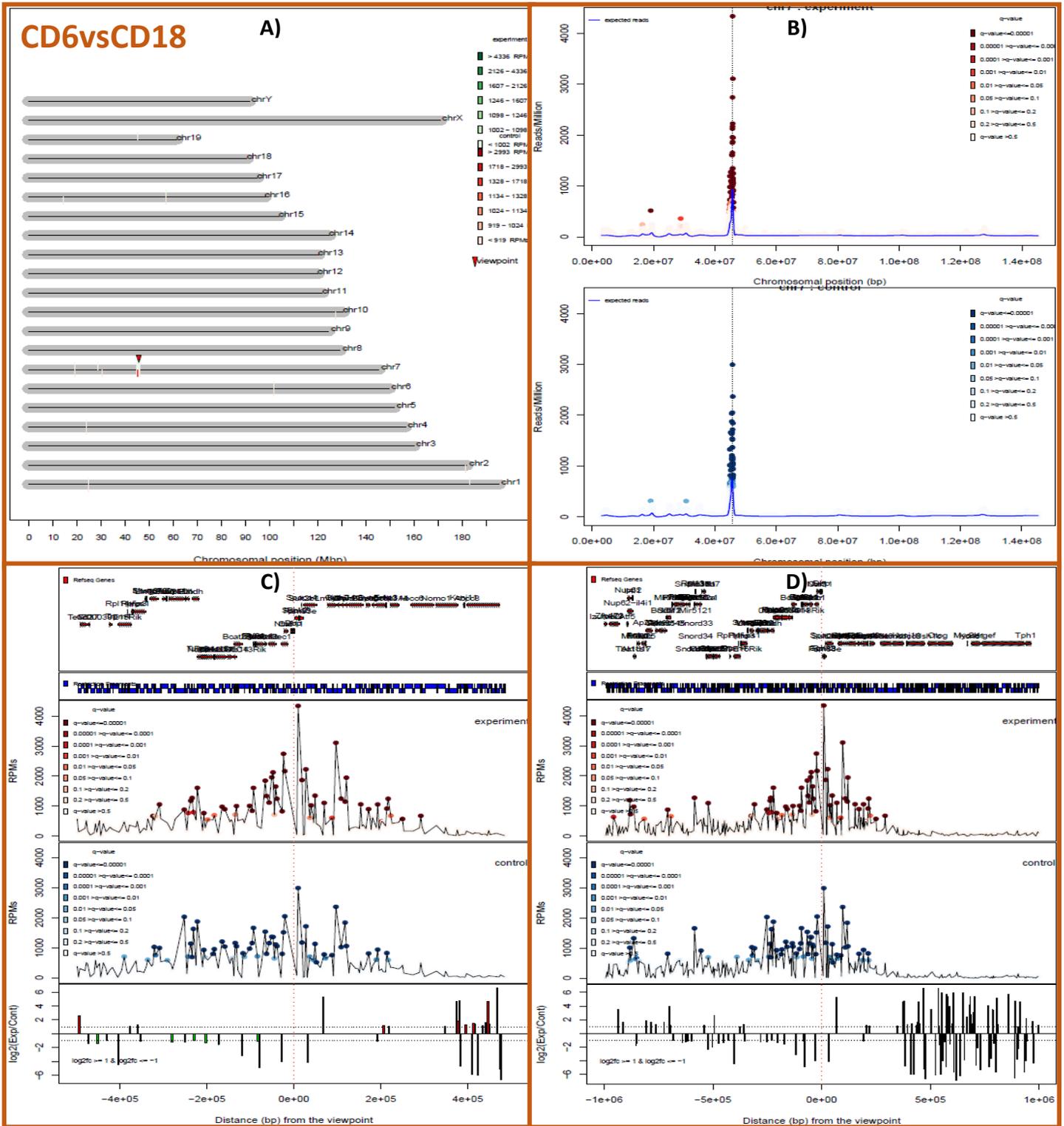


Figura 45- CD6 vs CD18.

Se muestran en A las interacciones para cada cromosoma en verde para CD6 y rojo para CD18, en B las interacciones en el cromosoma VP, en C y D las interacciones para una región de 0.5 (C) y 1 Mb (D) para cada lado a partir del VP.

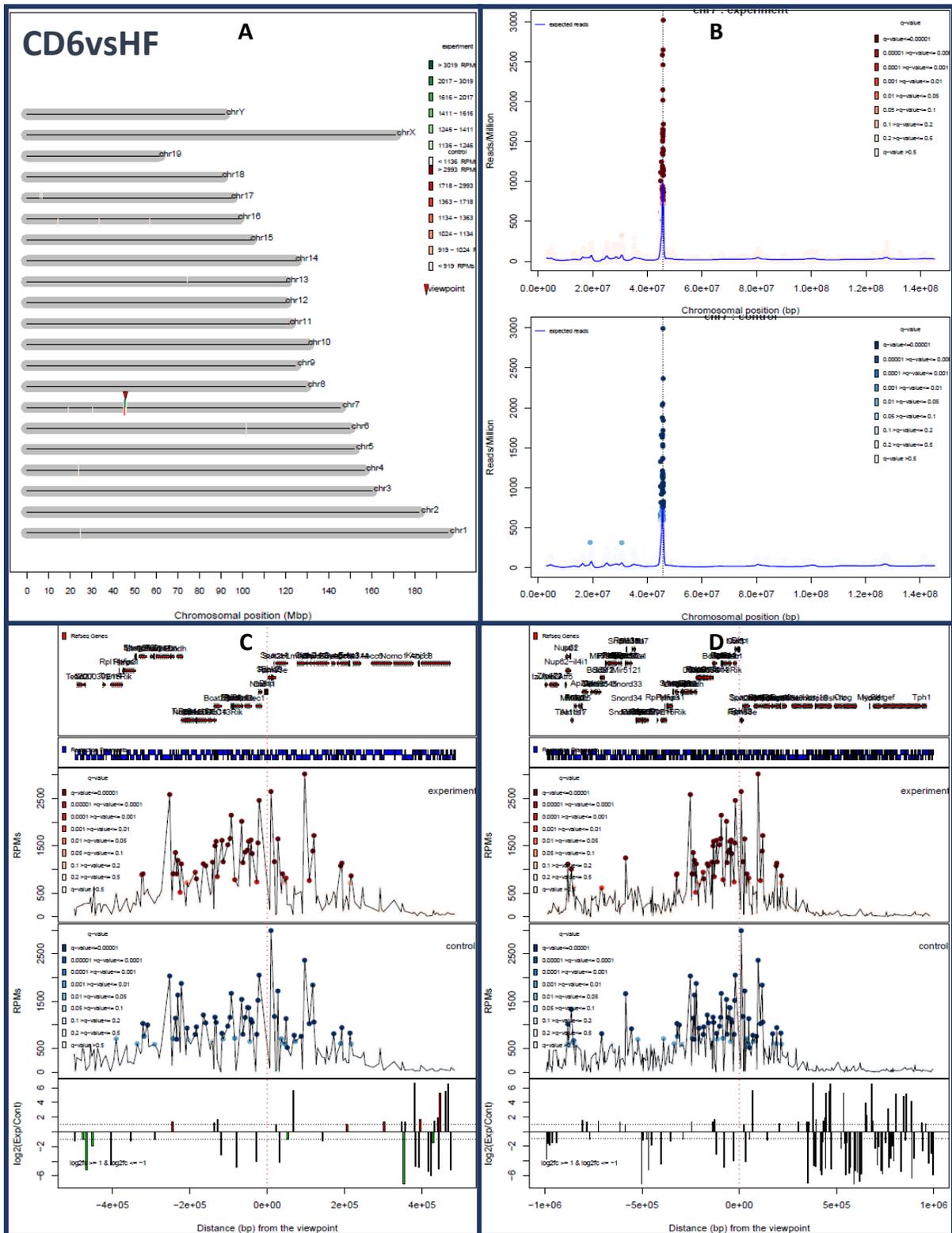


Figura 27 - CD6 contra HF6.

Se muestran en A las interacciones para cada cromosoma en verde para CD6 y rojo para CD18, en B las interacciones en el cromosoma VP, en C y D las interacciones para una región de 0.5 (C) y 1 Mb (D) para cada lado a partir del VP.

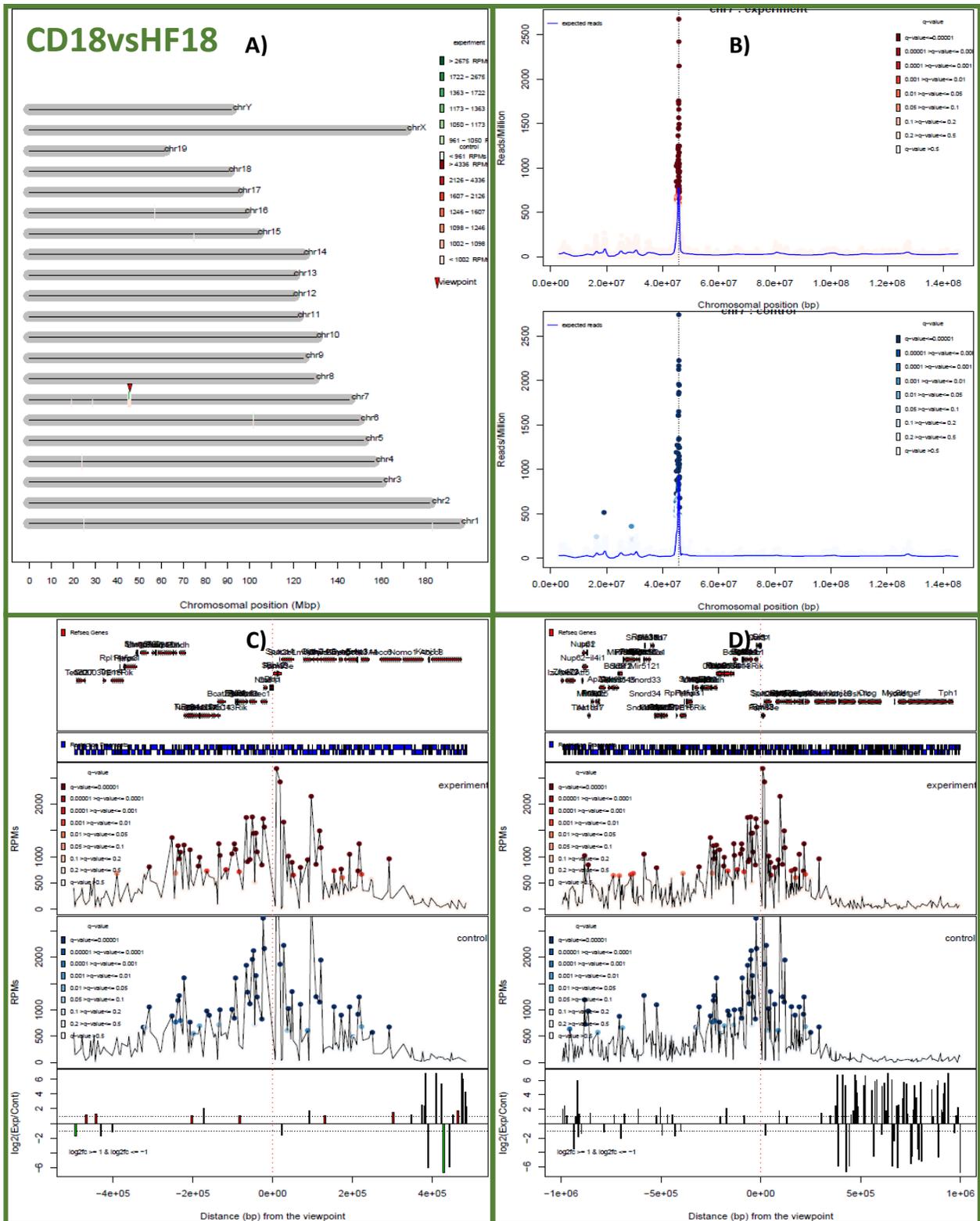


Figura 28 - *CD18* contra *HF18*.

Se muestran en A las interacciones para cada cromosoma en verde para CD6 y rojo para CD18, en B las interacciones en el cromosoma VP, en C y D las interacciones para una región de 0.5 (C) y 1 Mb (D) para cada lado a partir del VP.

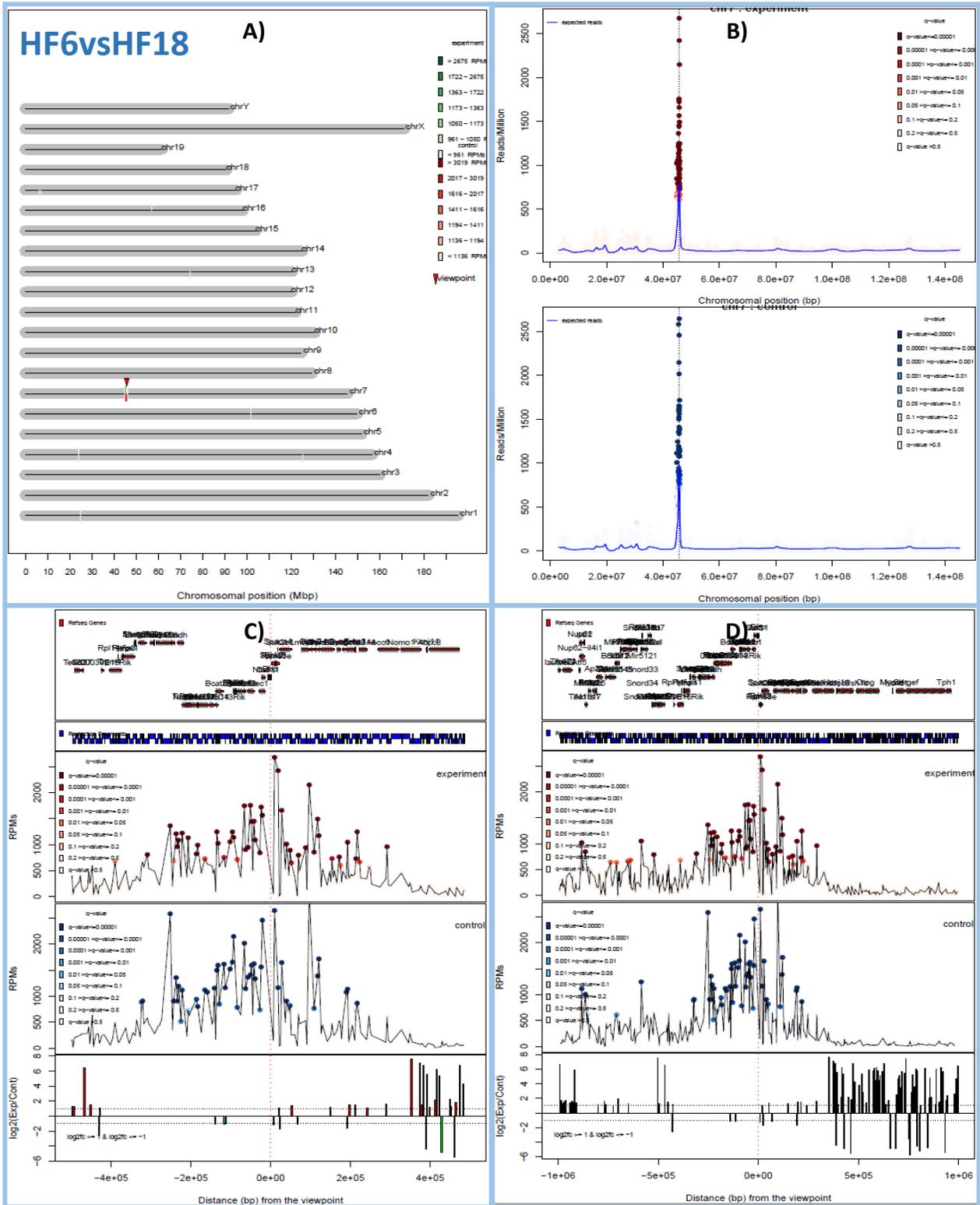


Figura 29 - HF6 contra HF18.

Se muestran en A las interacciones para cada cromosoma en verde para CD6 y rojo para CD18, en B las interacciones en el cromosoma VP, en C y D las interacciones para una región de 0.5 (C) y 1 Mb (D) para cada lado a partir del VP.