



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Facultad de Química
Instituto Nacional de Medicina Genómica

**Los Nutrientes como Zeitgebers: Respuestas Transcripcionales
en la Grasa Parda Implicadas en el Control del Balance
Energético**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

PRESENTA:
QFB. Erick Carreño Vázquez

TUTOR PRINCIPAL:
Dr. David Ricardo Orozco Solís
Instituto Nacional de Medicina Genómica

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
Dra. Nimbe Torres Torres
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Dra. Elizabeth Lorraine Jaimes Hoy
Instituto de Biotecnología UNAM.

Ciudad Universitaria. CDMX. Octubre, 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.

I.	Índice.....	1
II.	Índice de Figuras.....	2
III.	Lista de abreviaturas.....	4
IV.	Agradecimientos.....	5
1.	Resumen	6
2.	Introducción.....	7
2.1	El reloj circadiano.....	9
2.1.1	Organización del Reloj Circadiano.....	11
2.1.2.	El Reloj Molecular.....	12
2.1.3	Control Epigenético del Reloj.....	13
2.1.4	Efectos de la disrupción de sistema circadiano en el control del metabolismo	14
2.1.5	El Ambiente Modula los Ritmos Circadianos.....	16
2.1.6	Los nutrientes como Zeitgeber externo.....	17
2.1.6.1	Antecedentes en animales de laboratorio.....	18
2.1.6.1	Antecedentes en humanos.	20
2.2.	Tejido Adiposo Pardo.....	21
3.	Hipótesis.....	24
4.	Objetivo General.....	24
4.1.	Objetivos Específicos.	24
5.	Metodología.....	25
6.	Resultados.....	29
7.	Discusión.....	48
8.	Conclusiones.....	62
9.	Perspectivas.....	63
10.	Bibliografía.....	64

II. Índice de Figuras.

Figura 1. Distribución geográfica de Diabetes mellitus tipo 2.....	7
Figura 2. El reloj biológico interno es intrínseco.....	9
Figura 3. Comportamiento circadiano de las mutantes de <i>D. melanogaster</i>	10
Figura 4. Descubridores del sistema circadiano. Componentes moleculares del reloj circadiano en <i>D. melanogaster</i>	10
Figura 5. Zeitgebers.....	11
Figura 6. Reloj circadiano molecular.....	12
Figura 7. Enzimas que modifican las histonas.....	13
Figura 8. SIRT1 y la vía de salvamento del NAD ⁺	14
Figura 9. Alteración de los Zeitgebers.....	16
Figura 10. La exposición a la luz artificial y la obesidad.....	17
Figura 11. Balance energético.....	20
Figura 12. Tipos de Tejido adiposo.....	21
Figura 13. Generación de Calor a través de UCP en el BAT.....	22
Figura 14. Peso y consumo de alimento semanal.....	29
Figura 15. Temperatura corporal circadiana.....	30
Figura 16. Prueba de glucosa e insulina.....	32
Figura 17. Expresión circadiana de los grupos de estudio.....	33
Figura 18. Amplitud de expresión circadiana de los genes se ve afectada por la HFD...35	
Figura 19. Conjunto de genes que enriquecen la vía de los procesos Rítmicos.....	37
Figura 20. Genes que enriquecen las vías de la insulina y PI3K/AKT.....	38
Figura 21. Vías de MAPK y mTOR.....	40
Figura 22. Número de factores de transcripción identificados.....	41
Figura 23. Heat map de los factores de transcripción oscilantes.....	41
Figura 24. Red de regulación metabólica asociada a los factores de transcripción circadianos.....	43
Figura 25. Graficas de expresión circadiana.....	44
Figura 26. Grafica del número de genes significativamente alterados debido a la HFD.45	

Figura 27. Distribución diurna de las vías enriquecidas con los genes en los comparativos SDvsHF y HFRvsHF.....	46
Figura 28. Ratio y expresión circadiana de mTOR, Akt2, Adipor2 y Foxn2.....	48
Figura 29. Los nutrientes modulan el reloj molecular del BAT a través de los sensores nutricionales.....	49

III. Lista de Abreviaturas.

HF. Grupo alimentado con dieta alta en grasa ad libitum

HFR. Grupo alimentado con una restricción de alimento de 12 horas

SD. Grupo control, alimentado con una dieta estándar.

DG. Dieta alta en grasa

DTR. Dieta temporal restrictiva

SCN. Núcleo supraquiasmático.

TAP. Tejido Adiposo Pardo.

DM2. Diabetes Mellitus Tipo 2

CCG's. Genes controlados por el reloj.

NAD. Nicotinamida adenina dinucleótido.

OID. Obesidad Inducida por Dieta.

TAB. Tejido Adiposo Blanco.

ATP. Adenosina tri fosfato

ADP. Adenina di fosfato.

GE. Gasto energético.

IP. Intra peritoneal.

ZT. Zeitgeber time

FDR. False Discovery rate.

TTG. Test de tolerancia a la Glucosa

TTI. Test de tolerancia a la Insulina.

IV. Agradecimientos

Sin lugar a duda, es complicado llegar a realizar estudios de posgrado sin el apoyo de tus seres queridos, amigos y familiares. En esta ocasión, quiero agradecer a mi familia, a mis padres, mis hermanas y a mi sobrina, que han estado desde siempre impulsando mis sueños y que sé que lo seguirán haciendo, los amo. A todos mis amigos, a los cercanos y a los que en este momento ya no lo son, pues en su momento también brindaron su apoyo. A mi novia Julieta, gracias por tanto apoyo, sé que nos espera lo mejor, te amo.

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. David Ricardo Orozco Solis, en el Laboratorio de Cronobiología y Metabolismo del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) y la asesoría de la Dra. Nimbe Torres Torres del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) y de la Dra. Elizabeth Lorraine Jaimes Hoy del Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT) como miembros del comité tutor.

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

A la Unidad de Modelos Biológicos de Instituto de Investigaciones Biomédicas, especialmente al responsable de la unidad, el Dr. Víctor Daniel Garzón Cortés, así como a los veterinarios a cargo de la Sala 1, la MVZ Rubí Elizabeth Zavala Gaytán y la MVZ Gabriela Oranday Muñoz, por su apoyo en el cuidado y mantenimiento de los animales.

A mis compañeros de laboratorio de Cronobiología y Metabolismo del INMEGEN, la Dra. Lucia Mendoza, M.C. Irais Rivera, Clarisa Marmolejo, Karla Ávila, Dr. Israim Sotelo y Ulises Vázquez por su apoyo técnico y teórico en la realización de experimentos. Al Maestro en Ciencias Raúl Mojica por su apoyo en la Unidad de Microarreglos del INMEGEN. Al Dr. Osbaldo Resendis del INMEGEN, por sus consejos para el análisis bioinformático.

A la Dra. Lorena Aguilar Arnal, de Instituto de Investigaciones Biomédicas y a los miembros de su laboratorio, en especial a la M.C. Marcia Bustamante Zepeda por su apoyo técnico y teórico en la realización de experimentos y al M.C. Quetzalcoatl Escalante por su apoyo en los experimentos fisiológicos.

Este trabajo fue realizado con financiamiento del INMEGEN, 09/2017/I y Conacyt Fronteras de la Ciencia (FC 2016/2672).

A los doctores Samuel Canizales (INMEGEN), Armando Tovar (INCMNSZ), Carolina Escobar (UNAM), Haydee Lugo (UNAM) y Andrea Sachi (UNAM) por la revisión de la presente tesis y por ser parte del jurado de grado de maestría.

1. Resumen.

El reloj circadiano controla básicamente todas las funciones fisiológicas. La organización del reloj circadiano es de manera jerárquica. Existe un reloj central localizado en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo (SCN), el cual se sincroniza diariamente por los ciclos de luz/oscuridad y tiene bajo su control relojes periféricos localizados en otras áreas del cerebro, tejidos y órganos periféricos. Además, los relojes periféricos pueden ser sincronizados por nutrientes. Estudios epidemiológicos y experimentales han demostrado que la perturbación de los ciclos circadianos puede provocar problemas metabólicos. La ingesta de dieta alta en grasa ad-libitum, favorece el desarrollo de problemas metabólicos y reprograma el transcriptoma del hígado. Sin embargo, la dieta temporal restrictiva (DTR) protege contra el desarrollo de problemas metabólicos independientemente del tipo de dieta, al actuar como un sincronizador nutricional. La grasa parda cobró relevancia en los últimos años, debido a que su activación se relaciona con un mejor balance energético, pues es un tejido altamente catabólico y se ha visto que se puede activar por los nutrientes. Sin embargo, no existe evidencia sobre el efecto de la dieta restringida en el reloj circadiano de este tejido, por ello, estudiar el efecto de la dieta temporalmente restrictiva sobre la grasa parda y como esto ayuda para obtener un mejor balance energético es de gran importancia.

Hipótesis. La restricción temporal de alimento provoca una reprogramación del transcriptoma circadiano de la grasa parda (GP), confiriendo protección contra problemas metabólicos. **Objetivo.** Determinar si la restricción temporal de alimento reprograma el reloj de la GP confiriendo protección contra problemas metabólicos. **Resultados.** Los ratones sometidos a DTR, muestran un mejor control metabólico, esto se refleja en un menor peso corporal, mejor manejo de glúcidos y mayor amplitud en oscilación de la temperatura corporal. A nivel molecular, en la grasa parda, nuestros resultados indican que la DTR robustece la oscilación de genes que participan en vías de señalización clave para el control del metabolismo como PI3K, AKT, MAPK y mTOR y segrega las vías anabólicas y catabólicas de acuerdo con las necesidades metabólicas diarias. Importantemente, los factores de transcripción Foxn2 y Foxa2, podrían jugar un papel central en la optimización transcripcional mediado por los nutrientes.

2. Introducción.

A nivel mundial, se ha incrementado la prevalencia de sobrepeso y obesidad. En particular, México se encuentra en los primeros lugares en cuanto a sobrepeso y obesidad infantil (11 a 18 años) siendo los niños con menor nivel socioeconómico los que presentan mayor prevalencia [1]. El aumento en la prevalencia de enfermedades metabólicas visto en las últimas décadas, se debe principalmente al cambio en los últimos años en ciertos hábitos adquiridos principalmente en grandes ciudades y que está asociado a los fenómenos de migración hacia las grandes urbes [2]. Estos estilos de vida modernos incluyen: el sedentarismo, el fácil acceso a los alimentos altamente refinados y con alto contenido calórico a precios altamente competentes, y la subsecuente reducción en el consumo de una dieta balanceada [3]. Así, la acumulación de energía química almacenada en forma de ácidos grasos provoca el desarrollo de problemas metabólicos [4]. A pesar de ello, no existe ninguna campaña gubernamental eficiente para contrarrestar la epidemia de obesidad. Más recientemente, mediante estudios epidemiológicos y experimentales se ha evidenciado que ciertos estilos de vida y/o hábitos

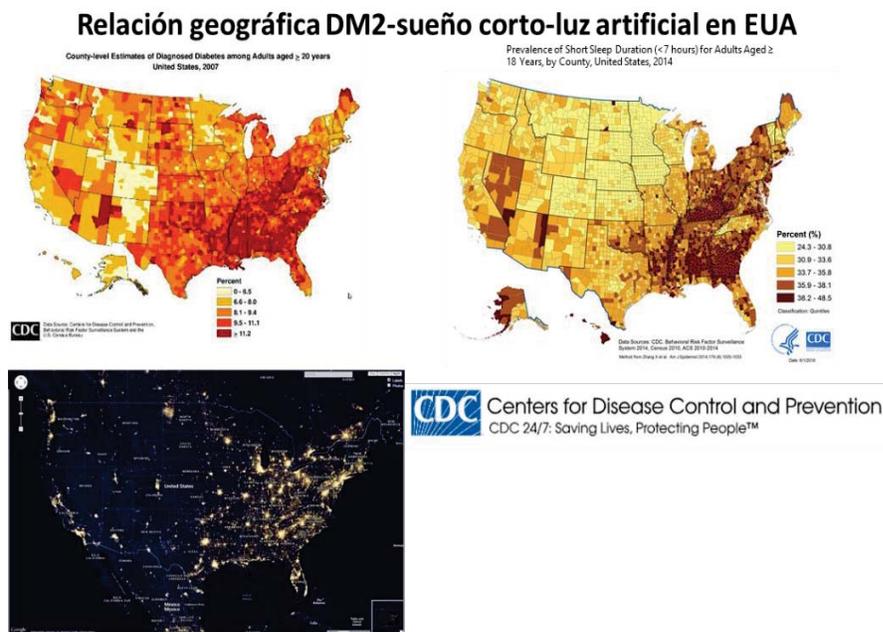


Figura 1. Distribución geográfica de Diabetes mellitus tipo 2, prevalencia de sueño corto y concentración de luz artificial en EUA. Hay relación en la distribución geográfica de las personas.

adquiridos en los últimos 30 años, son capaces de alterar a los ritmos circadianos [3], así estos estilos de vida son conocidos como “zeitgebers sociales”. Por ejemplo, la luz generada por las

pantallas de LCD de televisores y dispositivos portátiles emiten luz azul y es precisamente este tipo de luz, la que actúa sobre el reloj central localizado en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo. Además, y como veremos más adelante el horario de alimentación en periodos del día tardíos, en momentos en que el organismo debería estar en su periodo de sueño, así como la reducción de las horas de sueño, están asociados al desarrollo de problemas metabólicos [5]. Un ejemplo ilustrativo de la influencia de los zeitgebers sociales en el desarrollo de enfermedades metabólicas, es la asociación geográfica que se puede observar en zonas de Estados Unidos (realizado por el centro de control y prevención de enfermedades, (CDC)), donde hay altos niveles de luz artificial durante la noche, con altos índices poblacionales de individuos con cortos periodos de sueño (<7h/día) y/o con diabetes mellitus de tipo 2 (DM2), (Figura 1). Estos datos indican que la luz artificial impacta en las personas, haciendo que duerman menos horas al día, provocando un desajuste en el ciclo circadiano, afectando de forma negativa la salud. Estas alteraciones se deben principalmente a la modernización e industrialización de los últimos 50 años. Las personas que presentan alteraciones en el ciclo circadiano presentan problemas metabólicos, siendo de vital importancia dar entendimiento al tema circadiano [6].

2.1. El reloj circadiano

A lo largo de la historia evolutiva, la rotación de la tierra dio origen a un intercambio de



Figura 2. El reloj biológico interno es intrínseco. A) Jean-Jacques Dortous de Mairan B) Las hojas de la planta Mimosa abren cuando hay sol y se cierran durante la noche. Cuando se pone la planta en oscuridad constante, ésta sigue presentando los ritmos normales diarios de abrir y cerrar sus hojas C) Franz Halberg.

luz/oscuridad en ciclos de 24 hrs, (día y noche).

Los organismos expuestos a los ciclos de luz y oscuridad,

desarrollaron

mecanismos

fisiológicos para

adaptarse a esas

condiciones

ambientales y lograr la

supervivencia [7]. A

estos mecanismos se le conoce como sistema circadiano, que está controlado por el reloj circadiano molecular presente en cada célula [8]. Se ha postulado que el sistema circadiano presenta una ventaja evolutiva al conferir a los organismos la capacidad de anticipar los cambios diarios en el medio ambiente, ajustando los procesos fisiológicos, metabólicos y de comportamiento a lo largo del día [9].

Las primeras observaciones que hablan de la existencia del sistema circadiano endógeno se dieron en el siglo XVIII por un astrónomo francés llamado Jean Jacques Dortous de Mairan. Él tenía una planta, la *Mimosa pudica* y observaba que esta planta tenía un comportamiento circadiano al observar que cuando el sol se ponía, la planta se plegaba y al amanecer la planta se abría. Él decidió poner la planta en oscuridad constante, y observó que independientemente de los estímulos luminosos la planta continuaba su comportamiento de plegarse durante la noche y abrirse durante el día (Figura 2), lo cual demostró que las plantas contenían un mecanismo de control circadiano intrínseco, es decir independientemente de los ciclos de luz y oscuridad. Mas tarde, en el siglo XX, se comenzaba a hablar de que existían en plantas un fotoperiodo que se controlaba por un reloj endógeno que se sincronizaba por estímulos externos. En los años 50's Franz Halber acuñó el término "circadian" del latín "circa", "alrededor de" y del latín "eta

diem”, “día” (Figura 2). Posteriormente, a inicio de los 70s Ronald J. Konopka (Figura 3) identificó tres cepas de moscas de la fruta (*Drosophila melanogaster*) con diferentes comportamientos circadianos, y realizando un mapeo del locus donde se podría localizar el posible gen responsable del fenotipo circadiano llego a la conclusión de que se trataba

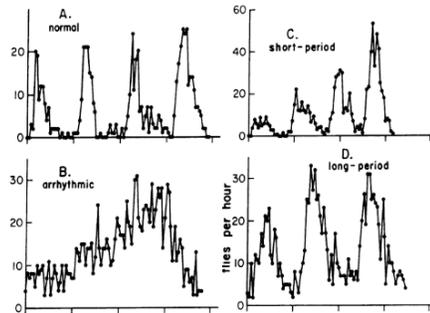


Figura 3. A) Ronald J. Konopka B) Comportamiento circadiano de las mutantes de *D. melanogaster* identificadas.

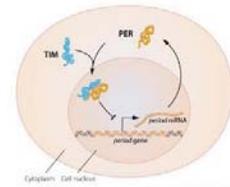
de un mismo gen. Posteriormente durante los años 80s y gracias a las moscas identificadas por Ronald Konopka, Jeffery C. Hall y Michael Rosbash, postularon por primera vez el mecanismo de

retrocontrol, que posteriormente fue identificado en mamíferos y otros organismos (Figura 4). Ellos observaron que esta proteína codificada por el gen *Per* se acumula en las células durante la noche y se degrada durante el día, lo importante que ellos observaron es que los niveles de la proteína PER oscilaban en aproximadamente 24 horas, en sincronía con los ritmos circadianos. Sin embargo, la función específica de PER se identificó hasta 1988

[10]. Al principio se hipotetizó que la proteína PER bloqueaba la actividad del gene *Period*, lo que daba origen al ciclo de retroalimentación negativa, pues la proteína PER puede prevenir su propia transcripción [11]. En los



Jeffrey C. Hall Michael Rosbash Michael W. Young



Premio nobel de medicina 2017 "for their discoveries of molecular mechanisms controlling the circadian rhythm".

Figura 4. Descubridores del sistema circadiano. Componentes moleculares del reloj circadiano en *D. melanogaster*. Primer sistema que explicó el mecanismo celular que controla las oscilaciones de la expresión de los genes.

años 90's, se identificó el segundo elemento de la maquinaria molecular del reloj, Michael Young encontró que la proteína TIM, codificada por el gen *timeless*, es requerida para un control circadiano normal en *D. melanogaster*. El descubrió que el heterodímero que resulta de la unión de TIM con PER, se une al gen *period*, bloqueando la actividad del gen, inhibiendo la transcripción y completando el ciclo en alrededor de

24 horas. Todo lo anterior mencionado, integra el primer mecanismo de reloj descubierto, que dio paso al estudio en animales superiores [11]. Por todos estos descubrimientos, Jeffrey C. Hall, Michael Rosbash y Michael W. Young, fueron galardonados por el Premio Nobel de Medicina 2017 (Figura 4).

La importancia del reloj circadiano radica en que controla virtualmente todas las funciones fisiológicas, entre las más importantes están: los ciclos sueño/vigilia a través de la estimulación de la glándula pineal, la temperatura corporal, niveles hormonales y el metabolismo.

2.1.1. Organización del reloj circadiano.

El reloj circadiano está organizado de manera jerárquica, es decir que presenta un reloj central o maestro que es capaz de sincronizar relojes accesorios, que trabajan en conjunto para sincronizar todo el organismo. El reloj central

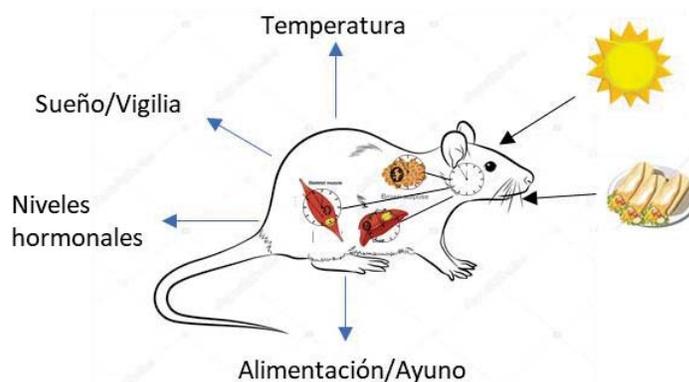


Figura 5. Zeitgebers. Los principales sincronizadores son la luz y los alimentos. La luz sincroniza al reloj central, mientras que los nutrientes pueden sincronizar a los relojes periféricos

se encuentra en el núcleo supraquiasmático (SCN) del hipotálamo, un cúmulo neuronal de alrededor de 20 mil neuronas situado por encima del quiasma óptico. Las primeras observaciones sobre el SCN, mostraron que al eliminar este núcleo en roedores, se pierden por completo la oscilación circadiana [12]. Mientras que, los relojes periféricos se encuentran en otras regiones cerebrales y en tejidos periféricos como el hígado, páncreas, músculo, tejido adiposo, etc. Los relojes deben de ser sincronizados diariamente por estímulos ambientales llamados “Zeitgebers” (Figura. 5), término en lengua alemana que significa “dador de tiempo”. En el caso del reloj central, se sincroniza por los ciclos de luz/oscuridad, en específico por la longitud de onda 460-480 nm que entra en el rango de la luz azul. Esta luz es captada por células especializadas en la retina, a través de un pigmento llamado melanopsina, el estímulo es conducido a

través del tracto retino-hipotalámico que conecta directamente con el SCN [5]. Por otro lado, los relojes periféricos, estos son a su vez sincronizados por el reloj central mediante inervación simpática o a través de hormonas, sin embargo, existen otros zeitgeber ambientales (aparte de los ciclos de luz/oscuridad) que pueden sincronizar los relojes periféricos, en particular los estímulos nutricionales, ya sea el tipo o el horario de alimentación [13, 14].

2.1.2. El reloj molecular

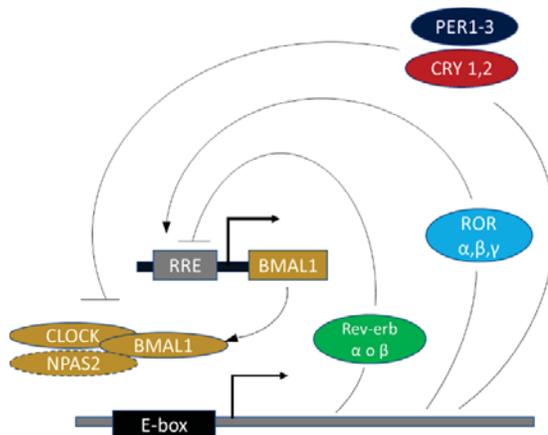


Figura 6. Reloj circadiano molecular. Se muestra el sistema de retrotranscripción negativa impulsado por el dímero de CLOCK y BMAL y reprimido por el dímero de PER y CRY.

En todas las células, el reloj circadiano se controla a través de un mecanismo transcripcional-traducciona de retrocontrol negativo, es decir que el mismo sistema genera sus propios represores. En mamíferos, los factores de transcripción CLOCK (circadian locomotor output cycles kaput) o NPAS2 (Neuronal PAS domain 2) forman un heterodímero con el factor de transcripción BMAL1 (Brain and

muscle ARNT-like 1) y el heterodímero se une a las cajas E (E-boxes), que están presentes en los promotores de los genes controlados por el reloj (Clock controlled genes, CCG's). La E-box (enhancer box) es una secuencia consenso formada por los nucleótidos CANNTG donde "N" puede ser cualquier nucleótido [8]. Entre los CCG's se encuentran los genes que codifican para las proteínas Period (*Per1* y *2*) y Cryptochrome (*Cry1* y *2*), que una vez transcritos y posteriormente traducidos, se heterodimerizan y se translocan al núcleo uniéndose al dímero CLOCK:BMAL1 impidiendo que se unan a las cajas E, reprimiendo su propia transcripción, todo esto en un lapso de alrededor de 24 horas. PER, no funciona como una unidad, ya que se asocia con otras proteínas para formar un complejo (Period Complex) que es el encargado junto con CRY de reprimir la transcripción (figura 6) [15]. Otras proteínas involucradas son REV-ERBa (nuclear receptor subfamily 1, group D, members 1/2) y RORc (Retinoic acid related-related orphan receptor), ambos actúan como inhibidor o activador de la transcripción de

BMAL1 respectivamente (Figura 6). En conjunto, todas estas proteínas conforman el corazón del reloj circadiano. El reloj molecular controla la transcripción de cientos de genes, debido a la presencia de las cajas-E en un gran número de promotores, haciendo que una amplia gama de genes oscile bajo el mando del reloj molecular, cobrando relevancia fisiológica [16]. Además, se ha observado que la oscilación de genes por el mecanismo del reloj molecular no solo sirve para mantener la homeostasis fisiológica, sino que se utiliza como un mecanismo eficiente para optimizar el costo metabólico [17].

2.1.3. Control epigenético del reloj.

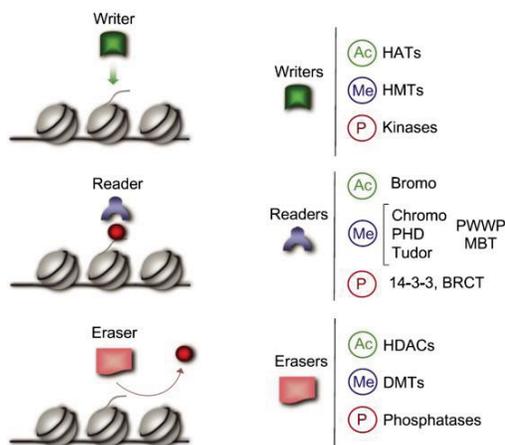


Figura 7. Cita* Enzimas que modifican las histonas. Writers, readers y erasers interactúan para modificar la estructura de la cromatina.

El principal mecanismo del reloj molecular es el generado por la interacción de activadores y represores transcripcionales. Sin embargo, existe una variedad de reguladores epigenéticos que modulan la expresión y actividad de los CCG's y por ende la regulación circadiana. Uno de los mecanismos epigenéticos más conocidos es la generación de cambios postraduccionales de las histonas, lo cual genera eventos de remodelación de la

cromatina [18, 19]. Estas modificaciones se dan a través de enzimas que interactúan con la cromatina y pueden ser definidos como "writers" que son enzimas como cinasas, transferasas de grupos acetilo en histonas (HATs), de metilos en histonas (HMTs) que modifican residuos específicos adicionando grupos fosfato, acetilo o metilo. Los "readers" incluyen una gran variedad de proteínas regulatorias que muestran dominios que reconocen los grupos acetilo, fosfato o metilo. Frecuentemente los "readers" reclutan efectores epigenéticos adicionales. Los "erasers", estas enzimas que incluyen fosfatasas, histona acetil transferasas (HDAC) e histona metil transferasas (DMTs) que eliminan directamente las modificaciones postraduccionales (Figura 7) [20].

De manera importante, algunos de estos modificadores están regulados por el reloj circadiano [21]. Por ejemplo, la proteína CLOCK, además de controlar la transcripción de los CCG's, tiene actividad de acetilasa de histonas, en específico de la histona H3 en la lisina 9 y 14 (H3K9 y H3K14 respectivamente)[22]. Otra proteína implicada en el control circadiano mediado por mecanismos epigenéticos, es la metiltransferasa de histonas

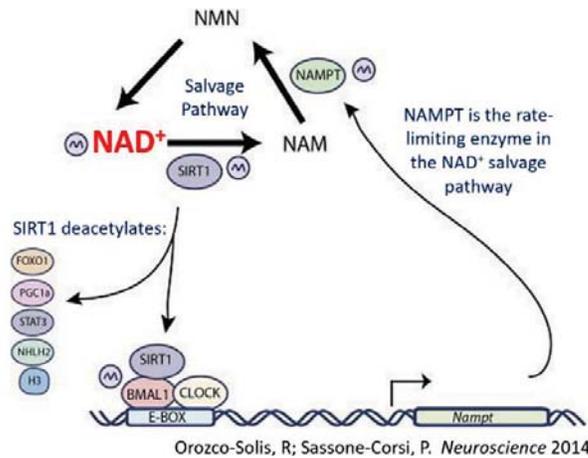


Figura 8. SIRT1 y la vía de salvamento del NAD+. SIRT1 regula la expresión de varios genes. SIRT1 utiliza NAD como cofactor. Los niveles de NAD son cíclicos debido a que la enzima limitante de la vía de salvamento es NAMPT y su expresión es cíclica.

MLL1, la cual metila a H3K4 en los promotores de los CCG's, facilitando la unión de CLOCK:BMAL1 y promoviendo la activación de la transcripción[22]. Otro grupo de proteínas implicada en dicho control epigenético son las Sirtuinas, cuya actividad principal es eliminar grupos acetilo de las histonas y otras proteínas importantes en el control del metabolismo como PGC1a, FOXO1, STAT3, BMAL1, etc, por consiguiente, SIRT1 modula la

actividad de estas enzimas. Las sirtuinas, requieren como cofactor al NAD+, metabolito que oscila a través del reloj circadiano debido a que la enzima limitante en la vía de salvamento de biosíntesis del NAD+, la NAMPT, contiene cajas E en sus promotores y por lo tanto, esta enzima se transcribe de manera circadiana [6]. De manera importante, debido a que los niveles de NAD+ fluctúan a lo largo del día esto tiene como consecuencia que la actividad de SIRT1 sea circadiana y por ende la modulación de la actividad de sus proteínas blanco (Figura 8)

2.1.4. Efectos de la disrupción de sistema circadiano en el control del metabolismo

El correcto funcionamiento del reloj circadiano es indispensable, debido a la gran cantidad de genes regulados por este sistema. Sin embargo, la disrupción o eliminación de algún elemento que forma parte del sistema del reloj afecta de manera perjudicial al organismo [23]. Los primeros estudios que trataron de resolver la incógnita sobre los efectos de la eliminación del reloj molecular se dieron a inicios del presente siglo, donde

se alteraban o se silenciaban por completo genes involucrados en la regulación del reloj circadiano [23]. Uno de los estudios pioneros, se llevó a cabo al eliminar el gen *Clock*, uno de los principales genes involucrados en el mecanismo del reloj molecular. Este estudio demostró que los ratones mutantes de *Clock* muestran una reducción en los ritmos de alimentación, aumento en los triglicéridos, colesterol y glucosa en sangre, esteatosis hepática, además de una mayor ganancia de peso y consumo energético, al compararlos con los ratones silvestres (WT) [24].

Con el tiempo, se realizaron diversos estudios en los que se eliminaban los genes para cada uno de los componentes del reloj molecular, para analizar los efectos de la ausencia de cada gen en específico. Por ejemplo, los ratones mutantes de *Bmal1* presentan hiperglucemia en ayuno alimentados con dieta normo calórica (NC) [25], mientras que, los ratones mutantes de *Cry1/2* alimentados con dieta NC presentan hipo insulinemia en ayuno, así como alteraciones en la prueba de tolerancia a la glucosa (TTG) presentando una glucemia elevada comparados con los ratones WT [26]. Al evaluar a los animales mutantes de *Cry1/2* alimentados con dieta alta en grasa (DG 45%) presentaron una mayor ganancia de peso, hiperinsulinemia, así como esteatosis hepática [27]. Además, se observó que en animales deficientes de *Per1/2* muestran una elevada sensibilidad a la insulina e intolerancia a la glucosa [28]. Finalmente, ratones con mutaciones en los genes *Clock* y *Bmal1*, muestran intolerancia a la glucosa, reducción en la secreción de insulina y defectos en el tamaño y la proliferación de los islotes pancreáticos [29]. Por otra parte, algunos estudios han revelado la asociación de variantes en genes del reloj con un aumento en la predisposición para desarrollar enfermedades crónico-degenerativas, como obesidad, DT2, y enfermedades cardiovasculares [30-32]. Estos datos muestran que el correcto funcionamiento del reloj molecular es de vital importancia para conservar la homeostasis metabólica.

2.1.5. El ambiente modula los ritmos circadianos.

Como hemos visto, los ritmos circadianos pueden ser alterados por factores genéticos.

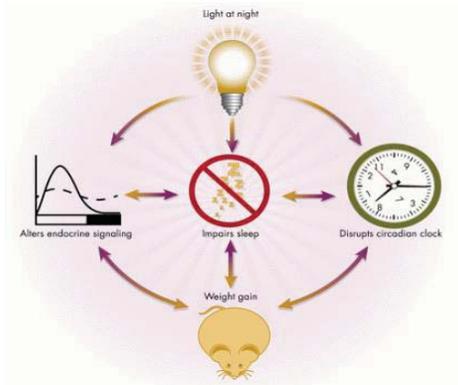


Figura 9. La alteración de los zeitgebers ambientales provoca problemas metabólicos como sobrepeso, debido a la alteración del reloj circadiano.

Sin embargo, los ritmos circadianos al ser sincronizados diariamente por estímulos ambientales (zeitgebers), ciertos factores ambientales pueden modificar el comportamiento y la fisiología de los organismos al alterar los ritmos circadianos [33] (Figura 9). En el caso de los humanos, los estilos de vida modernos han impactado de forma drástica la fisiología y la conducta, creando nuevos hábitos que hace 100 años no existían.

Los zeitgebers naturales como los ciclos de luz/oscuridad están implícitos en los estilos de vida de la sociedad. Estudios epidemiológicos demuestran que los estilos de vida modernos en las grandes ciudades están asociados con el desarrollo de enfermedades metabólicas. En este sentido, se ha acuñado el término “Zeitgeber social” [7]. Por ejemplo, el simple hecho de realizar un viaje transmeridional a otro país con un horario muy distinto en poco tiempo no era posible hace décadas, provocando un cambio drástico en los ciclos de luz/obscuridad recibidos por el SCN, forzando una resincronización paulatina del reloj central que ahora se conoce como jet-lag [33]. Así mismo, los trabajos nocturnos se han incrementado, invirtiendo completamente el ciclo circadiano en los trabajadores nocturnos [33]. En las

zonas urbanas se ha reducido el periodo de sueño promedio en dos horas y se ha comprobado que esta disminución de sueño se debe a una mayor concentración de luz artificial (Figura 10). Estudios con humanos revelan que los sujetos expuestos a periodos de sueño cortos durante algunos días desarrollan problemas con la homeostasis de la glucosa, disminución de niveles séricos de leptina postprandial y reducción del gasto energético. Este efecto se pierde después de dos semanas de restablecimiento del periodo de sueño [34]. Las mismas pantallas de computadoras o smartphones generan luz azul, la luz encargada de sincronizar el reloj central, generando una resincronización debida a la luz artificial [5]. Todo lo anterior dicho nos permite decir que la alteración del ciclo circadiano, provocado por el ambiente modificado por los zeitgebers sociales, se ve reflejado en alteraciones metabólicas (Figura 9). Sin embargo, no solo los ciclos de sueño vigilia pueden alterar el ciclo circadiano. Los patrones diarios alimenticios pueden provocar efectos benéficos o nocivos para la salud, depende del patrón específico para cada caso, ya sea benéfico o nocivo.

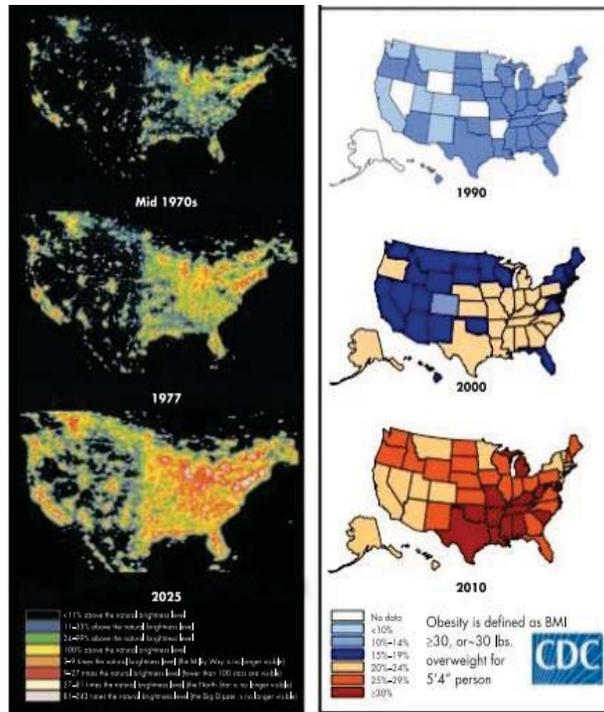


Figura 10. La exposición a la luz artificial y la obesidad se incrementan a la par en Estados Unidos. Como se muestra en la distribución geográfica, las regiones donde las personas se exponen en mayores cantidades a la luz artificial co-localiza con las regiones de mayor prevalencia de sobrepeso.

2.1.6. Los nutrientes como Zeitgeber externo.

Para comprender mejor la influencia del reloj circadiano en la regulación del metabolismo debemos saber que alrededor de 45% de los transcritos (en modelo murino) del hígado presentan oscilaciones de 24h, entre los cuales se encuentran genes

reguladores de la homeostasis de la glucosa y lípidos, es decir que el metabolismo es altamente circadiano[23]. De manera importante, los ciclos de alimentación actúan como sincronizadores muy potentes en los relojes de los tejidos periféricos y, por consiguiente, juegan un papel clave al coordinar la homeostasis metabólica [23]. Por ejemplo, estudios realizados en roedores y humanos, han demostrado la importancia del consumo de alimento en periodos del día específicos en el control del balance energético. En roedores se ha visto que el acceso ad-libitum de alimento alto en grasa debilita los ciclos diarios de alimentación, y los ritmos moleculares del reloj [35], además es capaz de reorganizar el transcriptoma circadiano, induciendo nuevos transcritos oscilatorios [16]. De manera importante, la restricción alimentaria durante el periodo nocturno genera protección al desarrollo de síndrome metabólico aún bajo el consumo de dieta obesogénica. Esto está acompañado con un aumento en la amplitud de genes del reloj y genes controlados por el reloj en hígado, reducción de los niveles de colesterol, glucosa, aumento del gasto energético, oxidación de ácidos grasos, reducción de la producción de glucosa por el hígado, etc. [35, 36]. En este sentido, en individuos se ha observado que el consumo de alimentos ricos en calorías antes de dormir puede favorecer el desarrollo de problemas metabólicos [37, 38]. Estas evidencias muestran que los nutrientes si son adquiridos durante los periodos adecuados del día, estos pueden actuar como sincronizadores o zeitgebers y así, optimizar el metabolismo energético.

2.1.6.1. Antecedentes en animales de laboratorio

Tanto en modelos animales como en humanos, se ha demostrado que los nutrientes modulan los ritmos moleculares [23, 35]. En el caso de los modelos animales, se ha evaluado el efecto de la obesidad inducida por dieta (OID) mediante la administración de una dieta alta en grasa (DG), encontrando que los animales alimentados con DG presentan una alteración en la expresión de los genes oscilantes en hígado, comparándolos con el grupo alimentado con una dieta estándar, lo que provocó problemas metabólicos que van desde intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina, aumento en la grasa corporal y esteatosis hepática [16]. De manera interesante, se observó que hay un nuevo grupo de genes hepáticos que ganan oscilación en el grupo

alimentado con DG. Además, la reprogramación del transcriptoma hepático genera un cambio importante en el metaboloma circadiano del hígado, causado por la alteración en la expresión circadiana de genes que codifican para enzimas. Por ejemplo, los niveles de NAD⁺ en hígado pierden oscilación debido a que el gene *Nampt*, pierde la oscilación en su transcripción [16]. De manera interesante uno de los factores que participan en la reprogramación del transcriptoma circadiano por la DG, es el receptor nuclear PPAR γ [16]. Para desarrollar tratamientos que contrarresten los problemas metabólicos producidos por la dieta alta en grasa, se han evaluado tres tipos de ingesta de dieta, donde la variable es el tiempo de ayuno. La primera es mediante un periodo de ayuno intermitente (AI), que consiste en un ayuno de 24 horas durante el primer día seguido de una alimentación *ad-libitum* de 24 horas durante el segundo día [39]. La segunda es una dieta que imita al ayuno intermitente, que consiste en una reducción de la ingesta calórica (RIC) (~ 30% de las necesidades energéticas) durante cinco días consecutivos antes de volver a los ciclos de alimentación normales, una vez al mes o cada 3 a 4 meses por año. Por último, la dieta tiempo-restrictiva (DTR), que se basa en un periodo de alimentación que va de 4 a 12 horas diariamente [39]. En los tres casos, la modificación en la ingesta de alimento tiene efecto benéfico en el metabolismo. En específico, la dieta restrictiva temporal ha demostrado mejores resultados contra las alteraciones metabólicas provocadas por la DG [39]. Mediante un periodo de alimentación de 10 a 12h con DG durante el periodo de actividad del ratón (periodo obscuro), se demostró que la DTR provoca una recuperación en la amplitud de oscilación de los genes controlados por el reloj, incluyendo *Arntl*, *Clock*, *Per*, *Dbp*, *Cry*, *Nr1d1*, *Ppargc1a* y *Ppara* en el hígado, amplitud que se vio disminuida con DG *ad-libitum*, esta recuperación está asociada a una mejora en el control del metabolismo [35]. Similarmente, mediante un estudio del efecto de bebidas azucaradas mediante la administración de una solución de sucrosa y fructosa, se observó que la DTR genera una protección en contra de los problemas metabólicos generados por el consumo de DG y de bebidas azucaradas [35]. En ambos casos, la DTR protege contra el desarrollo de problemas metabólicos, como la esteatosis hepática, desregulación de la homeostasis de la glucosa y la regulación de la temperatura corporal. A nivel molecular, se observó que sensores y reguladores metabólicos participan en los efectos benéficos de la DTR, por ejemplo, en el hígado, la vía de señalización CREB (cAMP response element-binding protein) se ve elevada en el

ayuno, pues es favorecedor de la gluconeogénesis. En animales OID, se redujo la oscilación de CREB. En contraste, los animales con dieta restrictiva mostraron una restauración en los ritmos diurnos de CREB, mostrando un pico de expresión en la fase de ayuno [35, 39, 40]. Durante los últimos años diversos estudios sugieren que la presencia específica del microbiota intestinal puede influenciar el control del metabolismo, además la microbiota puede ser influenciada por nutrientes [41]. De manera interesante, en un estudio reciente se evaluó la influencia de los alimentos sobre el microbiota intestinal circadiano y su influencia en el metabolismo. Se encontró que la dieta modifica el tipo y la funcionalidad de la microbiota, pues la DG promueve la absorción de lípidos mediante la prevalencia de microbiota asociada a la lipogénesis, y que disminuye la oscilación del *phylum* (*Bateroides*, *Firmucutes*, *Verrucomicrobia*) circadiano visto en ratones alimentados con NC (NC 17%, DG 7%) [42].

2.1.6.2. Antecedentes en humanos.

Estudios demuestran que las personas que presentan sobrepeso, en gran medida es por el balance energético positivo, es decir que consumen más energía de la que gastan, generando que la energía adicional se almacene en forma de lípidos en el tejido adiposo

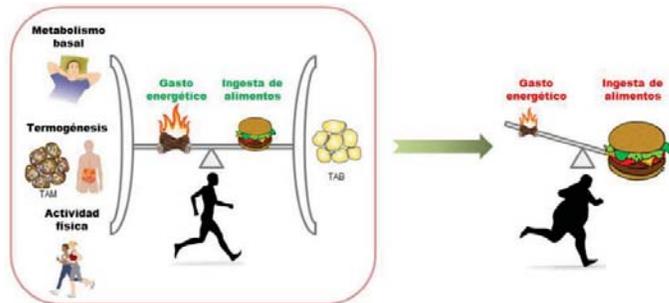


Figura 11. Balance energético. El equilibrio entre el consumo calórico y el gasto energético. El gasto se energético se da por la actividad metabólica basal, ejercicio físico y la termogénesis en contra de la ingesta de alimentos.

blanco (del inglés white adipose tissue o WAT) [43]. Aunado a lo anterior, las personas que presentan sobrepeso u obesidad tienden a comer por las noches, prolongando su periodo de alimentación hasta 15 horas. De manera importante, como sucede en los estudios realizado en modelos animales, la DTR durante el periodo de actividad en individuos es capaz de conferir efectos benéficos en el metabolismo [35, 40]. En individuos con peso normal, se evaluó la restricción de alimento diario por 12h durante 4 semanas. Se observó una disminución significativa de peso corporal, así como una

disminución en los niveles de colesterol y triglicéridos en suero [45]. De manera importante los efectos benéficos se mantuvieron aún después de un año [45]. Otro estudio, reunió pacientes con sobrepeso y/o obesidad y los sometieron a una dieta restrictiva (10-12h) por 16 semanas, logrando ver un efecto positivo reflejado en la pérdida de peso provocada por la dieta restrictiva[45].

Evidentemente cambios celulares y moleculares en los tejidos provocan los efectos positivos en el metabolismo. A este respecto, un tejido que ha cobrado gran relevancia es la grasa parda, debido a su gran capacidad catabólica.

2.2. Tejido adiposo pardo.

Existen dos tipos principales de tejido adiposo, el tejido adiposo blanco (TAB) y el tejido adiposo pardo (TAP). Ambos tipos de tejido adiposo presentan diferencias en cuanto a estructura y función, por ejemplo, mientras que el WAT presenta un solo cúmulo o “vacuola” de lípidos, el TAP presenta múltiples cúmulos de lípidos (Figura 12). Estudios recientes asocian la activación del tejido adiposo pardo con una mejora en la salud debido a la capacidad catabólica de este tejido. Esto se debe a que el TAP presenta gran cantidad de mitocondrias oxidativas, a diferencia del TAB que tiene mínima cantidad de mitocondrias [46]. TAB funciona principalmente como almacén de energía en forma de

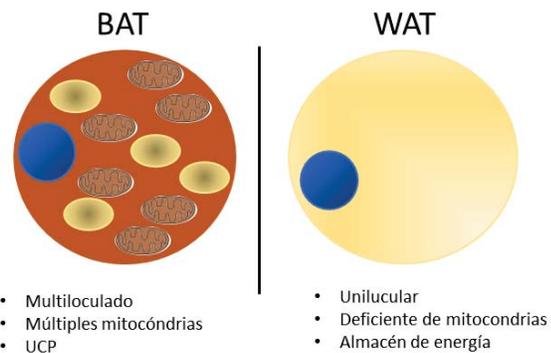


Figura 12. Tipos de tejido adiposo. Características que diferencian los tipos de tejido adiposo, destacando su papel contrario en el metabolismo de lípidos.

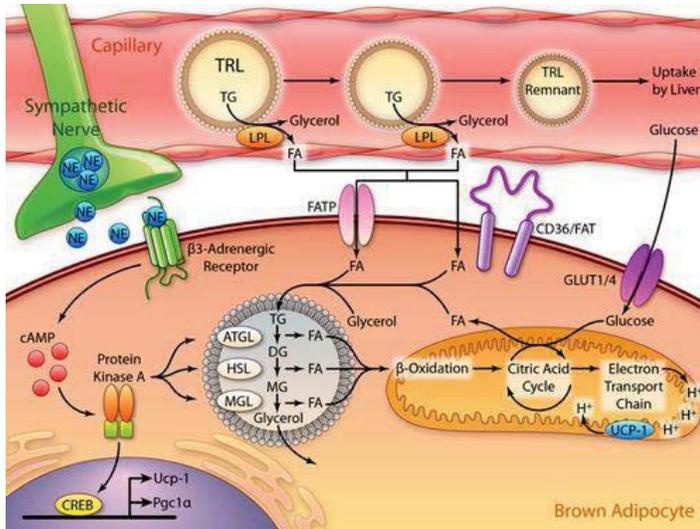


Figura 13. REF* Generación de calor a través de UCP en el TAP. Los alimentos y el frío provocan la activación del TAP vía SNS, desencadenando una cascada de señalización que activa la transcripción de UCP y Pgc1a, así como la oxidación de lípidos y glucosa para la obtención del gradiente de protones necesario y producir calor.

lípidos y el TAP produce calor para regular la temperatura corporal, mientras que el WAT se localiza principalmente en las vísceras y en tejido subcutáneo. El TAP se localiza en la región interescapular, cervical, axilar y perirrenal en ratón. La principal característica del TAP es la producción de calor a través del desacoplamiento de la cadena de transporte de

electrones, ya que expresa proteínas desacopladoras (UCPs), que se expresan en la membrana mitocondrial. Estas proteínas desacoplan la cadena respiratoria al permitir el libre paso de protones a través de la membrana mitocondrial y, en consecuencia, la liberación de energía en forma de calor. En contraste, la fuerza proto motriz generada por el paso de protones a través de la ATP sintetasa, genera la síntesis de ATP a partir de ADP+ Pi (Figura 13). El TAP utiliza como combustible tanto a la glucosa como a los lípidos. El TAP está altamente inervado por terminaciones nerviosas. Así, estímulos simpáticos activan al TAP en respuestas a la exposición al frío y a estímulos nutricionales [44, 47]. La disfunción del TAP está asociada con problemas metabólicos, por ejemplo, se ha observado que la DG disminuye la expresión de los genes involucrados en la termogénesis y genes del reloj en el TAP, por el contrario, la DTR es capaz de inducir la expresión de los principales genes termogénicos en el TAP (UCP1, PPARA, PGC1a, etc.) y genes clave en el control del reloj molecular (Arntl, Clock, Per2, Npas2 etc), lo que nos indica que el reloj del TAP puede ser modulado por los nutrientes[35]. En humanos, se ha demostrado que la activación del TAP por la dieta, aumenta el gasto energético (GE), observado por el rango de intercambio respiratorio, consumo energético total, entre otros parámetros metabólicos [46]. Se ha comprobado que la actividad de la grasa parda

es circadiana, pues presenta variaciones en la expresión de los genes termogénicos a lo largo del día, lo que correlaciona con la oscilación de la temperatura a lo largo del día[48]. Un estudio realizando un modelo de ratón KO para el gene del reloj Rev-erb α , se observó que en ratones control o wild-type (WT), se presenta una reducción de la tolerancia al frío entre ZT4-10, coincidiendo con el pico de expresión de Rev-erb α , represor directo de UCP1[44]. Además, estos ratones KO, presentan niveles de expresión constantes a lo largo del día de UCP1. Al enfrentarse al frío, se induce la expresión de los genes clave del reloj en el TAP, pero no en WAT en los ratones KO para Rev-erb α [49]. También se observó que el 8% de los genes codificantes del TAP son circadianos en ratón. Además, algunas funciones importantes, como la lipólisis y liberación de ácidos grasos libres (AGL) y glicerol, se han reportado que presentan ritmos diurnos en el TAP [44]. La activación de la grasa parda puede ser de manera local, o por señales hormonales que estimulan al receptor β 3 adrenérgico, a través del sistema nervioso simpático mediante la secreción de norepinefrina por las terminaciones nerviosas [50]. En ambos casos, el reloj circadiano se ve involucrado. Por ejemplo, en ratones mutantes deficientes de reloj circadiano en la grasa parda, presentan intolerancia a la exposición al frío, a diferencia de los ratones WT.

Además de lo anterior, un estudio demuestra que la exposición prolongada a los ciclos normales de 24 hrs de luz/oscuridad, incrementa la masa del WAT por la atenuación de la actividad TAP, esto provoca un desbalance energético inclinado hacia el consumo de energía debido a que la exposición constante de luz reduce la inervación simpática hacia el TAP y también se reduce la señalización intracelular del receptor β 3 adrenérgico, provocando que toda la señalización río abajo se vea afectada, es decir que los factores de transcripción y las enzimas implicadas en la termogénesis se ven comprometidas los cuales incluyen Pgc1a y Ucp1 [51]. Además de los estímulos catabólicos adrenérgicos, la grasa parda puede ser regulada por mTOR, pues recientemente se observó que mTORC1 es necesario para la termogénesis. Esto se observó en un estudio en el cual sometieron a un grupo de ratones a periodos diarios temperatura de 4°C por 1 hora durante la noche de manera crónica, los ratones deficientes de mTORC1 en los adipocitos del TAP presentan menor resistencia al frío, así como un menor consumo de oxígeno debido a

un menor desarrollo del TAP y deficiencia en la biogénesis mitocondrial, en comparación con ratones control [52].

Colectivamente, estos antecedentes muestran que: 1) los nutrientes modulan el ciclo circadiano, 2) la restricción temporal alimentaria confiere protección contra el desarrollo de problemas metabólicos, 3) El TAP es controlado por el reloj circadiano y confiere protección contra el síndrome metabólico. Entonces es factible postular que el TAP participa en el mejoramiento metabólico provocado por la DTR, y que a su vez esto es provocado por una reprogramación del transcriptoma circadiano del TAP.

3. Hipótesis

“La restricción temporal de alimento provoca una reprogramación del transcriptoma circadiano del TAP, y estos cambios están asociados a la protección contra problemas metabólicos”.

4. Objetivo general.

Determinar si la restricción temporal de alimento reprograma el reloj del TAP confiriendo protección contra problemas metabólicos.

4.1. Objetivos específicos.

- Generación de un modelo murino de obesidad inducido por dieta (OID)
- Identificación de los efectos metabólicos analizando distintos parámetros fisiológicos.
- Análisis de expresión circadiana de genes en el TAP.
- Identificar funciones biológicas, vías de señalización, y genes clave en el control del balance energético.

5. Metodología.

5.1. Paradigma nutricional.

Se utilizaron 54 ratones macho de la cepa C57BL/6 de alrededor de 8 semanas de edad. Estos, se dividieron en tres grupos de 18 ratones cada uno. Los ratones fueron alimentados durante 19 semana de la siguiente manera: El primer grupo (SD) se alimentó *ad libitum* con una dieta estándar comercial ENVIGO y se utilizó como control conteniendo 4.3 % de grasa. El segundo grupo (HF) se alimentó *ad libitum* con una dieta que contiene 29% de peso en grasa, que se traduce a un 51% de kcal provenientes de la grasa ENVIGO TD.93075. Por último, el tercer grupo (HFR) se alimentó con la misma dieta que el grupo anterior, pero con una restricción temporal de 12 horas, es decir que solo se les permitía alimentarse durante el periodo obscuro, debido a que los ratones son nocturnos. Semanalmente se determinó el peso de los animales, así como el consumo de alimento semanal. Al finalizar este periodo, se realizaron pruebas tolerancia a la glucosa y a la insulina. Los ratones se encontraban en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas

5.2. Pruebas metabólicas.

5.2.1. Prueba de tolerancia a la Glucosa IP

Antes de comenzar la prueba, se retiró el alimento a los animales 12 horas antes. Al momento de la prueba, se toma una muestra de sangre previo a la administración i.p. de glucosa a una dosis de 2g/kg de peso y se realizaron las mediciones de glucosa a los tiempos 0, 15, 30, 60 y 120 minutos, utilizando un glucómetro marca ROCHE.

Prueba de tolerancia a la Insulina IP. Dosis 0.6 u/Kg

Antes de comenzar la prueba, se retiró el alimento a los animales 4 horas antes. Al momento de la prueba, se toma una muestra de sangre previo a la administración i.p. de insulina a una dosis de 0.6 U/kg de peso y se realizaron las mediciones de glucosa a los tiempos 0, 15, 30, 60 y 120 minutos, utilizando un glucómetro.

5.2.2. Medición de la temperatura circadiana.

Mediante un termómetro rectal, se determinó la temperatura de 27 ratones (9 ratones por grupo) cada 4 horas, en los ZTs 0, 4, 8, 12, 16, 20.

5.3. Eutanasia.

Posteriormente, se separaron los grupos de 18 ratones en grupos de 3 ratones para sacrificarlos cada 4 horas, ZT (ZT0, 4, 8, 12, 16, 20). Se recolectan el suero y el TAP de todos los ratones, el TAP se lava en PBS 1x para guardarse a -70°C para su posterior análisis. El suero se centrifuga a 2500 rpm durante 15 min, se extrae el sobrenadante y se resguarda a -70°C.

5.4. Análisis transcriptómico

5.4.1. Extracción de RNA.

Se hizo una disección de tejido congelado, y se colocó en un tubo eppendorf de 1.25mL debidamente etiquetado. Se añadió 200µL de Trizol. Se trituró el tejido para generar una suspensión. Se dejó reposar durante 3 minutos. Posteriormente se añadió 40 µL de cloroformo y se mezcló durante 15 segundos. Se dejó reposar por 10 minutos. Se centrifugó a 10000 rpm por 20 min a 4°C. Con cuidado retiró el sobrenadante sin tocar la fase orgánica. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo debidamente etiquetado y se añadió 100µL de Isopropanol. Se mezcló ligeramente durante 5 segundos y dejar reposar por 5 minutos. Se centrifugó a 10000 rpm por 20 minutos a 4°C. Removimos el sobrenadante y conservamos el pellet. Se lavó el pellet con etanol al 75% tres veces. Se dejó evaporar casi por completo el etanol y se resuspendió en 30 µL de agua grado biología molecular. La concentración y pureza del RNA se midió un Nano drop Thermo-Scientific. Para el análisis de microarreglos se necesitó que las relaciones 260/280 y 260/230 fueran lo más cercanas a 2.0, lo que indica una pureza aceptable. Para los microarreglos se utilizó el chip Clariom D.

5.4.2. Análisis de microarreglos.

La síntesis de las sondas y la hibridación con los microarreglos se realizó en la unidad de transcriptómica del Instituto Nacional de Medicina Genómica. Se utilizaron 100 ng de RNA por muestra para obtener el cDNA con el kit GeneChip cDNA synthesis kit (affymetrix). Se utilizaron los microarreglos de última generación Clariom D (Affymetrix), para determinar el nivel de expresión de los genes de cada grupo. Los arreglos fueron escaneados en el GeneChip Scanner 3000 7G (affymetrix). Los archivos .CEL fueron utilizados para normalizar los valores de expresión y obtener los archivos .CHP con el programa Transcriptome Analysis Software 4.0. Para cada condición experimental

utilizamos 18 microarreglos de cada grupo, correspondientes a cada 3 muestras independientes por ZT.

5.4.3. Análisis bioinformático

Una vez obtenidos los datos de expresión, se preparan para obtener los parámetros circadianos. Mediante el software JTK [53], los datos se filtran para identificar las fluctuaciones en la expresión, buscando patrones para calcular los parámetros de amplitud, acrofase y periodo de oscilación. En base a esto, se tomaron en cuenta los genes que oscilan con una $P < 0.01$ [16]. Al final, se obtuvo un valor único de amplitud, acrofase y periodo para cada gen oscilante de cada grupo de estudio.

Posteriormente, se utilizaron plataformas en línea para analizar los datos obtenidos. Heatmapper se usó para realizar gráficos de calor que representan los niveles de expresión de los genes oscilantes y de amplitud de cada grupo. Para identificar tanto los genes comunes como los únicos en cada grupo se realizaron diagramas de Venn, para ello se utilizó el servidor Draw Venn. Para identificar los procesos biológicos más representados dentro de cada grupo, se realizó un análisis de enriquecimiento de vías, para ello, se utilizó el servidor DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarrays Analysis que toma como base una lista de genes para identificar las rutas que se encuentran mayormente representadas en dicha lista de genes partiendo de valores estadísticos que indican cuáles vías son las más representativas. Consideraremos como funciones identificadas aquellas que muestren un valor de P tras corrección por múltiples pruebas, de (False Discovery Rate), $P < 0.01$. Se utilizaron las bases de datos Gene Ontology Functional Properties, KEEG pathways.

Además, se analizó el cambio de amplitud en todos los genes circadianos. Mediante la fórmula de % de cambio, agrupamos los genes que disminuyen y/o aumentan de amplitud al comparar las condiciones SD a HF y HFR a HF y graficando los datos obtenidos. El grupo de genes obtenido a partir del porcentaje de cambio ya sean los genes que redujeron o incrementaron de amplitud SD a HF y HF a HFR, respectivamente, se analizaron mediante enriquecimiento de vías con el servidor DAVID para encontrar las vías que se enriquecen con estos grupos de genes. Para comparar la acrofase, se utilizaron gráficos con coordenadas polares para comparar los grupos y observar si hay

desfases en los picos de expresión de los genes se utilizó el programa Origin Pro 8.5. Los datos fueron visualizados mediante la construcción de redes funcionales utilizando el programa EnrichmentMap (University of Toronto) y la plataforma Cytoscape 3.7.1 (Agilent Technologies). Para identificar factores de transcripción y redes de regulación implicadas en los procesos alterados identificados en cada uno de los grupos, se realizó un análisis de promotores utilizando el programa iRegulon 1.3 y el Cytoscape 3.7.

6. Resultados.

6.1. Parámetros metabólicos

6.1.1. Peso corporal y consumo energético

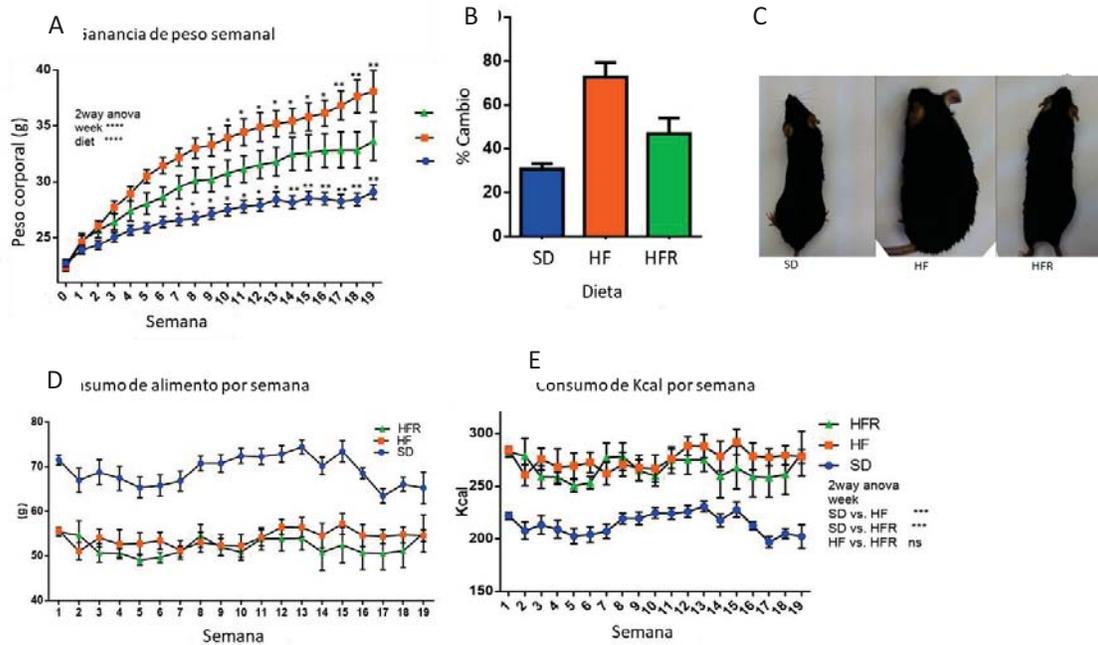


Figura 14. Peso y consumo de alimento semanal en los grupos de estudio. A) Protocolo de alimentación durante las 19 semanas. B) Ganancia de peso semanal en los grupos, C) Porcentaje de cambio en el peso de los ratones a la semana 19, diferencias significativas entre SDvsHF y HFvsHFR, D) Imágenes de los ratones de cada grupo a la semana 18, E) consumo de alimento y Al transcurrir las 19 semanas del protocolo alimentario (Figura 14A), los ratones SD presentan una ganancia de peso (31%), comparándolos con los ratones HF que tienen una ganancia de peso alrededor de 73%. Interesantemente, los ratones HFR presentan una ganancia de peso de aproximadamente 47%, que es mucho menor a los ratones HF (Figura 14B y C). Sin embargo, el menor peso corporal de los ratones del grupo HFR podría deberse a un menor consumo de alimento provocado por la restricción temporal de alimento. Por ello, se determinó el consumo semanal de alimento para determinar la ingesta de cada grupo. Los ratones SD consumen mayor cantidad de alimento durante las 19 semanas que duró el paradigma alimentario, comparado con los grupos HF o HFR (Figura 14E). De manera importante, los grupos alimentados con DG consumen aproximadamente la misma cantidad de alimento que los ratones del grupo HFR (Figura 14E) mostrando que, en cuanto a cantidad de alimento consumido por gramo, los

grupos alimentados con dieta hipercalórica (HF y HFR) consumen relativamente la misma cantidad. En este sentido, a pesar de consumir mayor cantidad de alimento, los ratones SD consumen menor cantidad de calorías (Figura 14F). De manera importante, los ratones que se alimentaron con dieta alta en grasa (HF y HFR), consumen la misma cantidad de energía a lo largo de la duración del protocolo, lo que demuestra que el efecto benéfico de menor ganancia de peso se debió a la DTR y no a un menor consumo de energía en el grupo HFR (Figura 14F).

6.1.2. Temperatura circadiana.

Uno de los mecanismos por el cual los mamíferos gastan energía es mediante la generación de calor. En roedores y en humanos, la grasa parda es el principal tejido productor de calor. Con la finalidad de determinar si existían efectos en la termogénesis en los grupos de estudio, determinamos la temperatura rectal de cada ratón. Se realizaron mediciones de temperatura rectal de todos los ratones cada 4 horas, a partir del ZT0 (Horario de encendido de luces). Todos los grupos mostraron mayor temperatura durante la noche en comparación con el día (Figura 15A). Interesantemente, este efecto oscilatorio se ve disminuido en el grupo HF, pues la temperatura, a lo largo del día se mantiene relativamente constante comparado con el grupo SD (Figura 15A). De manera importante, el grupo HFR mostró una oscilación de temperatura muy cercana al grupo SD, presentando incluso una mayor temperatura a ZT12 y ZT16 pero este aumento no es significativo. Estos resultados se confirman al calcular la amplitud de oscilación de la temperatura circadiana en cada uno de los grupos. Los grupos SD y HFR muestran una mayor amplitud al compararlos con el grupo

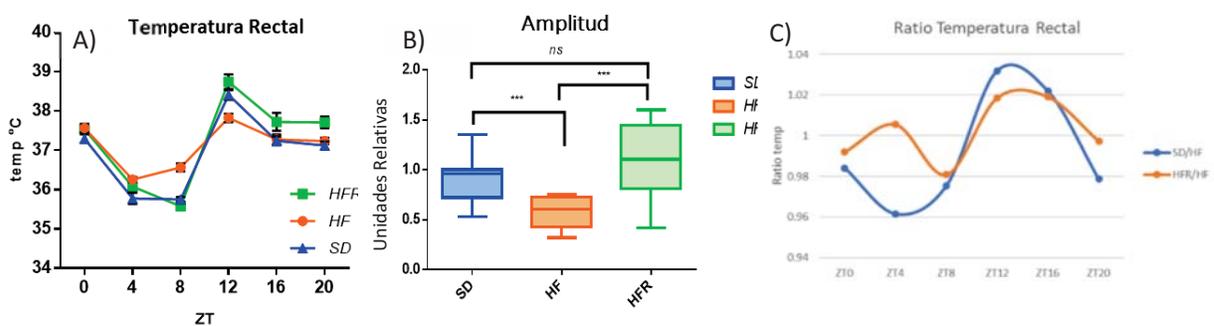


Figura 15. Temperatura corporal circadiana. A) Medición de temperatura corporal de los tres grupos a lo largo del día. B) Amplitud calculada a partir de la oscilación de la temperatura. C) Ratio de cambio de temperatura.

HF, y estos cambios fueron significativos, mientras que si comparamos los grupos SD y HFR no hay diferencias significativas. (Figura 15B). Con la finalidad de visualizar el patrón de cambio de la temperatura a lo largo de día entre los grupos SD y HF y los grupos HFR y HF, calculamos la relación de temperatura (ratio) comparando SD con HF y HFR con HF (Figura 15C), observamos que hay un patrón común en ambos ratios de cambio, mostrando que la dieta hipercalórica afecta de igual manera al grupo SD y al grupo HFR. Entonces podemos decir que la temperatura de los grupos SD y HFR oscila con un patrón similar.

6.1.3. Metabolismo de la glucosa.

Para determinar el efecto de la dieta restrictiva sobre el metabolismo de glucosa, realizamos pruebas de tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina. Como se puede observar, si bien, los ratones HFR presentan mayores niveles de glucosa con respecto a los ratones SD, estos presentan mejor tolerancia a la glucosa al compararlos con los ratones del grupo HF (Figura 16A y 16B).

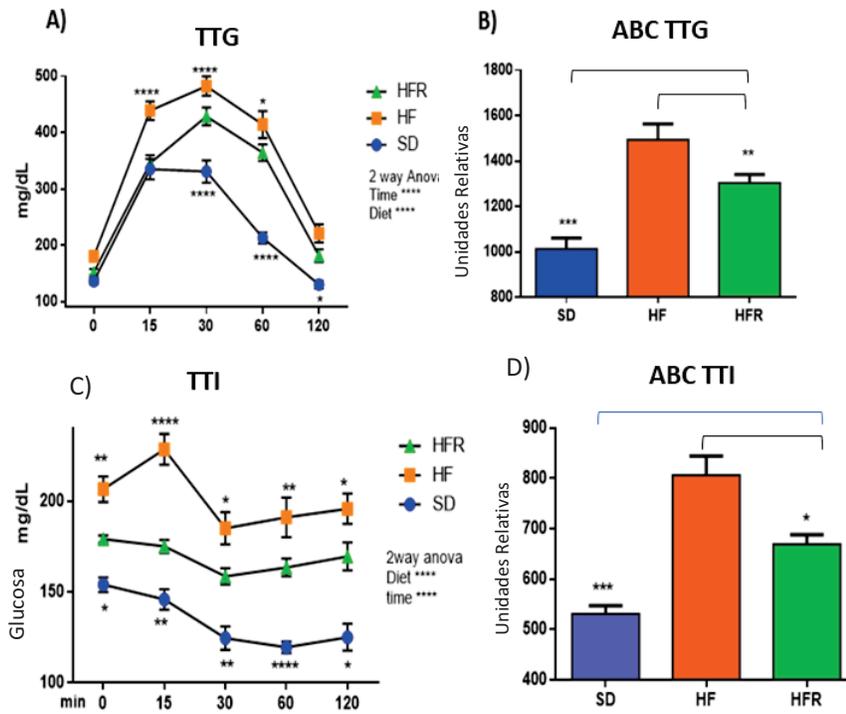


Figura 16. Prueba de glucosa e insulina. Curva de temporal de glucosa e insulina de los tres grupos de estudio con las significancias. Área bajo la curva de las pruebas de tolerancia a la glucosa e insulina.

Asimismo, al determinar la capacidad de la insulina para reducir los niveles de glucosa en sangre en los distintos grupos de ratones, observamos resultados similares. Los ratones alimentados con dieta HFR muestran mejor manejo de la glucosa en respuesta a la insulina, que los ratones HF, aunque los ratones SD muestran menores niveles de glucosa. (Figura 16C y 16D)

Para tratar de explicar los efectos benéficos de la DTR sobre el peso corporal, el metabolismo de glucosa y la temperatura, se procedió a realizar el análisis transcripcional en la grasa parda a partir del RNA. Una vez corroborado que el RNA cumple con las características necesarias (relación 260/230 >1.8 y RIN >7.0), se realizó el análisis de expresión circadiano para todos los grupos.

6.2. Resultados transcripcionales.

Mediante el cálculo de número genes que oscilan de manera significativa, observamos que la cantidad de genes oscilantes en el grupo SD (893) fue mayor que el grupo HF (321), demostrando que la DG provoca una disminución de más de la mitad en el número de genes oscilantes (Figura 17A). Sin embargo, en el grupo de animales HFR, observamos un aumento en los genes oscilantes HFR (686) al comparado con el grupo HF. Esto indica que la dieta temporal restrictiva de alguna manera recupera el número de genes oscilantes (Figura 17B). Para identificar si hay genes oscilantes que se comparten en los

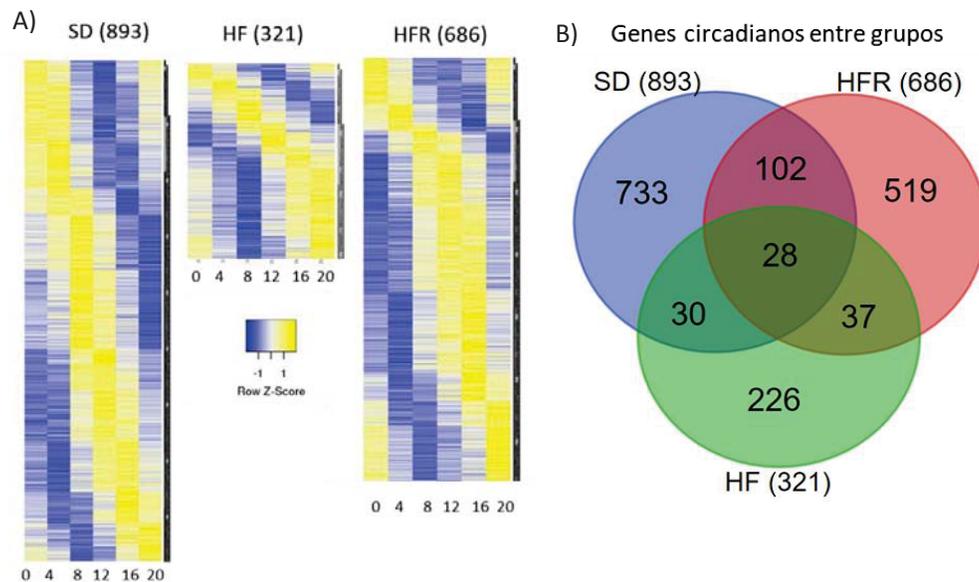


Figura 17. Expresión circadiana en los grupos de estudio y diagrama de Venn de los genes compartidos entre grupos. En el heatmap, cada renglón es un gen y cada columna es un ZT de sacrificio de los animales. El color azul significa que no hay expresión y el color amarillo representa que un gen se expresa.

grupos, se realizó un diagrama de Venn. De forma interesante, encontramos 28 genes que están dentro de la intersección de los 3 grupos, además, coherentemente, la mayoría corresponden a genes implicados en el control circadiano como, *Arntl*, *Clock*, *Ciart*, *Dbp* etc. Entre los grupos SD y el grupo HF, encontramos 30 genes que se comparten, lo cual sugiere que estos genes podrían estar relacionados con la condición de alimentación ad libitum. Por otro lado, entre los grupos HF y HFR identificamos 37 genes, los cuales podrían estar implicados o relacionados con el consumo de la dieta hipercalórica. Por último, entre los grupos SD y HFR encontramos un mayor número de genes, que corresponden a 102 genes y estos podrían estar relacionados con un mejor

control metabólico debido a la dieta temporal restrictiva. Posteriormente, se analizaron los parámetros circadianos de los genes oscilantes de los tres grupos. Para visualizar los valores de amplitud de la oscilación de la expresión de los genes, se realizó un mapa de calor, tomando como valor, la amplitud de expresión de los genes oscilantes de cada grupo y comparando los grupos entre sí (Figura 18A). Si tomamos como referencia el grupo SD, es evidente la oscilación de los genes, misma que se ve ausente casi por completo a comparar los mismos genes en el grupo HF, lo cual sugiere que la DG provocó una reducción en la amplitud de dichos genes. Esto no significa que no se expresen, significa que su expresión no fluctúa a lo largo del día de manera robusta. Al analizar el grupo HFR, se observó recuperación en la amplitud comparando los grupos HF y HFR, mostrando que la DTR contrarresta en cierta medida la disminución de la amplitud provocado por la DG. Al analizar la amplitud de los genes del grupo HF, podemos observar que son pocos los genes que comparten amplitud, tanto en el grupo SD como en el grupo HFR, indicando que los genes oscilantes del grupo HF son casi exclusivos de esta condición. Otra manera de visualizar este efecto es determinando el porcentaje de genes que incrementaron o disminuyeron su amplitud. Como se muestra en la figura 18B el 95% de los genes redujeron su amplitud al comparar el grupo SD vs HF, de manera similar, al comparar el número de genes con reducción de amplitud entre el grupo HFR vs HF encontramos alrededor de un 93% de genes. Estos datos sugieren que una de las causas principales por las que la dieta DG disminuye el número de genes que oscilan (Figura 18B) es por la reducción en la amplitud de los genes.

Con el fin de evaluar el cambio de amplitud, se midió la variación de amplitud, tanto en disminución como aumento y si no hubo cambio. Para esto se utilizó la fórmula de porcentaje de cambio (%cambio), obteniendo los genes que tienen variaciones de amplitud y los que no cambian. Teniendo en cuenta que más del 90% de los genes disminuyen amplitud (o suben de amplitud si se compara de HF a HFR o a SD), se analizó el enriquecimiento de las vías dentro de la lista de genes que bajan de amplitud, utilizando el servidor DAVID que utiliza la base de datos de Gene Ontology. Mediante un diagrama de Venn, observamos si existen vías que se comparten entre ambas listas de

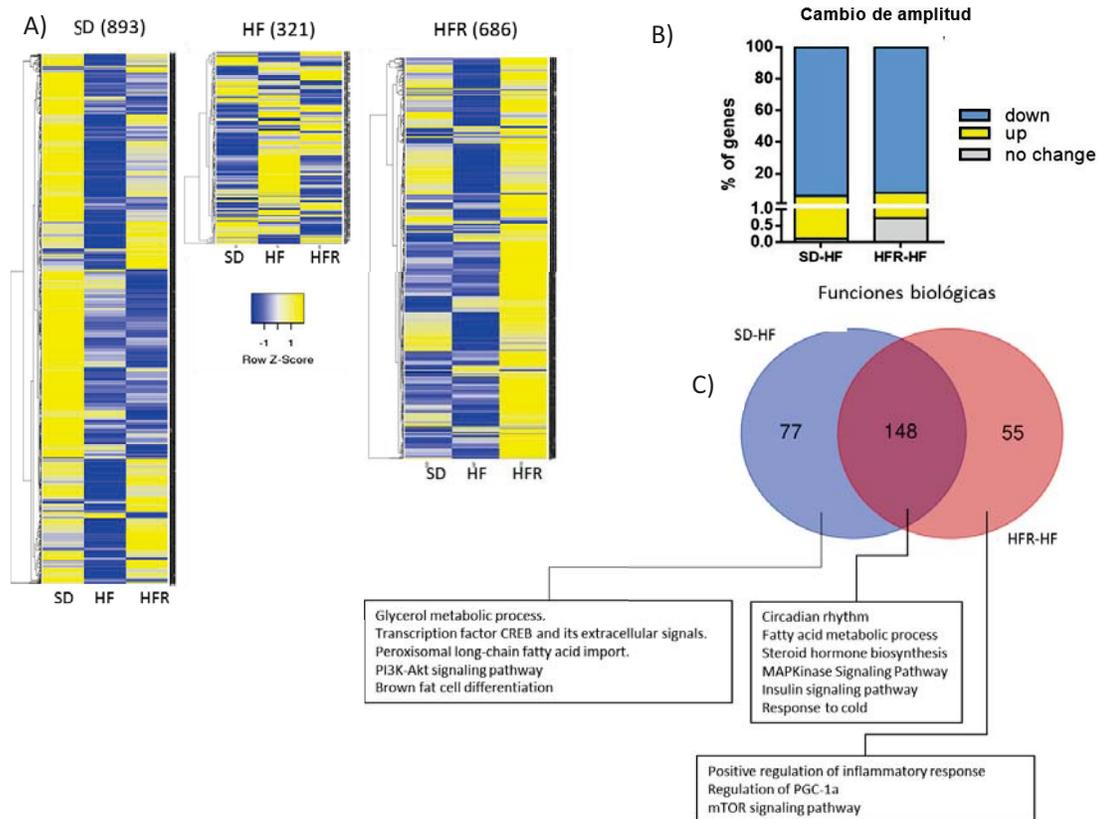


Figura 18. Amplitud de expresión circadiana de los genes se ve afectada por la DG. Los Heatmaps de amplitud muestran el efecto de los diferentes paradigmas alimenticios. La gráfica de barras muestra la cantidad de genes que cambian en el valor de amplitud ($\pm 20\%$) en porcentaje. Diagrama de Venn de las vías enriquecidas cuando se analizan los genes que bajan de amplitud al comparar SD y HFR contra HF.

genes. El número de rutas compartidas entre las listas es mayor que las rutas que no se comparten, es decir, que las listas de genes que disminuyen de amplitud de SDvsHF y de HFRvsHF tienen similitud. Dentro de las rutas compartidas, podemos resaltar los Ritmos circadianos, el metabolismo de los ácidos grasos, MAPK, Respuesta al Frio y regulación

negativa de mTOR. Algunas de las rutas destacadas que solo se encuentran en la comparación entre SD y HF, están: metabolismo del glicerol, PI3K/AKT, y diferenciación de adipocitos pardos. Por último, las rutas que solo se encuentran en HFRvsHF son: respuesta inflamatoria, regulación de PGC1a, y señalización de mTOR. Se seleccionaron las vías más representativas que se encuentran en la intersección del diagrama de Venn, para evaluar el parámetro circadiano de la amplitud, mediante un heatmap para observar la diferencia entre los grupos y acrofase, mediante un polar plot, para observar si existe un cambio de fase o algún retraso o adelantamiento del máximo de expresión. La primera vía estudiada fue la vía de los ritmos circadianos. Se realizó un heatmap de la amplitud de los genes implicados en la ruta y se compararon los grupos. En general, la pérdida de amplitud se presenta en el grupo HF, comparado con el grupo SD y HFR, de acuerdo con la escala de color, donde azul significa que hay menor amplitud y el color amarillo indica que hay mayor amplitud (Figura 19A y B). La DG promueve la disminución de la variación de los genes que participan en la regulación del reloj circadiano, lo cual podría provocar la alteración en la expresión de una gran variedad de genes que son regulados por el reloj circadiano. Por el contrario, la DTR induce a los genes del reloj a oscilar como en el grupo SD, lo que puede explicar los beneficios de la dieta temporal restrictiva. Por ejemplo, el gen *Arntl* que codifica para la proteína BMAL1, gen clave en la regulación circadiana, muestra una pérdida de amplitud en el grupo HF al compararlo con el grupo SD, indicando que la expresión de este gen se mantiene estable a lo largo del tiempo, lo cual contrasta con el grupo HFR, que muestra un aumento en la amplitud de la expresión del gen *ARNTL*, mostrando que la DTR fuerza la expresión cíclica de *Arntl* (Figura 19A y B). Debido a que el programa JTK identificó los genes cuya oscilación es significativa ($P < 0.01$) y que el valor de amplitud es un cálculo matemático que considera los 6 ZT's, la variación de la amplitud involucra a los 6 puntos del día. Pasando a la acrofase de los genes implicados en la vía de los ritmos circadianos, observamos que son pocos los genes que comparten acrofase entre el grupo SD y el grupo HF, es decir que la DG provoca un desfase en el punto de mayor expresión de los genes del reloj. Al comparar la acrofase del grupo SD y HFR notamos que varios genes comparten pico de

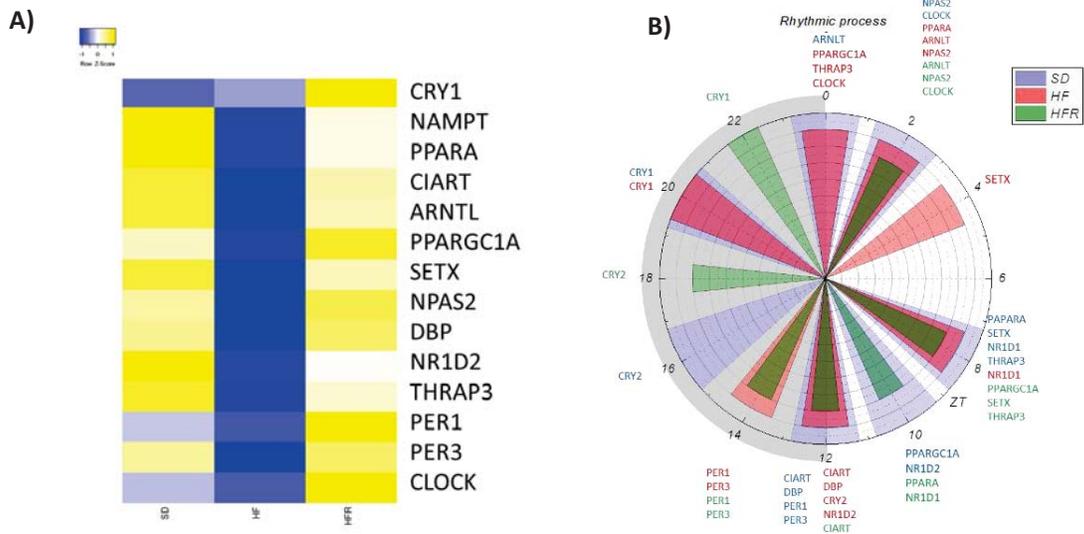


Figura 19. Conjunto de genes que enriquecen la vía de los procesos Rítmicos. Se evalúan los parámetros circadianos (amplitud y acrofase) de los genes. Cada columna representa un grupo de estudio. Al color amarillo representa que un gen tiene amplitud en la oscilación de la expresión y el color azul representa que no hay amplitud.

expresión, esto significa que la DTR corrige, en cierta medida, la expresión desfasada provocada por la DG. Por ejemplo, el gen Clock, que codifica para la proteína con el mismo nombre, que junto con BMAL1 son los actores principales de la regulación circadiana, en condiciones normales, Clock tiene su máximo de expresión a ZT2 en el grupo SD (Figura 19B), pero en condiciones de dieta alta en grasa ad libitum, el máximo de expresión se adelanta dos horas, es decir que la acrofase se presenta en ZT0 (Figura 19B), por el contrario, en el grupo HFR se muestra que la expresión de Clock es la misma que en grupo SD, es decir que la acrofase se presenta en ZT2, lo que indica que la DTR recupera la acrofase de Clock y esto puede provocar un mejor control metabólico (Figura 19 B). A pesar de que Clock sufre un desfase de SD a HF, Npas2, gen codificante de la proteína NPAS2, que es un análogo de Clock, no se ve afectado en la acrofase al comparar los tres grupos y en los tres grupos tiene una acrofase en ZT2 al igual que Clock, esto puede en cierta medida compensar el desfase de Clock visto en el grupo HF, sin embargo, la amplitud de la expresión circadiana de Npas2 se ve muy mermada en la condición de DG, este efecto se ve revertido en el grupo HFR, que recupera la amplitud de la oscilación de Npas2 (Figura 19B). Por otro lado, los represores Per1 y Per3, se desfasan dos horas si comparamos los grupos SD y HF, mismo comportamiento se observa en el grupo HFR, donde Per1 y 3 se expresan en ZT14 mientras que en el grupo

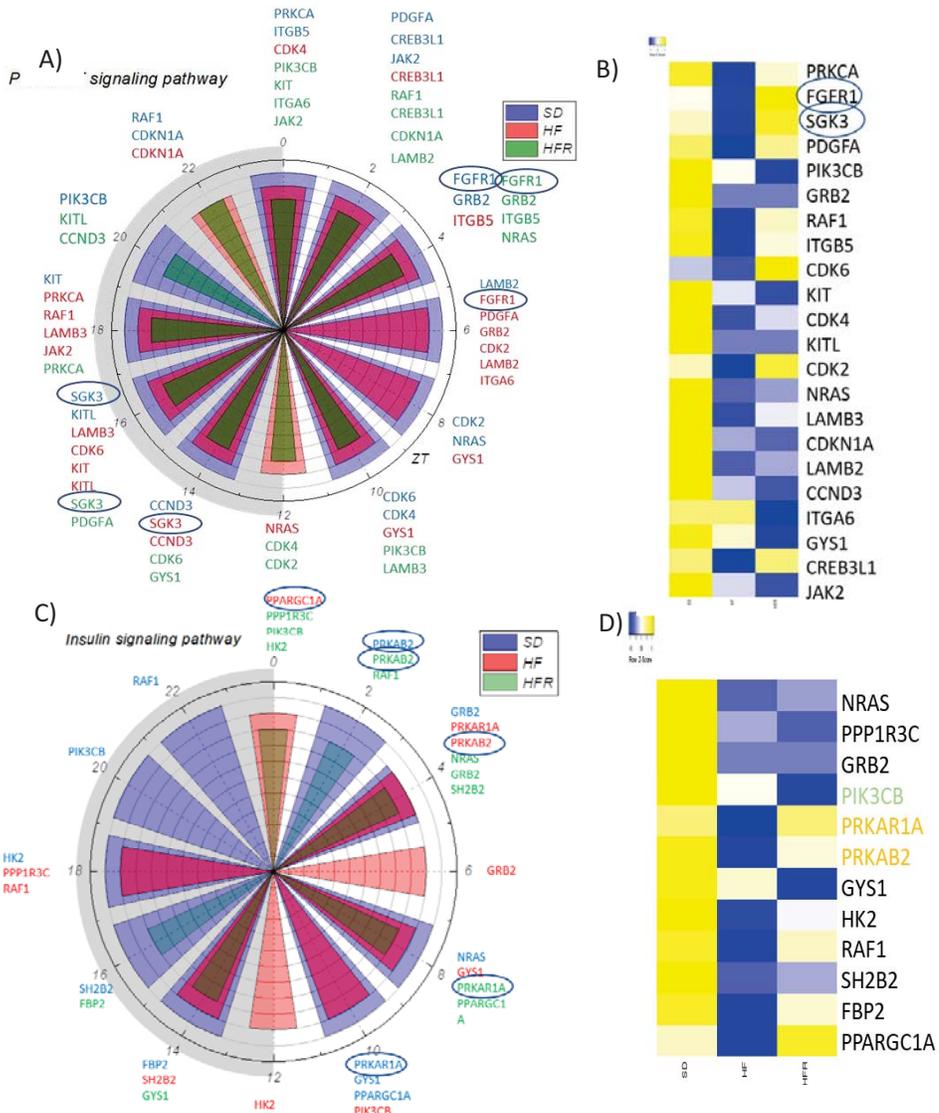


Figura 20. Genes que enriquecen las vías de la insulina y PI3K/AKT. Se observa la amplitud y acrofase de expresión de los genes. En el heatmap, cada columna es un grupo y cada renglón es un gen. El color amarillo significa que hay amplitud y el color azul significa que no hay amplitud.

SD se expresan en ZT12. Se puede inferir que la dieta alta en grasa provoca que Per 1 y 3 se desfase 2 horas en su acrofase. Otras de las vías que se alteran en común cuando comparamos SDvsHF y HFRvsHF son las vías de PI3K/AKT (Figura 20A) y la de la insulina (Figura 20C), que están muy relacionadas entre sí. Entre los genes que se encuentran en estas vías destacan genes que responden a los estímulos de insulina mediados por la vía PI3K/AKT, como son PRKC (vía PI3K/AKT), que codifica para una proteína efectora mTOR, cuya actividad es modulada por AKT, o los genes PRKAB2 y HK2 (vía de la Insulina), el 1ro es un gen que codifica para una subunidad de AMPK y el segundo es el gen que codifica para la enzima Hexocinasa 2. Hablando en términos circadianos, la amplitud de

los genes implicados en esta vía se ve disminuida cuando comparamos al grupo SD contra el grupo HF, lo que sugiere que la DG altera en cierta medida las vías de señalización moduladas por la insulina. También podemos observar que la DTR mostró una recuperación en la amplitud de los genes que se vieron afectados por la DG, mostrando una mejor señalización de la insulina promovida por la dieta temporal restrictiva. Otra vía importante para destacar es mTOR pues es un sensor nutricional muy importante y un factor clave en la regulación del metabolismo. Podemos encontrar que genes que conforman la vía de señalización de mTOR, como S6K y AKT2 se encuentran alterados por la DG, tanto en amplitud como en la acrofase (Figura 21C, D). El gen que codifica para S6K (RPS6KA2), normalmente se expresa en ZT2, pero en el grupo HF, sufre un desfase de 10 horas, teniendo una acrofase a ZT12. Por el contrario, en el grupo HFR, el mismo gen recupera la acrofase que se presentó en el grupo SD. En cuanto a la amplitud, la tendencia es la misma, pues la amplitud del gen RPS6KA2 se ve disminuida cuando se comparan los grupos SD contra HF, por el contrario, el grupo HFR mostró una pequeña recuperación de amplitud cercana a la amplitud presentada por el grupo control. S6K es uno de los efectores más relevantes del complejo mTORC1, entonces, la alteración de la acrofase y amplitud provocadas por la DG repercute sobre los metabolitos influenciados por S6K y que la condición de alimentación restringida temporalmente puede optimizar la función de la vía de mTOR al recuperar la amplitud y acrofase de los genes implicados en la vía. Otro gen que se ve afectado es CAB39, que es importante en la vía AMPK debido a que activa a LKB1 principal activador de AMPK. Cabe resaltar que AMPK inhibe la actividad de mTOR[54].

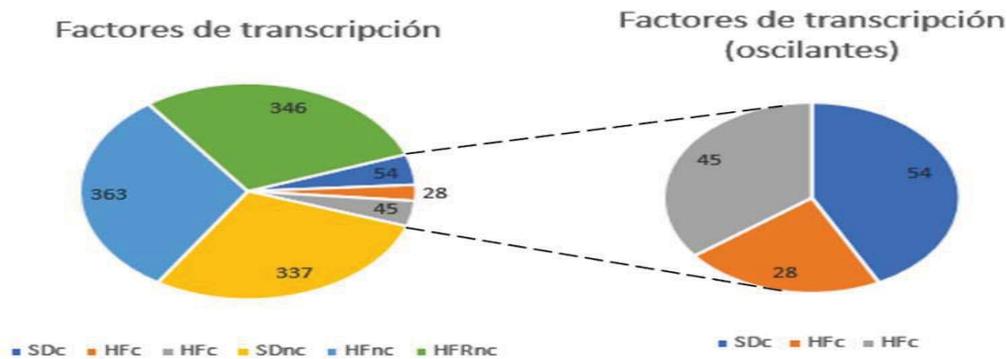


Figura 22. Número de factores de transcripción identificados.

identificar los factores de transcripción que potencialmente se encuentran modulando la transcripción de los genes que participan en las vías de señalización identificadas, observamos que, aunque solo una proporción de factores de transcripción oscilan, nuevamente la oscilación es más robusta en los grupos SD y HFR (Figura 22 y 23 A).

De los factores de transcripción que oscilan, en particular encontramos que los principales actores de la regulación de estas vías son pertenecientes a la familia de factores de transcripción “Forkhead transcription factors” (por su nombre en inglés). De

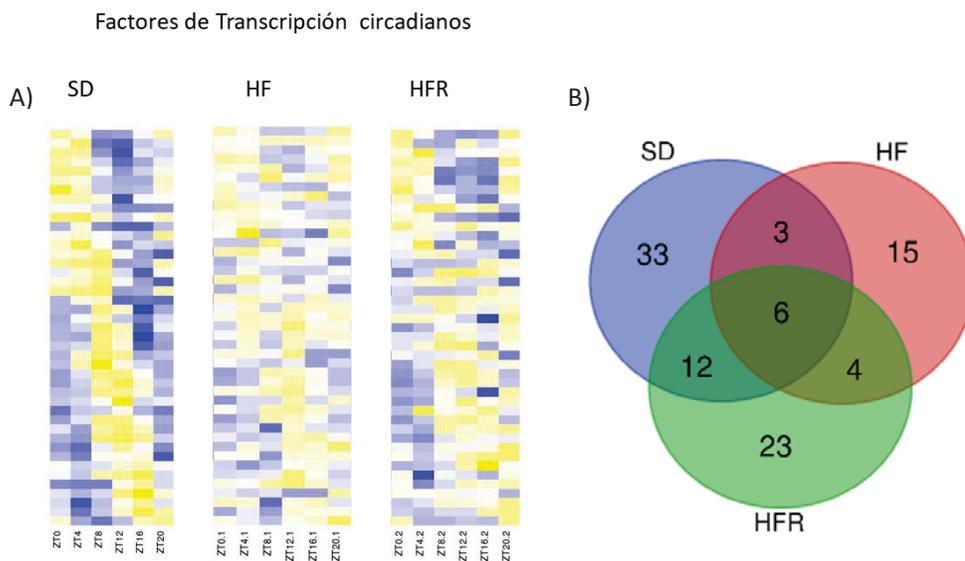


Figura 23. Heat map de los factores de transcripción oscilantes en los tres grupos de estudio. Se observa un patrón oscilatorio en el grupo SD a lo largo del día. Esta oscilación se ve alterada en el grupo HF. En el heatmap del grupo HFR se observa que un grupo localizado de FT recuperan la oscilación en la expresión vista en el grupo SD. Diagrama de Venn de los factores de transcripción circadianos en cada grupo. Genes oscilantes con una $P < 0.01$.

acuerdo con la red regulatoria (Figura 24) Foxo1 controla la transcripción varios genes implicados en las vías enriquecidas, como son Akt2, Pgc1a, Papara, que participan en las vías de PI3K/AKT, MAPK, mTOR, metabolismo de lípidos y genes relacionados con la termogénesis. Esto significa que los genes pueden aparecer en una o en varias vías enriquecidas y esto conlleva a que el FT como Foxo1 regule varias vías a la vez. Teniendo bajo su cargo una red de regulación que afecta de diferentes formas del metabolismo, Foxo1 presenta un patrón de expresión cíclico, teniendo como acrofase al ZT12 en los tres grupos de estudio, sin embargo, la amplitud se ve disminuida en el grupo HF, mostrando una menor oscilación de la expresión de Foxo1 (Figura 25B), teniendo como consecuencia que la regulación cíclica que ejerce Foxo1 sobre los genes ya mencionados se ve alterada, provocando un desajuste en la expresión de los genes que enriquecen las vías metabólicas y esto desemboca con la alteración metabólica. La actividad de Foxo1 en la grasa parda es clave para un mejor control de la termogénesis y metabolismo de glucosa, controlando la expresión diferencial de Ucp1, 2 y 3 (Figura 25E, F, G) y regulando la gluconeogénesis [55, 56]. Podemos decir que Foxo1 favorece el anabolismo, lo que coincide con su acrofase que ZT12 en el gráfico de expresión circadiana, que es la hora en que los animales comienzan a alimentarse y las vías anabólicas se ven activadas. Algunos de los principales genes termogénicos, Dio2 y Adrb3, muestran alteraciones por la dieta hipercalórica en el grupo HF (Figura 25H y I), por el contrario, en los ratones del grupo HFR recuperan parcialmente el patrón de expresión circadiana visto en el grupo SD, mostrando el efecto benéfico de la dieta restrictiva sobre los principales genes termogénicos del TAP.

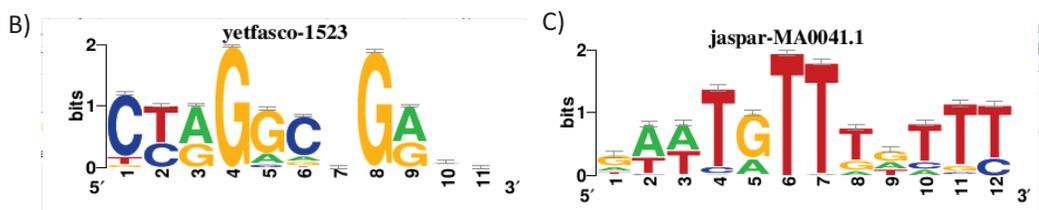
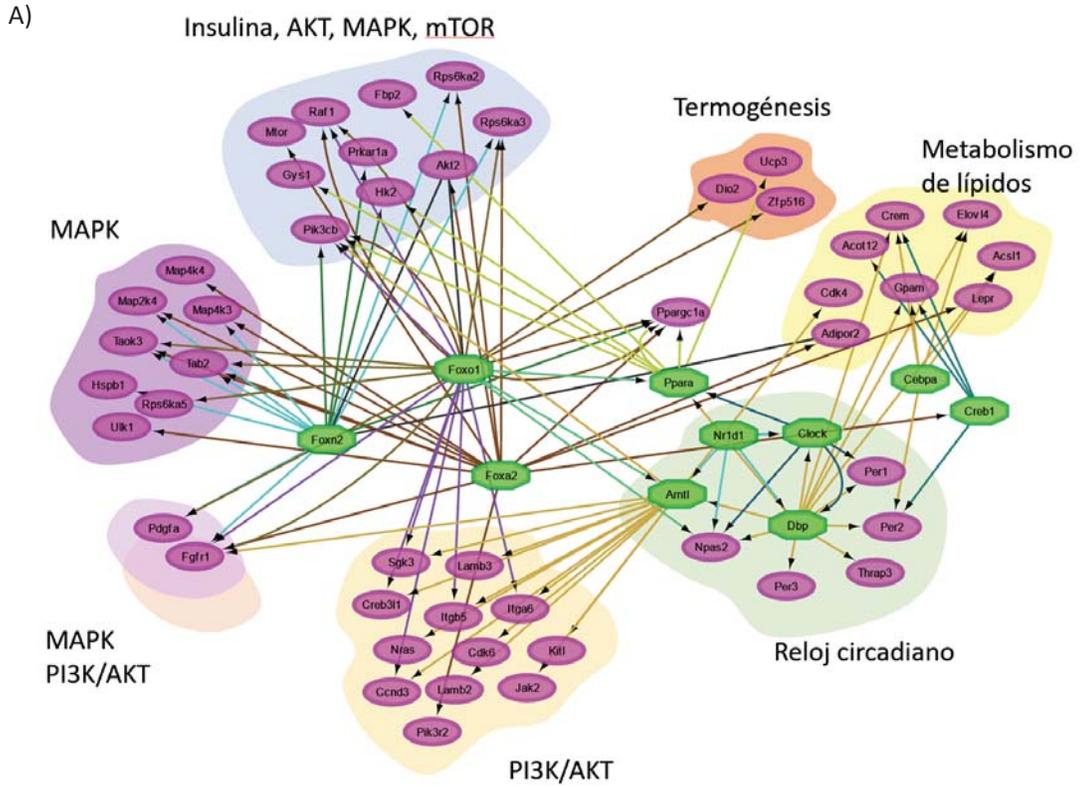


Figura 24. Red de regulación metabólica asociada a los factores de transcripción circadianos. El análisis de promotores de los genes que bajan de amplitud reveló ciertos factores de transcripción no identificados con anterioridad, como son Foxo1, Foxn2 y Foxa2, además de los genes pertenecientes al reloj molecular. Se muestra que Foxo1, Foxn2 y Foxa2 regulan una gran cantidad de genes en las vías de Insulina, PI3K/AKT, MAPK y genes implicados en la termogénesis. Además, factores de transcripción implicados en el metabolismo de lípidos como Creb1 y Cebpa también se ven implicados en la red regulatoria. Los factores de transcripción comparten regulación de algunos genes, mostrando redundancia, además de que los genes clave del reloj circadiano juegan un papel clave en la regulación de la expresión de genes circadianos. B) y C) Motivo dentro del promotor de Akt2 donde se une Foxn2 y Foxo1 respectivamente y promueven la transcripción de Akt2.

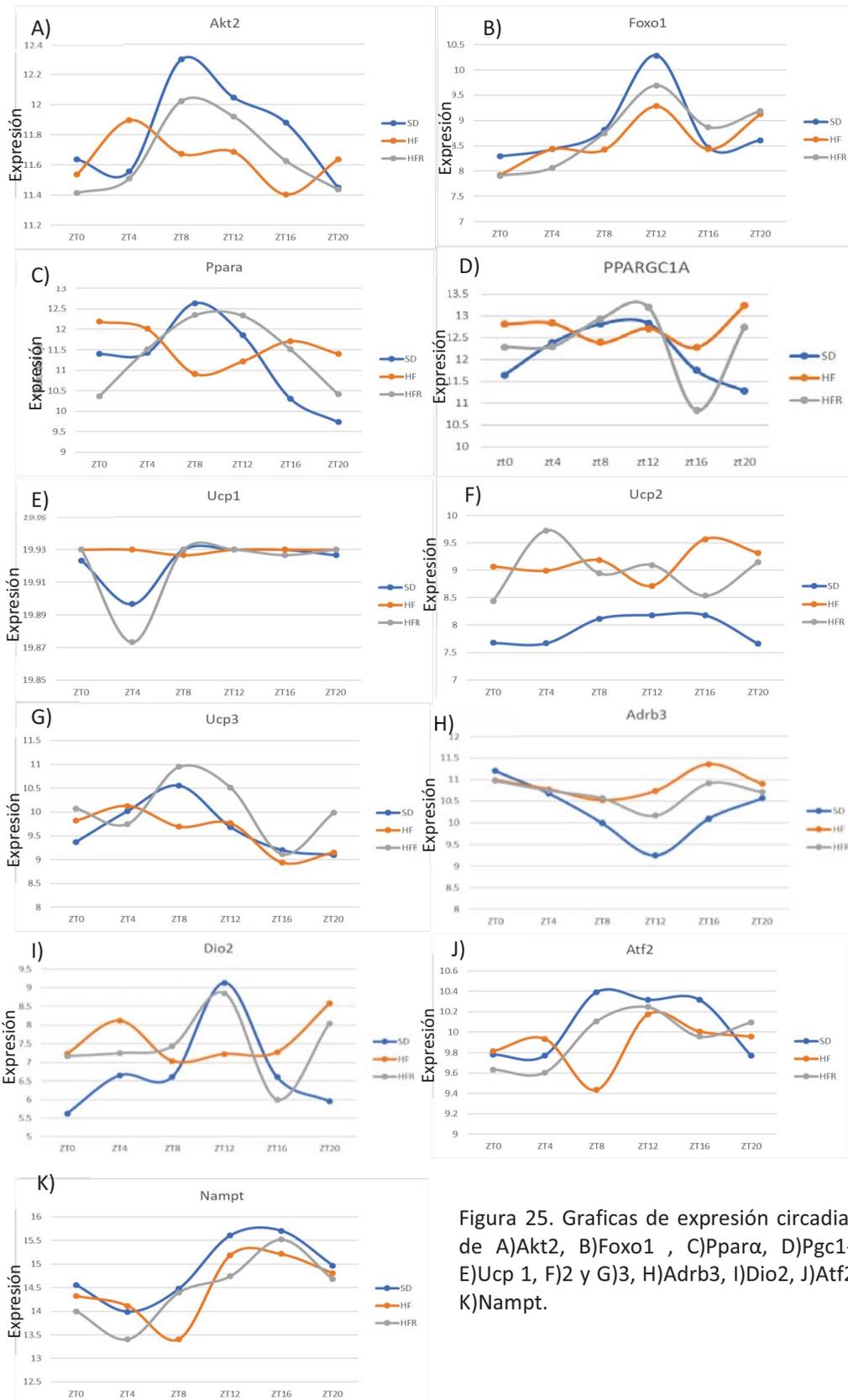
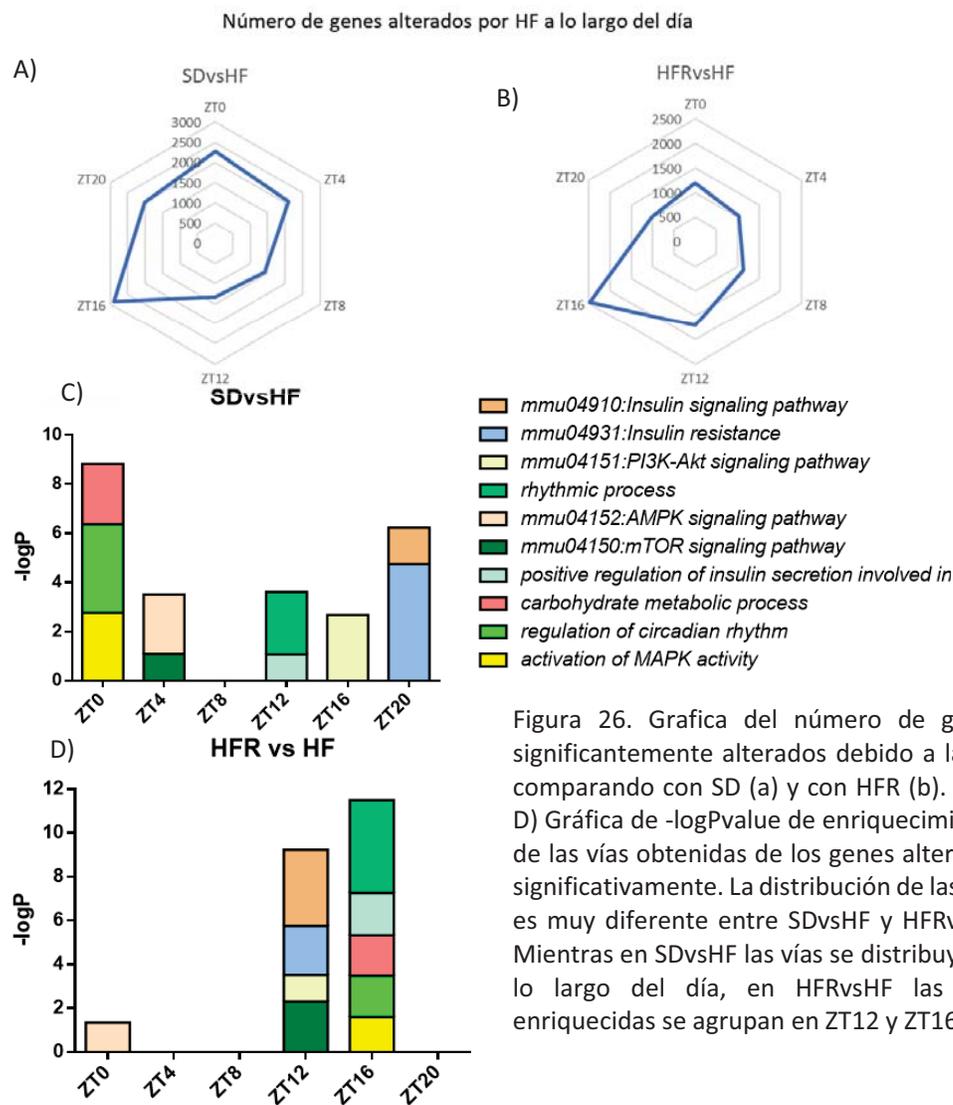


Figura 25. Graficas de expresión circadiana de A)Akt2, B)Foxo1 , C)Ppara, D)Pgc1- α , E)Ucp 1, F)2 y G)3, H)Adrb3, I)Dio2, J)Atf2 y K)Nampt.

Por último, se analizaron los genes alterados por la dieta alta en grasa. Teniendo en cuenta que el sacrificio de los animales se realizó a cada 4 horas, por cada grupo obtuvimos 6 transcriptomas. Para realizar un filtrado de genes, comparamos los genes codificantes de cada grupo, primero SD vs HF y después HFR vs HF, para obtener los genes que se ven alterados significativamente por la DG en cada hora de sacrificio. A partir de las listas de genes que se alteran, realizamos un análisis de enriquecimiento. El número de genes que se ven afectados en la expresión en el comparativo SDvsHF es mayor que el número de genes afectados que se obtiene al comparar HFRvsHF. De acuerdo con la gráfica de radar, en SDvsHF vemos que el mayor número de genes



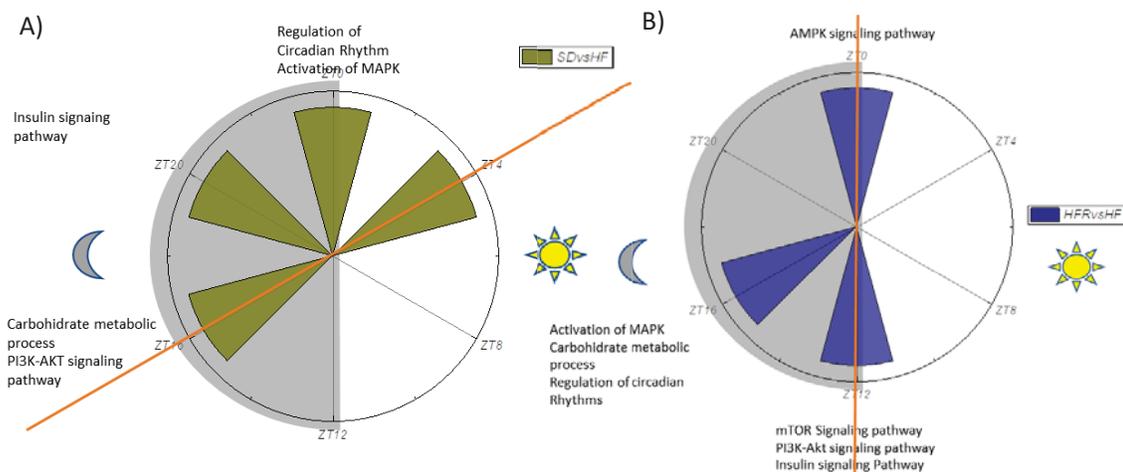


Figura 27. Distribución diurna de las vías enriquecidas con los genes en los comparativos SDvsHF y HFRvsHF. En los grupos alimentados ad libitum las vías se distribuyen a lo largo del día, al contrario del grupo alimentado con dieta restrictiva que diferencia las vías catabólicas y anabólicas en el día y la noche respectivamente.

afectados se ven en el ZT16, con alrededor de 3000 genes, sin embargo, a ZT0, ZT4 y ZT8 también hay gran cantidad de genes que se ven alterados (Figura 26A). Mientras que, en la gráfica HFRvsHF, la mayor cantidad de genes que se ven alterados por la DG es en el ZT16 (Figura 26B), indicando que la mayor cantidad de genes afectados por la dieta alta en grasa ad-libitum se expresan durante la noche, que es cuando los ratones están más activos.

Posteriormente, se revisó en cada ZT las vías enriquecidas resultantes, buscando las rutas metabólicas de interés. Se encontró que en los animales que se alimentan ad libitum (SD y HF), muestran una distribución de las vías metabólicas a lo largo del día cuando no hay un horario fijo de alimentación. Podemos ver como vías catabólicas y anabólicas se ven enriquecidas a la misma hora, como son la vía de señalización de AMPK y mTOR. Sin embargo, los ratones alimentados con dieta restringida muestran las vías enriquecidas concentradas en el ZT12 y 16 (Figura 26 C y D).

Podemos observar en la gráfica SDvsHF, que las vías se distribuyen tanto en el día como en la noche y no hay distinción entre vías anabólicas y catabólicas. Por el contrario, en la gráfica HFRvsHF, se muestra una división de las vías en el día y la noche, además de que las vías catabólicas y anabólicas se encuentran mayormente enriquecidas en el periodo de luz y de oscuridad respectivamente (Figura 27A, B). Sin embargo, para

corroborar el efecto de la HF sobre la expresión de los genes en los grupos SD y HFR, evaluamos el ratio de cambio en SD y HFR respecto a HF a lo largo del día. El ratio circadiano calculado de SDvsHF y HFRvsHF de genes clave se graficó y se compararon mediante una correlación de Pearson, con el objetivo de mostrar que tan similar es el efecto de la DG sobre el gen en el grupo SD y en el grupo HFR. Tanto en la gráfica de ratio de cambio de mTOR como de AKT2, los grupos comparado SDvsHF y HFRvsHR muestran un patrón de cambio similares y cuyo valor de correlación es 0.97964273, indicando que la DG afecta de forma similar los genes de mTOR y Akt2. Además, los factores de transcripción Foxa2 y Foxn2 muestran un ratio de cambio con patrones muy relacionados mostrando que la DG tiene efectos similares en el grupo SD y HFR.

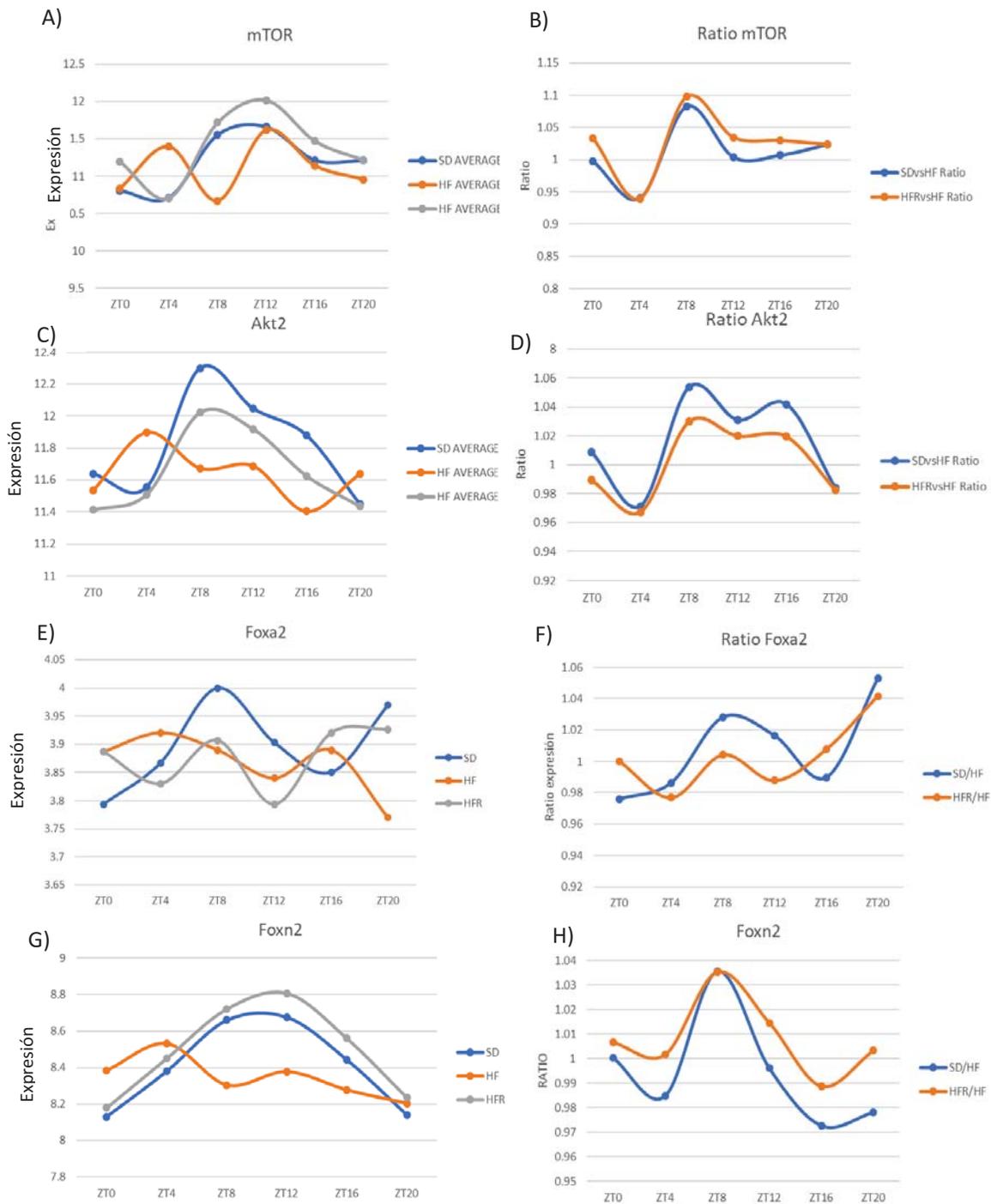


Figura 28. Ratio y expresión circadiana de A y B) mTOR, C y D)Akt2, E y F)Foxa2 y G y H)Foxn2. El cambio provocado por la dieta alta en grasa en la expresión circadiana de los genes mTOR, Akt2, Foxa2 y Foxn2, en el grupo SD es muy similar al efecto que se observa en el grupo HFR, mismo que correlaciona con lo observado en la gráfica de expresión circadiana para cada gen.

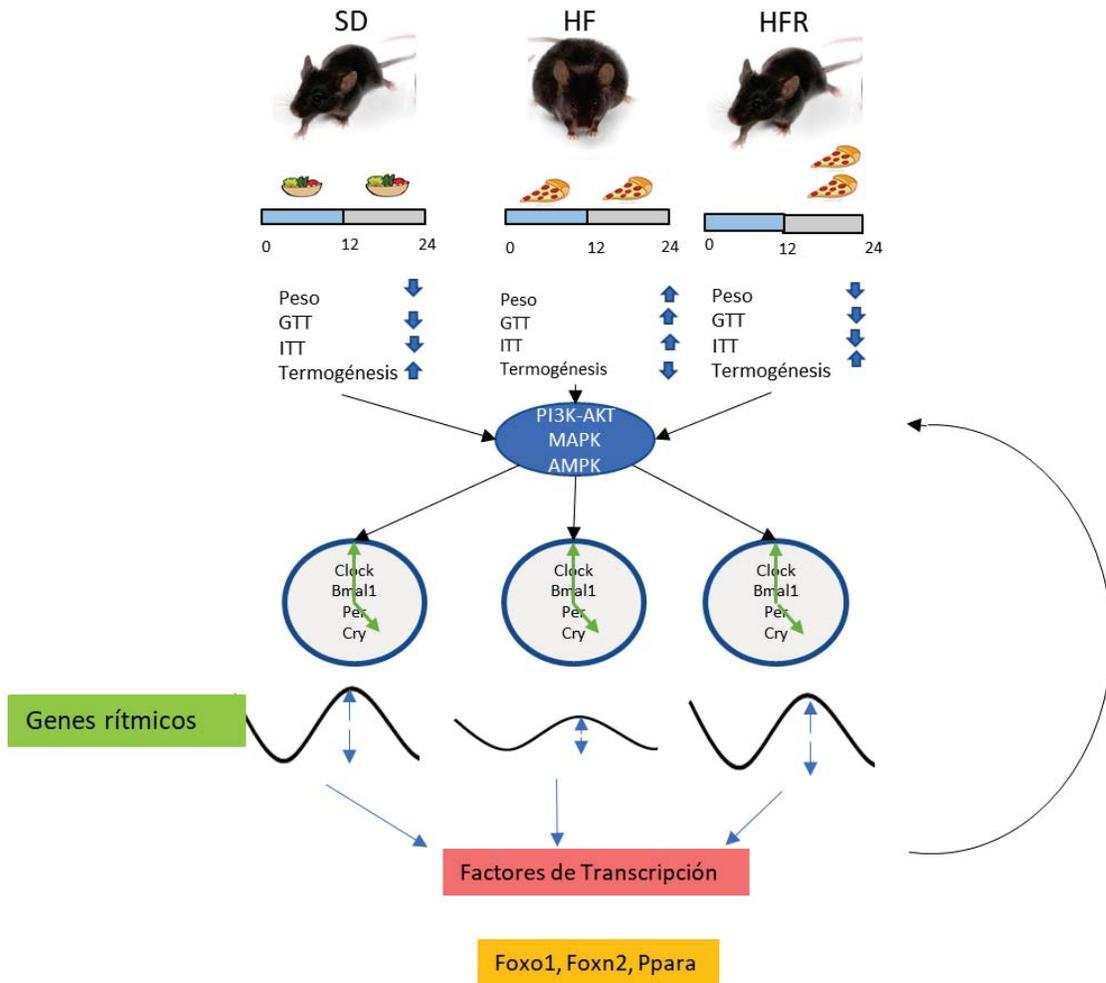


Figura 29. Los nutrientes modulan el reloj molecular del TAP a través de los sensores nutricionales. El efecto nocivo en el metabolismo provocado por la dieta alta en grasa ad libitum se ve disminuida por la dieta temporalmente restrictiva. Los nutrientes modulan el reloj molecular del TAP a través de los sensores nutricionales, que responden a los niveles energéticos modulando su actividad. Los sensores nutricionales regulan la actividad de genes clave del reloj, lo que impacta de forma directa los genes que son regulados por el sistema del reloj circadiano. Dentro de los genes controlados por el reloj, se encuentran factores de transcripción como Foxo1, Foxn2, y Ppara que regulan la expresión de gran variedad de genes clave en el metabolismo.

7. Discusión.

A nivel mundial, el consumo de dieta hipercalórica es un problema muy difícil de controlar, debido a que es de fácil acceso y también al poderoso componente hedónico asociado a los alimentos altamente palatables. Por eso, es de suma importancia, encontrar nuevas estrategias y tratamientos, además de la dieta balanceada y el ejercicio que ya se utilizan, sin embargo, la principal desventaja es la difícil adherencia causada por la presión social y los hábitos, a los regímenes alimenticios y físicos saludables. La dieta temporal restrictiva ha mostrado ser una estrategia viable, tanto en animales de laboratorio como en humanos, debido a que es capaz de conferir protección al desarrollo de problemas metabólicos asociados a la dieta alta en calorías [35, 40]. Estudios realizados en ratones, han mostrado que la DTR protege contra el desarrollo de problemas metabólicos. En particular en el hígado previene la generación de esteatosis hepática y a nivel fisiológico, la resistencia a la insulina, y optimiza metabolismo de ácidos grasos, pues enzimas clave como Fasn y Scd1 y Lipc se ven aumentadas en la DTR. También se mejora el metabolismo de la glucosa, reduciendo el nivel de gluconeogénesis, y aumentando el catabolismo de la glucosa. Esto se refleja en un aumento de los metabolitos del ciclo de Krebs, malato, fumarato, sugiriendo que el piruvato la entrada de piruvato al ciclo de Krebs está aumentada [35]. Sin embargo, a pesar de que el hígado muestra cambios en el metabolismo de glúcidos y lípidos por la DTR, el hígado en contraste con el TAP, no tiene la misma capacidad catabólica que este último. Además, diversos estudios han demostrado que la activación del TAP en ratones provoca efectos benéficos en el peso corporal y en el metabolismo de glúcidos. Así mismo, es importante resaltar, que el TAP como otros tejidos periféricos, está controlado por el reloj circadiano tanto a nivel central como por su reloj interno [49, 57]. En este sentido, en el hígado, se ha demostrado que los nutrientes pueden actuar como zeitgebers, ya sea por la restricción temporal o por el aporte calórico [16, 35], por el contrario, son pocas las pistas que se han encontrado en el TAP. REF

Por esta razón decidimos poner a prueba el modelo de DTR en ratones alimentados con dieta alta en grasa a lo largo de 19 semanas, para determinar si la grasa parda podría estar participando en los efectos benéficos de la DTR a nivel fisiológico, revisando el peso corporal, el metabolismo de la glucosa y la temperatura. Además, explorando los

mecanismos moleculares implicados, mediante el análisis del transcriptoma circadiano de la grasa parda, y así para poder explicar un posible mecanismo que regule la recuperación observada en el grupo alimentado con la dieta temporalmente restrictiva.

Nuestros resultados muestran que la sola restricción alimenticia, es capaz de aumentar el gasto energético de los ratones, ya que después de 19 semanas del protocolo alimenticio, los ratones alimentados durante los ZTs 12 a 24, es decir durante el periodo de actividad, estos ganan menos peso que los animales alimentados ad-libitum. De manera importante, el consumo de kcal fue el mismo entre estos grupos, lo cual sugiere que la reducción en la ganancia de peso fue mediada por un mejor control en el balance energético. Evidentemente, el grupo de los ratones alimentados con dieta SD o norma calórica mantuvieron un menor peso en comparación con los grupos alimentados con dieta hipercalórica, pero no necesariamente por un mejor control metabólico ya que estos animales consumieron una menor cantidad de calorías (Figura. 14A).

Existen diversos reportes que muestran que la dieta HF es capaz de generar problemas en el metabolismo de la glucosa en ratones [58]. Por ello, para determinar si en nuestro protocolo, la sola restricción de temporal de alimento era capaz de mejorar el metabolismo de la glucosa, realizamos pruebas de tolerancia a la glucosa (TTG) y de sensibilidad a la insulina (TTI). De manera importante, la restricción temporal de alimento también promueve un mejor metabolismo de la glucosa. En ambas pruebas (TTG y de TTI), observamos que los animales del grupo HFR, mostraron menores niveles de glucosa a lo largo de las pruebas, al compararlos con los animales del grupo DG. Si bien, los ratones del grupo SD siempre mostraron menores niveles de glucosa que el grupo HFR, el hecho de que los ratones del grupo HFR mostraran menor nivel de glucosa que los ratones HF, muestra que la sola restricción de temporal de alimento promueve un mejor control del metabolismo de la glucosa, independientemente del contenido calórico (Figura. 16A). Estos resultados coinciden con otros reportes que muestran que ratones alimentados únicamente durante la noche muestran una mejora en comparación con ratones alimentados ad-libitum [23, 35, 40, 59]. La glucosa es una fuente de energía necesaria para el organismo, ya que su catabolismo desencadena en la síntesis de ATP en un estado energético negativo, al contrario, si hay exceso de ATP, el catabolismo de la glucosa se detiene por la inhibición de la enzima limitante de la

glucolisis, la fosfofructocinasa-1. [60]. Los niveles elevados de glucosa del grupo HF tanto basales como posteriores a la administración de glucosa i.p., se puede atribuir a un desbalance en la acción o producción de la insulina provocada por la DG ya que la glucosa no estaría siendo absorbida adecuadamente por los distintos tejidos. Esta noción se apoya con el experimento de IST, ya que aún con la misma dosis de insulina los animales del grupo HFR responden mejor, con una disminución más rápida de los niveles de glicemia (Figura 16). El mejoramiento en el control metabólico causado por la restricción temporal de alimento podría ser causada por un aumento en la actividad locomotriz de los ratones, sin embargo estudios realizados, han demostrado que los animales sometidos a restricción temporal de alimento no son más activos que los animales alimentados ad libitum[39]. Por ello, los efectos benéficos de la DTR, no se debe a un aumento en el gasto energético medido por la actividad física de los ratones al aumentar la actividad muscular. Otro tejido aparte del músculo con una gran capacidad catabólica es el tejido adiposo pardo. Diversos estudios en roedores y en humanos han demostrado que el tejido adiposo pardo es capaz de reducir el peso corporal, así como los niveles de glucosa en sangre, además existen evidencias que sugieren la restricción temporal de alimento podría aumentar la actividad de la grasa parda[35]. Por otro lado, varios reportes han demostrado que el reloj circadiano juega un papel central en la regulación de la grasa parda [49, 61], además se ha observado que la activación del tejido adiposo pardo controla los niveles de glucosa de manera circadiana en humanos [62].

Como esperábamos, cuando determinamos la temperatura corporal en cada uno de los grupos de ratones, observamos que, en todos se presenta fluctuaciones circadianas de temperatura, (Figura 15 A, B) [61, 63, 64]. Sin embargo, los ratones del grupo HF mostraron una disminución en la oscilación circadiana, es decir una reducción de la amplitud. Resultados similares han sido reportados en otros trabajos, indicando que ratones alimentados con dieta hipercalórica muestran una reducción en la variación de la temperatura corporal a lo largo del día, en contraste con los ratones alimentado con dieta estándar [63]. De manera importante los ratones del grupo HFR presentaron el mismo nivel de amplitud que los ratones del grupo SD. Estos resultados nos sugerían que uno de los mecanismos implicados en el mejoramiento de metabolismo, es el

mejoramiento y/o aumento de la termogénesis y, por ende, de adaptaciones funcionales en el tejido adiposo pardo de los ratones sometidos a una restricción temporal de alimento. Por ello, decidimos determinar los niveles de expresión circadiana de cada uno de los genes codificantes en el tejido adiposo pardo mediante estuOIDS de transcriptoma, para identificar rutas implicadas en el mejoramiento metabólico observado en el grupo de ratones HFR y explorar a nivel molecular cuál podría ser el papel de la grasa parda en los efectos benéficos de la restricción temporal de alimento medido por los nutrientes como zeitgebers.

Al determinar el número de genes que oscilantes en cada grupo, mediante un cálculo estadístico [53], observamos una dramática disminución en el número de genes en el grupo HF al compararlo con el grupo SD (Figura 17A) lo cual demuestra que la dieta hipercalórica, tal y como sucede en hígado, [16, 35] en la grasa parda también reduce el número de genes que oscilan. Asombrosamente, el grupo HFR a pesar de recibir el mismo número de kcal que los ratones del grupo HF, estos muestran un aumento del doble de los genes que oscilan con respecto a los ratones HF (figura 17A). En ese momento no contábamos con pistas de si este efecto estaba relacionado con los beneficios metabólicos mostrados en el grupo HFR. En hígado se han realizado estuOIDS similares y se ha mostrado que la HFR previene la reducción en la amplitud de genes oscilantes provocada por la HF. En particular, se ha observado que genes clave en la regulación del reloj circadiano como Clock, Bmal1, además de genes que codifican para enzimas clave para la gluconeogénesis como Fosfofructocinasa-1 (Pfk1), Glucocinasa (G6pc) y metabolismo de lípidos como sintasa de ácidos grasos (Fasn) y Lipasa C (Lipc), muestran oscilaciones más robustas, lo cual está implicado con el mejoramiento del control metabólico de la glucosa y de lípidos [35]. Dadas las diferencias funcionales entre el TAP y el hígado, como la gluconeogénesis exclusiva del hígado y la termogénesis por el desacoplamiento de la cadena respiratoria en TAP, nosotros esperábamos encontrar cambios en otras funciones que explicaran el mejoramiento del balance energético [35]. Para identificar las funciones biológicas que podrían estar alteradas entre los conjuntos de genes que oscilan en cada grupo de animales realizamos agrupamientos funcionales. Como era de esperar, la mayoría de los 28 genes oscilantes comunes entre los tres grupos correspondieron con genes implicados en el reloj molecular (Figura 17B). Esto

indica que los genes del reloj mantienen su oscilación independientemente de los zeitgebers externos y/o nutrientes. Sin embargo, cuando evaluamos los parámetros circadianos “amplitud” y “acrofase”, observamos que el grupo HF altera el patrón de oscilación al reducir la amplitud de la expresión de los genes controlados por el reloj, esto coincide con lo encontrado por Hatori et al, que muestra que la HF disminuye la amplitud de la oscilación de la expresión de los CCG’s en hígado [35, 40]. Al analizar el cambio de amplitud de SD hacia HF y de HFR hacia HF, en ambos casos observamos que la gran mayoría de los genes (alrededor del 90%) presentan una disminución en la amplitud por efecto de la dieta HF (Figura. 18A). Debido a esto, decidimos identificar que vías metabólicas y/o funciones biológicas estaban alteradas por la reducción de amplitud en la oscilación y que por ende estaban implicadas en los efectos metabólicos observados.

Para esto se realizó un análisis de enriquecimiento de los genes que bajan de amplitud considerando un valor de corte a partir del 20% de cambio de amplitud. Nosotros razonamos que la reducción en la amplitud por la dieta HF (o aumento de amplitud por las dietas HFR o SD) podrían estar alterando funciones biológicas en común entre los grupos HFR y SD a causa de la dieta HF ad-libitum. Por ello, analizamos cuáles eran las funciones biológicas comunes entre los genes que bajaron su amplitud en ambos comparativos (SDaHF y HFRaHF). De manera interesante, encontramos un mayor número de vías compartidas que vías exclusivas en cada grupo. Entre las vías comunes y más enriquecidas encontramos, ritmos circadianos (Figura. 19), PI3K/AKT (Figura. 20A), insulina (Figura. 20B), y MAPK (Figura. 21A) y MTOR (Figura. 21B).

La vía de la MAPK está considerada como una vía central para el control del metabolismo, ya que su actividad es regulada por la insulina en respuesta a un aumento de nutrientes disponibles [65]. Existen tres variantes de la vía de MAPK, que se diferencian por las moléculas efectoras y por las moléculas blanco JNK, p38 y ERK. p38-MAPK es una vía de señalización importante para la absorción de la glucosa, ya que promueve la transcripción de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT4, indispensables para el metabolismo de la glucosa [66]. En el caso de JNK1/2, datos experimentales muestran que su eliminación en hígado provoca protección contra el desarrollo de sobrepeso y obesidad en ratones alimentados con dieta hipercalórica y

potencia la sensibilidad a la insulina [67]. Por último, ERK muestra que es relevante para el metabolismo de la glucosa debido a que en ratones KO para ERK2 en hígado, alimentados con dieta hipercalórica, se presenta intolerancia a la glucosa y menor sensibilidad a la insulina [68]. En la grasa parda, se ha visto que MAPK es un regulador central de la transcripción de UCP1, dependiente de AMP cíclico. Esto se logra a través de la activación de los reguladores transcripcionales activador 2 (ATF-2), PPAR α y PGC-1 α que modulan la transcripción de UCP1 en el TAP [69]. En este sentido, nuestros resultados muestran que ATF2, PPAR α y PGC1 α muestran perfiles de expresión circadiana similares entre los grupos SD y HFR (Figura 25J, C y D). Aunado a esto, el perfil de expresión del gen termogénico UCP1 también muestra similitud entre el grupo HFR y SD (Figura 25E). Aunque esto no significa una relación causa efecto en la expresión de UCP1, si podemos inferir que, dada la gran cantidad de respuestas metabólicas mediadas por estos reguladores transcripcionales clave, estos podrían estar jugando un papel central en el mejoramiento del control metabólico mediada por la restricción temporal de alimento [16, 35, 40].

Otra vía que identificamos en el grupo de genes cuya amplitud no disminuyó por la restricción temporal de alimento fue mTOR. Esta, es una cinasa integrada en un complejo multiprotéico, que integra nutrientes, estrés, crecimiento y el contenido energético para balancear vías anabólicas y catabólicas [11]. Cuando hay un aumento de nutrientes, mTOR se activa, y promueve vías anabólicas [70]. De manera interesante a nivel transcripcional mTOR presenta el mismo perfil entre los grupos “saludables” es decir HFR y SD (figura 27A) Este efecto se puede ver más claramente al calcular el perfil de cambio entre SD y HFR con respecto al grupo HF calculado la relación en el nivel de expresión a cada ZT (Figura 27B).

Otra cinasa de suma importancia en el control del metabolismo es AKT2. Esta cinasa pertenece a la vía de señalización PI3K/AKT que se ve activada por la insulina que regula una gran cantidad de vías metabólicas. Entre estas vías tenemos que AKT regula la glucólisis, esto se debe a que regula la expresión y función de la Glucocinasa, además de que regula a la enzima reguladora de la glucólisis que es la fosfofructocinasa-1 (Pfk) [71]. Nuestros resultados muestran que AK2 también muestra mayor amplitud y perfil de expresión circadiana en los ratones del grupo HFR en contraste con el grupo HF ad-

libitum, además muestra un cambio de fase de alrededor de 4 hrs (Figura 27C). Debido a que AKT juega un papel central en el proceso de señalización de la insulina, nosotros consideramos que los efectos fisiológicos observados en el grupo HFR (nivel de tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina mayor que el grupo HF), que son comparables con los ratones alimentados con dieta estándar, podrían deberse al menos en parte a la recuperación transcripcional de AKT2 en los animales del grupo HFR. Por otro lado, AKT no solo podría estar jugando un papel en el control del metabolismo de la glucosa, sino además en la sincronización del reloj molecular, tal vez de manera directa por la insulina o bien de manera indirecta por los nutrientes como zeitgebers. Esto debido a que estudios recientes han demostrado que AKT2 es capaz de modular la actividad de CLOCK mediante su fosforilación en el residuo Ser-485, y como consecuencia, inhibiendo su migración hacia el núcleo celular[72]. Así mismo, existen evidencias que muestran AKT fosforila a BMAL en la Ser-42, lo cual tiene como consecuencia, la disociación de BMAL a sus secuencias de DNA blanco, y subsecuentemente su exclusión del núcleo [73]. Evidentemente esto tiene implicaciones funcionales muy importantes: se puede generar un control circadiano de cientos de genes por los nutrientes y/o vía de la insulina, generando cambios en la amplitud y/o acrofase de cientos de genes controlados por el reloj molecular o CCGs.

Como ya se ha mencionado, otra de las vías enriquecidas por los grupos de genes que aumentan en amplitud en el grupo HFR (en comparación con el grupo HF) es la vía de la “mitogen-activated protein kinase” (MAPK). Esta vía es de suma importancia en el control del reloj central en las neuronas del SCN, sin embargo, a nivel de tejidos periféricos no hay evidencia del efecto regulatorio que tiene MAPK sobre el reloj [74]. Por otro lado, en tejido periférico la vía de la MAPK participa en el control del metabolismo, por ejemplo, se ha descrito que MAPK es un componente esencial en la vía de señalización de la insulina [65], siendo activada por esta hormona. Además, esta vía ha sido asociada al desarrollo de diabetes mellitus de tipo 2 mediante JNK [67]. Nuestros resultados muestran un patrón oscilatorio en la expresión de algunos elementos de la vía de MAPK, como se muestran en la figura 20, donde la amplitud de genes clave como el activador de RAS de la vía ERK1/2 [65], se ve abolida por la dieta alta en grasa. Nuestros resultados claramente demuestran que el exceso de ingesta de

calorías ingeridas, ad-libitum provoca de manera dramática, una reducción en el nivel de amplitud de cientos de genes, en particular componentes del reloj circadiano como, *Bmal1*, *Ciart*, *Per3*, *Clock*, etc (Figura 19A). Considerando que el mecanismo molecular del reloj circadiano controla la expresión circadiana de cientos de genes blancos (CCGs) [59], la “protección” observada de la reducción de amplitud en el grupo HFR en genes del reloj, podría explicar en parte el efecto que se observa en otros genes controlados por el reloj, mucho de ellos genes que codifican para proteínas que participan en el control del metabolismo. Sin embargo, también podría ser que existan factores de transcripción diferentes a los que forman parte del mecanismo canónico del reloj molecular, y que estuvieran siendo modulados por los nutrientes. Para analizar este aspecto, decidimos realizar un análisis de los promotores de los genes que participan en las vías de señalización que habíamos identificado (al considerar los genes que disminuyen en amplitud en el grupo HF). De manera interesante y en congruencia con lo observado en el número de genes que oscilan, del total de factores de transcripción que presumiblemente contienen secuencias de unión a los promotores de los genes identificados, observamos un mayor número de factores de transcripción que oscilan en HFR y en SD, en comparación con el grupo HF (Figura 22A). Eso nos sugiere, que el primer nivel de control transcripcional generado por los zeitgebers podría ser a nivel de los factores reguladores de la transcripción, cuya “información transcripcional” se amplifica hacia el control de la transcripción de genes que participan directamente en las vías de señalización implicadas en el control metabólico. Esto se ilustra en la red de regulación transcripcional que se construyó a partir de los factores de transcripción clave que fueron identificados como reguladores de genes blanco de las vías identificadas (Figura 23). De manera interesante encontramos como factores de transcripción clave en el control de las distintas vías a los factores de la familia FOX. Distintas evidencias muestran que la dieta hipercalórica ad-libitum es capaz de reprogramar el transcriptoma circadiano de cientos de genes [16, 35, 40, 59]. Nuestros resultados sugieren que los factores de transcripción de la familia FOX, podrían estar jugando un papel relevante en la “protección” a una reprogramación del transcriptoma circadiano provocado por la dieta hipercalórica ad-libitum. Esto, debido a que: 1) Observamos un patrón diferente en el perfil de expresión circadiana de *Foxo1* (Figura 24 B), *Foxn2* (Figura 27 G) y *Foxa2* (Figura 27E) en el grupo HF en comparación con los grupos HFR y SD, donde se observa

un patrón similar entre estos dos grupos (Figuras 27F, H), 2) Nuestro análisis de promotores, así como en otras investigaciones, muestran que estos factores juegan un papel central en el control del metabolismo. Existen 19 subgrupos de FOX (A-S) altamente conservados que se unen a una secuencia consenso 5'-(G/A)(T/C)(A/C)AA(C/T)A-3' localizada en las regiones promotoras. Además, secuencias adyacentes a estas secuencias de unión de los TF también son importantes para una afinidad diferencial de los TF (contexto-dependiente) [75]. En particular uno de los más estudiados es FOXO1, el cual, dependiendo del tejido metabólico, ejerce funciones específicas. Por ejemplo, en páncreas, modula la función de células beta al ejercer una acción dual al suprimir la proliferación de estas células y promover su supervivencia [56, 76]. En hígado controla la producción de glucosa mediante el control de la gluconeogénesis y la glucogenólisis[77]. En especial en los tejidos adiposos blanco y pardo FoxO1 tiene una función dual: el tejido adiposo blanco reduce la sensibilidad a la insulina y suprime la adipogénesis y tamaño del adipocito, y en el pardo, modula el gasto energético [56, 78]. En este sentido, nuestros resultados sugieren que estos factores controlan la expresión de un gran número de genes que participan en distintas vías de señalización y metabólicas como, la vía de la insulina, AKT, mTOR, respuesta al frío y metabolismo de lípidos entre otros (Figura 23), todas ellas dependientes de estímulos nutricionales. Además, diversos estudios han mostrado que al menos, a nivel postranscripcional, los nutrientes son capaces de modular la función de estas proteínas[75]. Por ejemplo, en condiciones de ayuno o en condiciones de un balance energético negativo, AMPK regula la actividad de FOXO1, promoviendo la expresión de genes blancos para FOXO1 y consecuentemente su transcripción[79]. En cambio, en una condición de exceso de nutrientes, la actividad de FOXO1 es inhibida mediante su fosforilación mediado por AKT2 en el residuo Ser²⁵³ y Ser³¹⁵, con la subsecuente reducción de la unión a los promotores de sus genes blanco [80]. Nuevamente, nuestros resultados muestran que la modulación de Foxo1 por nutrientes también se da a nivel transcriptómico, presumiblemente debido a la participación de la maquinaria del reloj en la regulación de la expresión circadiana de Foxo1. Aunque hay pocas evidencias de la interacción entre la familia FOX y el reloj molecular, en hígado, la desacetilasa SIRT1, desacetila a FOXO1, promoviendo que FOXO1 se una al promotor de SIRT1 y favorezca la expresión de SIRT1, debido a la presencia de un cluster de 5 motivos repetidos

seguidos del sitio de unión característico de Fox [81, 82]. A su vez esto podría estar siendo modulado indirectamente por el reloj circadiano, ya que actividad de SIRT1 es circadiana, debido a que utiliza como cofactor al NAD⁺, el cual presenta oscilaciones en sus niveles celulares, debido a la vía de salvamento de NAD⁺, cuya enzima limitante (NAMPT), se transcribe de manera circadiana, ya que es un CCG porque que contiene cajas E en sus promotores y su transcripción es controlada por la maquinaria del reloj [82] (Figura 24 K). Esto apoya la noción de que FOXO1 puede tener actividad circadiana debido a su regulación mediada por SIRT1. Este mecanismo, coincide con la influencia de los periodos de ayuno/alimentación visto anteriormente, pues en el periodo de ayuno, el NAD⁺ aumenta sus niveles, promoviendo la desacetilación tanto de histonas como de FOXO1 por SIRT1, favoreciendo la transcripción de genes blanco de FOXO1. En la continuación de este estudio tenemos contemplado explorar como el reloj circadiano podría participar en el control transcripcional circadiano de estos factores de transcripción mediado por los nutrientes. Otro aspecto central en nuestro estudio es el control de la actividad termogénica de la grasa parda mediada por nutrientes. En este sentido, existen evidencias experimentales que muestran que la sobreexpresión de FoxO1 en el TAP, induce un mejoramiento en la tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina en ratones alimentados con dieta alta en grasa [56]. Además, esto se acompaña con un aumento en la expresión de PGC1 α , un regulador clave de la función mitocondrial [56, 83]. Eso coincide con nuestros resultados, al observar que en los ratones del grupo HFR, muestran un nivel de amplitud de la temperatura corporal superior al de los ratones HF, y similar al de los ratones del grupo SD (Figuras 15A, B y C). Además, nuestros resultados muestran que, en el grupo HFR, tanto las proteínas desacopladora UCP 1 y 3, así como el coregulador transcripcional Ppargc1 α (Figura. 24E, G y D), recuperan el patrón de expresión observado en el grupo SD. Esto indica que la DTR promueve una recuperación de la expresión de genes clave en la termogénesis, misma que está ligada a un mayor gasto energético. Interesantemente, durante el proceso de diferenciación de los adipocitos pardos, FoxO1 regula la expresión de las UCPs (UCP 1, 2 y 3) al interactuar con el factor de transcripción EB (Tfeb), que es un mediador de la expresión de UCP1, UCP2 y UCP3 en adipocitos [55].

Si bien, aún no existen conocimientos de como las proteínas Fox podrían participar en el control circadiano de la termogénesis, nuestro estudio de promotores de genes circadianos, por un lado nos confirma el papel directo de FoxO1 en el control de genes termogénicos y por otro lado, los otros dos miembros identificados de la familia, (FoxA2 y FoxN2), ambos participan en el control transcripcional de PGC1A, regulador clave en la función mitocondrial, organelo responsable de la transformación de energía química en energía térmica en la grasa parda [84].

Nuestros resultados indican que de manera semejante a lo que sucede en hígado [35, 40, 85], los nutrientes también actúan como zeitgebers en el TAP. Sin embargo, probablemente exista un grupo de genes que no necesariamente están controlados por el reloj circadiano, pero cuyos niveles de expresión podrían estar modificados en respuesta a la restricción temporal del alimento y que podrían estar jugando un papel importante en los efectos benéficos de la restricción temporal de alimento. Por ello, decidimos explorar además de los genes controlados por el reloj, los genes no oscilantes que cambiaron sus niveles de expresión por la dieta en cada uno de los seis ZTs estudiados. De manera importante, al comparar los grupos ad-libitum (SD vs HF), los genes que cambian su nivel de expresión de manera significativa se reparten entre la noche y el día y de manera más acentuada en los ZT16, ZT0 y ZT4 (Figura 25 A). En contraste, cuando se compararon los transcriptomas entre los grupos HFR y HF, observamos que la mayor parte de los genes cambian durante un periodo específico de la noche (periodo oscuro), en particular a ZT16 (Figura 25B). Es decir, la restricción temporal de alimento provoca cambios en la expresión de genes de manera dramática, precisamente durante el periodo en el cual los ratones se encuentran alimentándose. Al evaluar las funciones biológicas, vías de señalización y metabólicas alteradas en cada ZT, encontramos que hay vías estadísticamente enriquecidas durante periodos específicos del día. En particular, cuando comparamos entre los grupos ad-libitum (SDvsHF), las vías identificadas se distribuyen a lo largo del día, hacia el inicio del periodo oscuro y durante la primera mitad del periodo de luz. Interesantemente, cuando comparamos entre HFRvsHF las diferencias transcriptómicas enriquecen vías prácticamente al inicio del periodo oscuro (ZT12-ZT16) e inicio del ciclo claro (ZT0) y en contraste con la comparación entre SD y HF, se observa una segregación temporal entre las vías

anabólicas y catabólicas (Figura 24 D). En este sentido, las vías enriquecidas más importantes son mTOR signaling pathway, insulin signaling pathway, PI3K/AKT signaling pathway y AMPK signaling pathway. Notoriamente, la vía de AMPK es catabólica, y las otras dos vías son anabólicas. Así, cuando analizamos las vías significativamente enriquecidas que fueron alteradas en los dos grupos ad-libitum (SD vs HF) observamos que tanto la vía del mTOR como la vía AMPK se encuentra alterada durante la primera parte del periodo oscuro (ZT4). Aunque es evidente que el grupo SD muestra mucho mejores condiciones metabólicas que el grupo HF, esto es puede ser debido principalmente al reducido aporte calórico. Sin embargo, cuando comparamos la distribución de las vías metabólicas y de señalización alteradas entre los grupos HFR y HF, observamos que las vías mTOR y AMPK cuya función es (anabolismo y catabolismo respectivamente) se separan temporalmente y quedan distribuidas precisamente, cuando son requeridas en el transcurso del día. En particular, la vía mTOR muestra diferencias entre el grupo HFR y el HF, a ZT 12 que es cuando los ratones del grupo HFR inician su alimentación. En este sentido, mTOR promueve vías anabólicas como la adipogénesis en respuesta a estímulos de insulina y en hígado promueve gluconeogénesis [86]. Por otro lado, AMPK la cual es importante en el catabolismo, controla el metabolismo de ácidos grasos, promoviendo el consumo de esta fuente de energía [87]. AMPK, está representada en el ZT12, coincidiendo con el inicio de la alimentación de los ratones HFR. Recordando que las variables a tomar en cuenta son el horario y el tipo de alimentación, podemos decir que con los nutrientes estamos forzando una a las vías metabólicas a responder de acuerdo con el periodo de alimentación, en el caso del grupo HFR, por el contrario, con los grupos alimentados ad-libitum no existe esta diferenciación ya que los animales se alimentan durante un periodo más prolongado y sin distinción entre día y noche alterando el ciclo fisiológico de ayuno. Esto es muy revelador en el contexto social. Como ya se ha mencionado en la introducción, estudios epidemiológicos y experimentales sugieren que uno de los factores que han participado en el aumento en la prevalencia de enfermedades metabólicas son ciertos hábitos que pueden alterar los ritmos circadianos, reflejados en los estilos de vida modernos. Estos hábitos incluyen los trabajos nocturnos, los viajes transmeridionales, la luz artificial, las actividades nocturnas que incluyen los periodos de alimentación.

Como vimos anteriormente, los nutrientes actúan como sincronizadores de los relojes periféricos, el mecanismo por el cual modulan la actividad del reloj molecular es a través de los sensores nutricionales que incluyen a AMPK, AKT etc. (72, 73, 79, 88). Por ejemplo, AMPK fosforila a CRY con la subsecuente salida de CRY del núcleo y su degradación proteosomal[88]. Este evento tiene lugar cuando AMPK se encuentra activada por un aumento de AMP por consecuencia de una disminución de los niveles celulares ATP o un déficit energético [88]. Además, AMPK también fosforila a la proteína Caseína cinasa 1, que es un represor de PER [88] provocando la exclusión de PER del núcleo y su posterior degradación cuando hay ausencia de nutrientes. En este sentido, nuestros resultados muestran que la vía de AMPK se enriquece en ZT0 al comparar HFRvsHF, horario donde se retira el alimento a los ratones HFR, es decir, el momento del día donde el empieza el periodo de ayuno y termina el periodo de alimentación, favoreciendo la actividad de AMPK por el aumento de ADP y disminución de ATP. Por el contrario, AKT, que se ve enriquecido en el ZT12, coincide con el inicio de la alimentación y la activación de las vías anabólicas como la vía de PI3K/AKT y mTOR. Además, AKT también es capaz de modular al reloj circadiano. AKT es un represor tanto de BMAL1 como de CLOCK, pues la fosforilación de AKT provoca la expulsión de CLOCK y BMAL1 del núcleo para su degradación [72, 73]. En este sentido, la dieta restringida temporalmente optimiza el metabolismo debido al ciclo de ayuno/alimentación impuesto de 12 c/u. Separando por 12 horas las vías anabólicas y catabólicas. Esto podría explicarse porque, los nutrientes y en específico los ciclos de ayuno/alimentación, modulan la actividad de los sensores nutricionales y éstos a su vez, tienen la capacidad de interactuar con el reloj molecular del TAP, reestableciendo la oscilación de los genes clave del reloj molecular, que tienen bajo su cargo la expresión de una amplia gama de genes, entre ellos factores de transcripción como FOX1, FOXN2, PPARA, CREM etc., que controlan la transcripción de una gran cantidad de genes que participan en el control del balance energético en el TAP como el metabolismo de lípidos y genes relacionados con la termogénesis.

8. Conclusiones.

Colectivamente, nuestros resultados sugieren un mecanismo que regula el balance energético en el TAP, en respuesta a la restricción temporal de alimento. En este modelo, en primer lugar, los sensores nutricionales detectan los cambios circadianos de los periodos de ayuno/alimentación de 12 horas cada uno, que actúan como zeitgebers nutricionales. Estos sensores nutricionales como AMPK, AKT, SIRT1, a su vez, controlan la actividad de distintas proteínas clave del reloj molecular como CLOCK, BMAL1 PER, CRY, optimizando su actividad y consecuentemente el reloj molecular sincronizado por los nutrientes regula la expresión circadiana de cientos de genes controlados por el reloj o CCGs. Entre estos genes se encuentran tanto genes efectores (enzimas, receptores, etc) así como factores de transcripción (FoxO1, Foxn2, Ppara). Estos últimos, a su vez participan en el control de la expresión de genes importantes en las vías de señalización implicadas en la modulación del metabolismo, que en consecuencia optimizan el control del metabolismo mediante una segregación temporal de las vías anabólicas y catabólicas en función de los requerimientos nutricionales/energéticos del organismo.

9.Perspectivas.

El trabajo experimental se enfocará en corroborar con datos de expresión de los microarreglos con datos de expresión obtenidos por PCR, enfocándonos en genes clave del reloj como Clock, Arntl Per y Cry, genes vistos en las vías de señalización y factores de transcripción como Foxo1, Foxn2 y Foxa2.

Se realizarán experimentos de Western Blot para medir la cantidad de proteína, así como la fosforilación de las proteínas clave en las vías de PI3K/AKT y mTOR.

Se realizarán mediciones de Insulina en suero, así como cortes histológicos del TAP para analizar su morfología.

El trabajo de tesis se complementará estudios más sofisticados como inmunoprecipitación de la cromatina, para así verificar que los factores de transcripción Foxo1, Foxn2 y Foxa2 son posibles blancos del Dímero CLOCK:BMAL1, pues no hay reportes de que los factores Foxo1, Foxn2 y Foxa2 sean considerados como genes controlados por el reloj en el TAP.

Por último, el trabajo se enfocará al núcleo ventromedial del hipotálamo VMH, mediante un análisis transcripcional, evaluaremos la expresión circadiana del VMH, observaremos si la dieta alta en grasa ad libitum y con restricción de 12 horas afecta el transcriptoma circadiano del VMH y si esas alteraciones tienen relación con tejidos periféricos, en específico con el TAP, para poder correlacionar los resultados vistos en el TAP con los que obtendremos del VMH.

10. Bibliografía.

1. Flores, Y.N., et al., *Increased Prevalence of Psychosocial, Behavioral, and Socio-Environmental Risk Factors among Overweight and Obese Youths in Mexico and the United States*. Int J Environ Res Public Health, 2019. **16**(9).
2. Fruh, S.M., *Obesity: Risk factors, complications, and strategies for sustainable long-term weight management*. J Am Assoc Nurse Pract, 2017. **29**(S1): p. S3-S14.
3. Grandin, L.D., L.B. Alloy, and L.Y. Abramson, *The social zeitgeber theory, circadian rhythms, and mood disorders: review and evaluation*. Clin Psychol Rev, 2006. **26**(6): p. 679-94.
4. Xiao, Q., et al., *A large prospective investigation of sleep duration, weight change, and obesity in the NIH-AARP Diet and Health Study cohort*. Am J Epidemiol, 2013. **178**(11): p. 1600-10.
5. Hatori, M., et al., *Global rise of potential health hazards caused by blue light-induced circadian disruption in modern aging societies*. NPJ Aging Mech Dis, 2017. **3**: p. 9.
6. Orozco-Solis, R. and P. Sassone-Corsi, *Epigenetic control and the circadian clock: Linking metabolism to neuronal responses*. Neuroscience, 2014. **264**(0): p. 76-87.
7. Roenneberg, T. and M. Mewes, *The Circadian Clock and Human Health*. Curr Biol, 2016. **26**(10): p. R432-43.
8. Takahashi, J.S., *Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock*. Nat Rev Genet, 2017. **18**(3): p. 164-179.
9. Dibner, C. and U. Schibler, *Circadian timing of metabolism in animal models and humans*. J Intern Med, 2015. **277**(5): p. 513-27.
10. Huang, R.C., *The discoveries of molecular mechanisms for the circadian rhythm: The 2017 Nobel Prize in Physiology or Medicine*. Biomed J, 2018. **41**(1): p. 5-8.
11. Lamming, D.W., et al., *Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity*. Science, 2012. **335**(6076): p. 1638-43.
12. Weaver, D.R., *The suprachiasmatic nucleus: a 25-year retrospective*. J Biol Rhythms, 1998. **13**(2): p. 100-12.
13. Orozco-Solis, R. and P. Sassone-Corsi, *Circadian clock: linking epigenetics to aging*. Curr Opin Genet Dev, 2014. **26**: p. 66-72.
14. Mohawk, J.A., C.B. Green, and J.S. Takahashi, *Central and peripheral circadian clocks in mammals*. Annu Rev Neurosci, 2012. **35**: p. 445-62.
15. Duong, H.A., et al., *A molecular mechanism for circadian clock negative feedback*. Science, 2011. **332**(6036): p. 1436-9.
16. Eckel-Mahan, K.L., et al., *Reprogramming of the circadian clock by nutritional challenge*. Cell, 2013. **155**(7): p. 1464-78.
17. Wang, G.Z., et al., *Cycling Transcriptional Networks Optimize Energy Utilization on a Genome Scale*. Cell Rep, 2015. **13**(9): p. 1868-80.
18. Aguilar-Arnal, L., et al., *NAD⁺-SIRT1 control of H3K4 trimethylation through circadian deacetylation of MLL1*. Nat Struct Mol Biol, 2015. **22**(4): p. 312-318.
19. Masri, S., et al., *Coupling circadian rhythms of metabolism and chromatin remodelling*. Diabetes, Obesity and Metabolism, 2015. **17**: p. 17-22.
20. Borrelli, E., et al., *Decoding the epigenetic language of neuronal plasticity*. Neuron, 2008. **60**(6): p. 961-74.
21. Etchegaray, J.P., et al., *Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock*. Nature, 2003. **421**(6919): p. 177-82.
22. Doi, M., J. Hirayama, and P. Sassone-Corsi, *Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase*. Cell, 2006. **125**(3): p. 497-508.

23. Zarrinpar, A., A. Chaix, and S. Panda, *Daily Eating Patterns and Their Impact on Health and Disease*. Trends Endocrinol Metab, 2016. **27**(2): p. 69-83.
24. Turek, F.W., et al., *Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice*. Science, 2005. **308**(5724): p. 1043-5.
25. Peek, C.B., et al., *Circadian clock NAD⁺ cycle drives mitochondrial oxidative metabolism in mice*. Science, 2013. **342**(6158): p. 1243417.
26. Lamia, K.A., et al., *Cryptochromes mediate rhythmic repression of the glucocorticoid receptor*. Nature, 2011. **480**(7378): p. 552-6.
27. Barclay, J.L., et al., *High-fat diet-induced hyperinsulinemia and tissue-specific insulin resistance in Cry-deficient mice*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2013. **304**(10): p. E1053-63.
28. Lamia, K.A., K.F. Storch, and C.J. Weitz, *Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(39): p. 15172-7.
29. Marcheva, B., et al., *Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes*. Nature, 2010. **466**(7306): p. 627-31.
30. Scott, E.M., A.M. Carter, and P.J. Grant, *Association between polymorphisms in the Clock gene, obesity and the metabolic syndrome in man*. Int J Obes, 2007. **32**(4): p. 658-662.
31. Garaulet, M. and J.A. Madrid, *Chronobiology, genetics and metabolic syndrome*. Curr Opin Lipidol, 2009. **20**(2): p. 127-34.
32. Machicao, F., et al., *Glucose-Raising Polymorphisms in the Human Clock Gene Cryptochrome 2 (<italic>CRY2</italic>) Affect Hepatic Lipid Content*. PLoS ONE, 2016. **11**(1): p. e0145563.
33. Rajaratnam, S.M. and J. Arendt, *Health in a 24-h society*. Lancet, 2001. **358**(9286): p. 999-1005.
34. Buxton, O.M., et al., *Adverse metabolic consequences in humans of prolonged sleep restriction combined with circadian disruption*. Sci Transl Med, 2012. **4**(129): p. 129ra43.
35. Hatori, M., et al., *Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet*. Cell Metab, 2012. **15**(6): p. 848-60.
36. Chaix, A., et al., *Time-restricted feeding is a preventative and therapeutic intervention against diverse nutritional challenges*. Cell metabolism, 2014. **20**(6): p. 991-1005.
37. Gill, S. and S. Panda, *A Smartphone App Reveals Erratic Diurnal Eating Patterns in Humans that Can Be Modulated for Health Benefits*. Cell Metabolism, 2015. **22**(5): p. 789-798.
38. Garaulet, M. and P. Gómez-Abellán, *Timing of food intake and obesity: A novel association*. Physiology & Behavior, 2014. **134**: p. 44-50.
39. Di Francesco, A., et al., *A time to fast*. Science, 2018. **362**(6416): p. 770-775.
40. Chaix, A., et al., *Time-restricted feeding is a preventative and therapeutic intervention against diverse nutritional challenges*. Cell Metab, 2014. **20**(6): p. 991-1005.
41. Zarrinpar, A., et al., *Diet and feeding pattern affect the diurnal dynamics of the gut microbiome*. Cell Metab, 2014. **20**(6): p. 1006-17.
42. Thaïss, C.A., et al., *Transkingdom control of microbiota diurnal oscillations promotes metabolic homeostasis*. Cell, 2014. **159**(3): p. 514-29.
43. Fernandez, J.R., et al., *Disruptions in energy balance: does nature overcome nurture?* Physiol Behav, 2008. **94**(1): p. 105-12.
44. Onder, Y. and C.B. Green, *Rhythms of metabolism in adipose tissue and mitochondria*. Neurobiology of Sleep and Circadian Rhythms, 2018. **4**: p. 57-63.
45. Gill, S. and S. Panda, *A Smartphone App Reveals Erratic Diurnal Eating Patterns in Humans that Can Be Modulated for Health Benefits*. Cell Metab, 2015. **22**(5): p. 789-98.

46. Hibi, M., et al., *Brown adipose tissue is involved in diet-induced thermogenesis and whole-body fat utilization in healthy humans*. *Int J Obes (Lond)*, 2016. **40**(11): p. 1655-1661.
47. Giralt, M. and F. Villarroya, *White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions?* *Endocrinology*, 2013. **154**(9): p. 2992-3000.
48. Kapas, L. and E. Szentirmai, *Brown adipose tissue at the intersection of sleep and temperature regulation*. *Temperature (Austin)*, 2014. **1**(1): p. 16-7.
49. Gerhart-Hines, Z., et al., *The nuclear receptor Rev-erb[agr] controls circadian thermogenic plasticity*. *Nature*, 2013. **503**(7476): p. 410-413.
50. Orozco-Solis, R., et al., *The Circadian Clock in the Ventromedial Hypothalamus Controls Cyclic Energy Expenditure*. *Cell Metab*, 2016. **23**(3): p. 467-78.
51. Hatori, M., et al., *Global rise of potential health hazards caused by blue light-induced circadian disruption in modern aging societies*. *NPJ aging and mechanisms of disease*, 2017. **3**: p. 9-9.
52. Labbe, S.M., et al., *mTORC1 is Required for Brown Adipose Tissue Recruitment and Metabolic Adaptation to Cold*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 37223.
53. Hughes, M.E., J.B. Hogenesch, and K. Kornacker, *JTK_CYCLE: an efficient nonparametric algorithm for detecting rhythmic components in genome-scale data sets*. *J Biol Rhythms*, 2010. **25**(5): p. 372-80.
54. Fang, X., et al., *miR-144/451 represses the LKB1/AMPK/mTOR pathway to promote red cell precursor survival during recovery from acute anemia*. *Haematologica*, 2018. **103**(3): p. 406-416.
55. Liu, L., et al., *FoxO1 interacts with transcription factor EB and differentially regulates mitochondrial uncoupling proteins via autophagy in adipocytes*. *Cell Death Discov*, 2016. **2**: p. 16066.
56. Kousteni, S., *FoxO1, the transcriptional chief of staff of energy metabolism*. *Bone*, 2012. **50**(2): p. 437-43.
57. Aguilar-Arnal, L., et al., *Spatial dynamics of SIRT1 and the subnuclear distribution of NADH species*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016. **113**(45): p. 12715-12720.
58. Roberts-Toler, C., B.T. O'Neill, and A.M. Cypess, *Diet-induced obesity causes insulin resistance in mouse brown adipose tissue*. *Obesity (Silver Spring)*, 2015. **23**(9): p. 1765-70.
59. Longo, V.D. and S. Panda, *Fasting, Circadian Rhythms, and Time-Restricted Feeding in Healthy Lifespan*. *Cell Metabolism*, 2016. **23**(6): p. 1048-1059.
60. Guo, X., et al., *Glycolysis in the control of blood glucose homeostasis*. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2012. **2**(4): p. 358-367.
61. Orozco-Solis, R., et al., *The Circadian Clock in the Ventromedial Hypothalamus Controls Cyclic Energy Expenditure*. *Cell Metabolism*, 2016. **23**(3): p. 467-478.
62. Lee, P., et al., *Brown Adipose Tissue Exhibits a Glucose-Responsive Thermogenic Biorhythm in Humans*. *Cell Metabolism*, 2016.
63. Morf, J. and U. Schibler, *Body temperature cycles: gatekeepers of circadian clocks*. *Cell Cycle*, 2013. **12**(4): p. 539-40.
64. Prabakaran, S., *A food clock in the VMH*. *Science Signaling*, 2016. **9**(420): p. ec70-ec70.
65. Gehart, H., et al., *MAPK signalling in cellular metabolism: stress or wellness?* *EMBO Rep*, 2010. **11**(11): p. 834-40.
66. Sozen, B., et al., *The p38 MAPK signalling pathway is required for glucose metabolism, lineage specification and embryo survival during mouse preimplantation development*. *Mech Dev*, 2015. **138 Pt 3**: p. 375-98.
67. Sabio, G. and R.J. Davis, *cJun NH2-terminal kinase 1 (JNK1): roles in metabolic regulation of insulin resistance*. *Trends Biochem Sci*, 2010. **35**(9): p. 490-6.

68. Lawan, A. and A.M. Bennett, *Mitogen-Activated Protein Kinase Regulation in Hepatic Metabolism*. Trends Endocrinol Metab, 2017. **28**(12): p. 868-878.
69. Cao, W., et al., *p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(7): p. 3057-67.
70. Cai, H., L.Q. Dong, and F. Liu, *Recent Advances in Adipose mTOR Signaling and Function: Therapeutic Prospects*. Trends Pharmacol Sci, 2016. **37**(4): p. 303-317.
71. Hung, Y.P., et al., *Akt regulation of glycolysis mediates bioenergetic stability in epithelial cells*. Elife, 2017. **6**.
72. Luciano, A.K., et al., *CLOCK phosphorylation by AKT regulates its nuclear accumulation and circadian gene expression in peripheral tissues*. J Biol Chem, 2018. **293**(23): p. 9126-9136.
73. Dang, F., et al., *Insulin post-transcriptionally modulates Bmal1 protein to affect the hepatic circadian clock*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 12696.
74. Goldsmith, C.S. and D. Bell-Pedersen, *Diverse roles for MAPK signaling in circadian clocks*. Adv Genet, 2013. **84**: p. 1-39.
75. Laissue, P., *The forkhead-box family of transcription factors: key molecular players in colorectal cancer pathogenesis*. Mol Cancer, 2019. **18**(1): p. 5.
76. Kitamura, T., et al., *The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic beta cell growth*. J Clin Invest, 2002. **110**(12): p. 1839-47.
77. Altomonte, J., et al., *Inhibition of Foxo1 function is associated with improved fasting glycemia in diabetic mice*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **285**(4): p. E718-28.
78. Kousteni, S., *FoxO1: a molecule for all seasons*. J Bone Miner Res, 2011. **26**(5): p. 912-7.
79. Efeyan, A., W.C. Comb, and D.M. Sabatini, *Nutrient-sensing mechanisms and pathways*. Nature, 2015. **517**(7534): p. 302-10.
80. Unterman, T.G., *Regulation of Hepatic Glucose Metabolism by FoxO Proteins, an Integrated Approach*. Curr Top Dev Biol, 2018. **127**: p. 119-147.
81. Xiong, S., et al., *FoxO1 mediates an autofeedback loop regulating SIRT1 expression*. J Biol Chem, 2011. **286**(7): p. 5289-99.
82. Masri, S., *Sirtuin-dependent clock control: new advances in metabolism, aging and cancer*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2015. **18**(6): p. 521-7.
83. Nakae, J., et al., *Forkhead transcription factor FoxO1 in adipose tissue regulates energy storage and expenditure*. Diabetes, 2008. **57**(3): p. 563-76.
84. Liang, H. and W.F. Ward, *PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism*. Adv Physiol Educ, 2006. **30**(4): p. 145-51.
85. Dyar, K.A., et al., *Atlas of Circadian Metabolism Reveals System-wide Coordination and Communication between Clocks*. Cell, 2018. **174**(6): p. 1571-1585 e11.
86. Saxton, R.A. and D.M. Sabatini, *mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease*. Cell, 2017. **168**(6): p. 960-976.
87. O'Neill, H.M., G.P. Holloway, and G.R. Steinberg, *AMPK regulation of fatty acid metabolism and mitochondrial biogenesis: implications for obesity*. Mol Cell Endocrinol, 2013. **366**(2): p. 135-51.
88. Jordan, S.D. and K.A. Lamia, *AMPK at the crossroads of circadian clocks and metabolism*. Mol Cell Endocrinol, 2013. **366**(2): p. 163-9.