



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Evaluación de la expresión y función de metiltransferasas de histonas en hepatocitos de ratones normales y obesos

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Paola Berenice Mass Sánchez

TUTORA PRINCIPAL:

Dra. Lorena Aguilar Arnal

[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Víctor Julián Valdés Rodríguez

[Instituto de Fisiología Celular](#)

Dr. Antonio Velázquez Arellano

[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

Ciudad de México. 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.

Agradecimientos

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Lorena Aguilar Arnal, en el Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, y la asesoría del Dr. Antonio Velázquez Arellano (IIB) y el Dr. Víctor Julián Valdés Rodríguez (IFC) en calidad de 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. Así como al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado por los recursos otorgados para la asistencia al XXXII Congreso Nacional de Bioquímica.

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 y la Maestra en Ciencias, Marcia Bustamante Zepeda por su apoyo técnico y teórico en la realización de experimentos. Al Maestro en Ciencias, José Rafael Cervantes Roldán por su atención y apoyo para el uso del Bioruptor.

Este trabajo fue realizado con financiamiento de la Universidad Nacional Autónoma de México, PAPIIT IA201717, PAPIIT IN210619 y The International Center for Genetic Engineering and Biotechnology Early Career Return Grant CRP/MEX16-05_EC.

Índice

1. Resumen.....	7
2. Abstract.....	9
3. Introducción.....	11
3.1 Ciclos circadianos	11
3.2 Mecanismo molecular del reloj circadiano	14
3.3 La obesidad y su relación con el reloj circadiano en mamíferos	16
3.3.1 Modelos de estudio en ratones con mutaciones en genes del reloj para entender la obesidad	18
3.3.2 Polimorfismos en GCC asociados a enfermedades metabólicas en humanos	19
3.4 Organización nuclear del genoma.....	20
3.4.1 Modificaciones postraduccionales de las histonas	21
3.4.1.1 Metiltransferasas de histonas.....	23
3.5 Regulación epigenética de los ciclos circadianos.....	32
3.6 Regulación epigenética de los ciclos circadianos en un modelo de obesidad inducido por la dieta	35
4. Justificación	38
5. Hipótesis	39
6. Objetivos.....	40
6.1 Objetivo general.....	40
6.2 Objetivos particulares	40
7. Metodología	41
7.1 Selección de panel de metiltransferasas: criterios de inclusión y exclusión	42
7.2 Inducción de obesidad en modelo biológico.....	43
7.3 Prueba de tolerancia a la glucosa e insulina.....	43
7.4 Extracción de RNA.....	44
7.5 Síntesis de DNA complementario.....	45
7.6 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo (qPCR).....	45
7.7 Análisis de oscilaciones circadianas.....	45
7.8 Extracción de proteínas.....	46

7.9	Cuantificación de proteínas.....	46
7.10	Western blot	47
7.11	Diseño de primers para CHIP.....	48
7.12	Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)	48
7.13	Estadística	48
8.	Resultados	51
8.1	Selección in silico de las KTMs a evaluar	52
8.2	La alimentación con dieta rica en grasas induce cambios en la expresión génica y ganancia de oscilación circadiana en la transcripción de las metiltransferasas G9a y Nsd2.	54
8.3	La dieta rica en grasas genera cambios fisiológicos y metabólicos que inducen la aparición de obesidad	57
8.4	La alimentación con dieta rica en grasas induce oscilación circadiana en la expresión proteica de la metiltransferasa G9a.....	57
8.5	Cambios en la expresión de genes del metabolismo como efecto de la dieta rica en grasa	64
8.6	La marca epigenética H3K9me2 presenta una dinámica específica para distintos loci genómicos en respuesta a la dieta.....	68
9.	Discusión.....	71
10.	Conclusiones.....	80
11.	Perspectivas.....	81
12.	Referencias.....	82

Índice de figuras

Figura 1: Señalización de la sincronización externa para sincronizar ritmos endógenos	12
Figura 2: Mecanismo molecular del reloj circadiano	15
Figura 3: Organización nuclear del genoma y formación de heterocromatina y eucromatina	22
Figura 4: Mecanismo del código de histonas para dar lugar a cromatina activa y represiva	24
Figura 5: Mecanismo de formación de MMA, ADMA y SDMA catalizado por PRMTs	25
Figura 6: Clasificación de las KMTs	27
Figura 7: Regulación de la transcripción circadiana de GCC mediada por MLL1	30
Figura 8: Cambios rítmicos en la cromatina dirigidos por efectores epigenéticos	34
Figura 9: Reprogramación de la transcripción en un paradigma de DIO	36
Figura 10: Perfiles de expresión en hígado de GCC y KMTs en condiciones de CD y HFD	56
Figura 11: Seguimiento del peso de animales para generar un modelo de obesidad	58
Figura 12: Cambios en la tolerancia a la glucosa de ratones alimentados con HFD como reflejo de la inducción de obesidad	59
Figura 13: Cambios en la tolerancia a la insulina de ratones alimentados con HFD como reflejo de la inducción de obesidad	60
Figura 14: Expresión de genes del reloj en ratones sacrificados a ZT8 y ZT20	61
Figura 15: Perfiles de expresión de <i>Pparγ1</i> y <i>Pparγ2</i> en hígados de ratones bajo CD y HFD	62
Figura 16: Expresión de las proteínas PPAR γ 1 y PPAR γ 2 en hígado	63
Figura 17: Oscilación de la proteína G9A en condiciones de HFD en hígado	66
Figura 18: Oscilación del transcrito <i>Nsd2</i> en condiciones de HFD en hígado	66
Figura 19: Perfil de expresión de <i>Gsta2</i> y <i>Gsta4</i> en hígado de ratón	67
Figura 20: Perfil de expresión de <i>Tbp</i> en hígado de ratón	68
Figura 21: ChIP-qPCR del enriquecimiento de H3K9me2 en diferentes <i>loci</i> genómicos	70
Figura 22: GRO-seq entre dieta control y dieta rica en grasas a los ZT7 y ZT19 en la región de <i>Pparγ1</i> y <i>Pparγ2</i>	76
Figura 23: Modelo del efecto represor de G9A sobre <i>Pparγ2</i> en condiciones de dieta control (CD) y dieta rica en grasas (HFD) al ZT20	79

Índice de tablas

Tabla 1: Polimorfismos asociados a enfermedades metabólicas en humanos	17
Tabla 2: Preparación de curva estándar para cuantificación de proteínas	45
Tabla 3: Resumen de funciones de las KMTs elegidas para el estudio	51
Tabla 4: Oscilación de GCC y KMTs en hígado de ratón	55

Abreviaturas

ChIP – Inmunoprecipitación de la cromatina

HFD – Dieta rica en grasas

CD – Dieta control

DIO – Obesidad inducida por la dieta

PTMs – Modificaciones postraduccionales

HMT – Metiltransferasas de histonas

KMTs – Metiltransferasas de lisina

PRMT – Metiltransferasas de arginina

FT – Factor transcripcional

ZT – Zeitgeber time

NSQ – Núcleo supraquiasmático

RNA_m – Ácido ribonucleico mensajero

DNA – Ácido desoxirribonucleico

GCC – Genes controlados por el reloj

WT – Wild type

CLOCK – Circadian Locomoter Output Cycles Protein Kaput

BMAL1 – Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator Like

PER – Period

CRY – Cryptochrome

REV-ERB – Nuclear Receptor Subfamily 1 Group D Member 1

RORE – ROR/REV-ERB-response element

DBP – Albumin D-box

HLF – Hepatic Leukemia Factor

bHLH – Dominio básico hélice-loop-hélice

bZIP – Dominio de zipper de leucina

αMSH – Alpha melanocyte stimulating hormone

GWAS – Genome-Wide Association Studies

SNP – Polimorfismo de un solo nucleótido

H2A – Histona 2A

H2B – Histona 2B

H3 – Histona 3

H4 – Histona 4

CpG – Citosina-fosfato-Guanina

TEF – Thyrotroph Embryonic Factor

E4BP4 – E4 Promoter-Binding Protein 4

CK1ε – Casein kinase I isoform epsilon

CKII – Casein kinase II

TNFα – Factor de necrosis tumoral alfa

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

HP1 – Heterochromatin Protein 1

MAPK – Mitogen-Activated Protein Kinase

SET – Dominio proteico, acrónimo de Su(var)3-9, Enhancer of zeste y Trithorax

H3K9me3 – Trimetilación de la lisina 9 de la histona 3

H3K27me – Monometilación de la lisina 27 de la histona 3

H3K9me2 – Dimetilación de la lisina 9 de la histona 3

H4K36me – Monometilación de la lisina 36 de la histona 4

H3K79me – Monometilación de la lisina 9 de la histona 3

MMA – Monometilación de arginina

SDMA – Dimetilación simétrica de arginina

ADMA – Dimetilación asimétrica de arginina

SANT – Dominio proteico, acrónimo de Swi3, Ada2, N-Cor y TFIIIB

SAM – S-adenosil-L-metionina

SAH – S-adenosil-homocisteína

HDAC – Desacetilasas de histonas

SUVAR39 – Suppressor Of Variegation 3-9 Homolog 1

EZH – Enhancer of zeste

EHMT2 (G9A) – Euchromatic Histone Lysine Methyltransferase 2

AP-2a – Transcription Factor AP-2 Alpha

PRC2 – Complejo represor Polycomb

MLL1 – Mixed Lineage Leukemia 1

SHP – Src Homology 2

CYP7A1 – Cytochrome P450 Family 7 Subfamily A Member 1

MEF – Fibroblastos embrionarios de ratón

CBP – CREB binding protein

SIRT1 – Sirtuina 1

HDAC1 – Histone Deacetylase 1

NAD – Nicotin y adenin dinucleótido

DMT2 – Diabetes mellitus tipo 2

PPAR γ – Peroxisome proliferator-activated receptor gamma

NSD2 – Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 2

SUV420H2 – Suppressor Of Variegation 4-20 Homolog 2

SETDB2 – SET Domain Bifurcated Histone Lysine Methyltransferase 2

SMYD2 – Dominio proteico, acrónimo de SET and MYND domain

TRX – Trithorax

AWS – Dominio proteico, acrónimo de Associated with SET

PRDM – Dominio proteico, acrónimo de PRDI-BF1 and RIZ homology domain containing

C/EBP α – CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha

FN – Factor nuclear

GR – Receptor de glucocorticoides

STAT5A – Signal transducers and activators of transcription 5a

RXR – Receptor de retinoides X

1. Resumen

La obesidad es una patología compleja y multifactorial que desencadena cambios fisiológicos y transcripcionales evidentes en el hígado. El hígado, al ser un órgano altamente sensible a cambios metabólicos, requiere de la expresión diferencial de genes en respuesta a dichos cambios. Se sabe, que la expresión diferencial de diversos genes ocurre de manera rítmica en periodos cercanos a 24 horas, estos periodos son denominados ritmos circadianos. La mayoría de los organismos poseen un reloj intrínseco que es capaz de adaptarse a los ritmos ambientales y, mediante señales como la luz, permiten la sincronización del reloj endógeno con el ambiente. A nivel molecular, este reloj endógeno es regulado por factores transcripcionales, que mediante bucles de regulación positiva y negativa, dan lugar a la transcripción circadiana. Es particularmente importante el efecto que ejerce el reloj molecular sobre genes metabólicos, que les impone oscilaciones transcripcionales en periodos de 24 horas.

A nivel transcripcional, se ha reportado que entre el 20 y 30% de los genes expresados en hígado oscilan de manera circadiana, pero la aparición de obesidad inducida por la dieta (DIO) da lugar a cambios en la oscilación de transcritos. Lo anterior genera un nivel de regulación complejo que se acompaña de cambios en la cromatina. Estos cambios pueden darse a nivel de aparición de modificaciones postraduccionales de histonas (PTMs), siendo de especial interés la metilación, cuyo efecto puede asociarse a represión o activación transcripcional. Ejemplos de marcas activadoras o represoras de la transcripción ocurren de manera rítmica en genes del reloj y genes controlados por el reloj (GCC). Las metiltransferasas de histonas (HMTs) encargadas de realizar estas marcas pueden tener cambios en la expresión en condiciones de obesidad y con ello se altera también su función. Lo anterior, pone de manifiesto la estrecha relación entre la regulación epigenética en la transcripción de genes, y como su efecto se modifica por patologías como la obesidad.

En este estudio se eligieron ratones machos de la cepa C57BL/6, por su predisposición al desarrollo de obesidad inducida por la dieta, y se encontró que la transcripción se modifica bajo un esquema de dieta rica en grasas (HFD), siendo notable la ganancia de oscilación de 2 metiltransferasas de lisina (KMTs) en condiciones de obesidad: G9a y Nsd2. A nivel de transcrito es evidente para ambos casos, pero a nivel de proteína, únicamente en G9A se observa expresión diferencial en animales sometidos a una dieta rica en grasas.

Para evaluar el efecto de la marca generada por esta KMT, se eligió al factor transcripcional (FT) PPAR γ en sus dos isoformas, por los antecedentes que lo involucran en la regulación adipogénica, además de ser un blanco de esta metiltransferasa y que la sobreexpresión de PPAR γ 2 en obesidad ha sido reportada por diversos estudios, aunado a que tanto PPAR γ como diversos blancos de este, presentan expresión rítmica en una HFD que no presentaba en condiciones de dieta control.

Al evaluar el efecto de G9A mediante el enriquecimiento de la marca generada por esta metiltransferasa: H3K9me2, se encontró una relación negativa entre los niveles de transcrito de *Ppar γ 1* y de *Ppar γ 2* con los niveles de H3K9me2 en la región +0.5 kb downstream del sitio de inicio de la transcripción (TSS) de *Ppar γ 1* y de *Ppar γ 2* en la región +0.7 kb downstream del TSS. Dicha marca se asocia a represión transcripcional y podría mediar la diferencia transcripcional a nivel temporal de *Ppar γ* que se observa en la obesidad inducida por la dieta (DIO).

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que G9A tiene como blancos genes implicados en el metabolismo. En este proyecto se especula que G9A podría regular la expresión rítmica de *Ppar γ 2* durante la DIO, ya que se identificó disminución en los niveles de H3K9me2 en la región downstream al TSS de *Ppar γ 2* en el periodo nocturno, así como incremento en su expresión transcripcional y proteica.

2. Abstract

Obesity is a complex and multifactorial pathology that triggers evident physiological and transcriptional changes in the liver. The liver, being an organ highly sensitive to metabolic changes, requires differential gene expression in response to these changes. It is known that the differential expression of several genes occurs rhythmically in periods close to 24 hours, these periods are called circadian rhythms. Most of the organisms developed an intrinsic clock that is able to pair with environmental rhythms and, through signals such as light, allow the entrainment of the endogenous clock with the environment. At molecular level, this endogenous clock is regulated by transcriptional factors, which by positive and negative regulation loops, give rise to circadian transcription. The effect of the molecular clock on metabolic genes, which imposes transcriptional oscillations in 24-hour periods, is particularly important.

At transcriptional level, it has been reported that around 20 and 30% of genes expressed in the liver oscillating in a circadian manner, but the appearance of diet-induced obesity (DIO) leads to changes in transcript oscillation. This generates a complex level of regulation that is accompanied by changes in chromatin. These changes may occur at level of post-translational histone modifications, such as methylation, and its effects may be associated with repression or transcriptional activation. Several histone marks of activating or repressive transcription occur rhythmically in clock genes and clock-controlled genes. The histone methyltransferases responsible for making these marks, may have changes in their expression in obesity conditions and this also alter their function. These antecedents show the close relationship between epigenetic regulation in gene transcription, and how its effect is modified by pathologies such as obesity.

In this study, male mice of strain C57BL / 6 were chosen because of their predisposition to the development of diet-induced obesity; and it was found that transcription is modified under a high fat diet paradigm, and it was notorious the gain of oscillation of 2 lysine methyltransferases under obesity conditions: *G9a* and *Nsd2*. At transcript level it is evident

for both cases, but at protein level, only G9A showed differential expression observed at day and night in animals under high fat diet.

To evaluate the effect of the mark generated by G9a, we chosen the two isoforms of the transcriptional factor PPAR γ , because of their antecedents in adipogenic regulation, in addition to being a target of this methyltransferase and that overexpression of PPAR γ 2 in obesity has been reported in various studies, coupled with the fact that PPAR γ and various targets of this transcriptional factor, has rhythmic expression in high fat diet but not in control diet.

When evaluating the effect of G9A by enrichment of the mark generated by this methyltransferase: H3K9me2, a negative correlation was found between *Ppar γ 1* and *Ppar γ 2* transcript levels, with H3K9me2 abundancy in the +0.5 kb region downstream of the transcription initiation site (TSS) of *Ppar γ 1* and in the +0.7 kb region downstream of the TSS of *Ppar γ 2*. This mark is associated with transcriptional repression and could mediate the temporal transcriptional difference of *Ppar γ* observed in diet-induced obesity.

G9A has as targets, genes involved in metabolism. In this project it is suggested that G9A could regulate the rhythmic expression of *Ppar γ 2* in obesity, since it was identified that the levels of H3K9me2 in the region downstream to the TSS of *Ppar γ 2* in the night period were low, as well as increasing in its transcriptional and protein expression.

3. Introducción

3.1 Ciclos circadianos

Los ritmos circadianos se refieren a ciclos con duración aproximada de 24 horas. Esta denominación proviene de su etimología del latín *circa*- alrededor de, *diem*- un día. Dicha duración está acoplada a los periodos de luz y oscuridad que se producen a causa de la rotación de la Tierra sobre su propio eje. Los ciclos de sueño-vigilia, temperatura corporal y la actividad de algunas hormonas y metabolitos, son ejemplos de ritmos circadianos en mamíferos, es decir, que oscilan diariamente.

Los ritmos circadianos son generados por un reloj endógeno autosostenible incluso en ausencia de señales ambientales. Además, pueden sincronizarse por estímulos externos o “zeitgebers” (del alemán *zeit*, tiempo y *geber*, dador) como la luz, la alimentación o la actividad física, lo que da lugar a la regulación de los sistemas fisiológicos [2, 13].

En el estudio de ritmos circadianos, se emplean dos términos que refieren una notación estandarizada con un periodo cercano a 24 horas: ZT (zeitgeber time) y CT (circadian time). El ZT0 hace referencia al tiempo en el que se inicia el estímulo sincronizador (usualmente el encendido de las luces) y el ZT12 cuando se suprime este estímulo (apagado de las luces). El término CT hace referencia a la hora subjetiva del día del organismo que no ha sido sincronizado con un zeitgeber, es decir que se ha mantenido en periodos de oscuridad o luz constantes. En cultivos celulares el término CT es usado para especificar el momento en el que se da un estímulo sincronizador a las células [14].

El reloj funciona de manera integral mediante: a) La recepción de un ZT mediante una vía de entrada que lo dirige al reloj central; b) el oscilador central mantiene y dirige los ritmos y c) una vía de salida que manifiesta los ritmos. Lo anterior permite controlar condiciones metabólicas, fisiológicas y de comportamiento (Figura 1) [15].

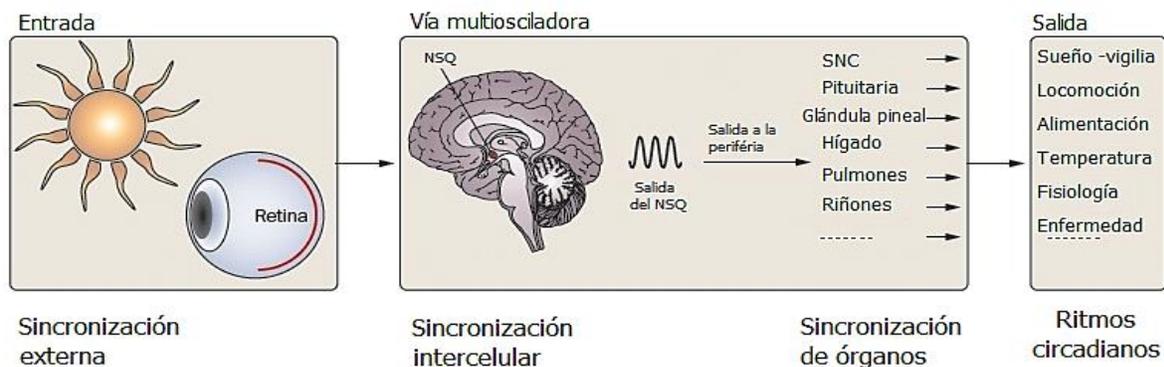


Figura 1: Señalización de la sincronización externa para sincronizar ritmos endógenos. La entrada de la señal lumínica hacia el NSQ por la retina, permite la sincronización de los relojes periféricos en diversos órganos, y su efecto se observa en diferentes actividades y cambios a nivel fisiológico en el organismo.

Imagen modificada de Koch, Bc. 2009 [8].

Para el correcto mantenimiento de los ritmos en mamíferos, los relojes funcionan de manera jerárquica. Para ello, el reloj central permite la sincronización de los relojes periféricos, los cuales se encuentran en casi todas las células del organismo y sincronizan de manera tejido-específica la transcripción de los genes [16].

En mamíferos, el reloj central se ubica en una región en el hipotálamo ventral del cerebro, denominada núcleo supraquiasmático (NSQ) [17]. El NSQ se compone por alrededor de 20,000 neuronas osciladoras que a través de conexiones neuronales se acoplan para controlar diferentes procesos biológicos circadianos [18]. Moore [19] distingue al NSQ en 2 secciones: el núcleo (core) y el revestimiento (shell), que se diferencian por la distribución de los péptidos que se expresan en las proyecciones aferentes. El núcleo se refiere a la división ventral del NSQ y es rico en polipéptido intestinal vasoactivo (VIP) y péptido liberador de gastrina (GRP), mientras que el revestimiento contiene neuronas inmunoreactivas a vasopresina-arginina.

Diversas evidencias identifican al NSQ como el oscilador principal en mamíferos. Por ejemplo, estudios en roedores en los que se lesiona el NSQ muestran pérdida de ritmicidad locomotora de los individuos [20, 21]. Los ratones *tau* han sido empleados como modelo

de estudio por su marcado fenotipo de actividad, siendo los wild-type los que presentan un ritmo cercano a 24 horas, mientras que los heterocigotos para la mutación tienen un ritmo de 22 horas y los homocigotos uno de 20 horas. Un estudio realizado por Ralph, M y col. [22] en este modelo, demuestra que la ablación del NSQ y posterior trasplante de NSQ le confieren al animal la capacidad de recuperar ritmicidad de acuerdo al genotipo trasplantado.

El NSQ oscila de manera autónoma, sin embargo, la luz funciona como el sincronizador diario del reloj central. Para ello en la retina las células intrínsecamente fotosensibles (ipRGC) que expresan el fotopigmento melanopsina, proyectan la señal lumínica hacia el tracto retinohipotalámico que llega al NSQ. Posteriormente, señales simpáticas, parasimpáticas y humorales conducen a la activación de diversas vías, lo que da lugar a la sincronización de los relojes periféricos [16, 23, 24].

En condiciones de disponibilidad de alimento que permiten sincronizar al reloj central y los periféricos, el reloj endógeno permite anticiparse al consumo de alimento, y con ello a la optimización de procesos como la digestión, metabolismo y almacenamiento de energía [25].

En cultivo celular, los relojes moleculares pueden sincronizarse por diferentes estímulos. Por ejemplo, en cultivos de fibroblastos de ratón la oscilación de genes circadianos se sincronizan con un estímulo de choque de suero o con dexametasona, un análogo de glucocorticoides, lo que permite establecer modelos celulares para estudiar procesos biológicos en los que está implicada la maquinaria del reloj circadiano [26, 27]. Además de estas técnicas, en cultivo de hepatoma de rata, se ha empleado la insulina como sincronizador, ya que se demostró que permite la oscilación de varios genes involucrados en la regulación de los ritmos circadianos [28].

3.2 Mecanismo molecular del reloj circadiano

A nivel molecular, el reloj circadiano en mamíferos se constituye por una red de factores transcripcionales (FT) que mediante bucles de regulación positiva y negativa controlan su actividad. Los factores que regulan positivamente el reloj son las proteínas Circadian Locomoter Output Cycles Protein Kaput (CLOCK) y Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator Like (BMAL1), mientras que los reguladores negativos son las proteínas Period (PER) y Cryptochrome (CRY).

Durante el día, las proteínas CLOCK y BMAL1 forman un heterodímero que reconoce y se une a secuencias consenso Enhancer-boxes (E-boxes), de los promotores en los genes controlados por el reloj (GCC), entre ellos, *Per*, *Cry* y *Rev-Erb*, generando altos niveles de transcripción de estos [29, 30]. Una vez alcanzadas concentraciones críticas de las proteínas PER y CRY en el citosol, estas forman un complejo que se transloca al núcleo e interactúa con CLOCK-BMAL1 para inhibir su propia transcripción. Como consecuencia, la transcripción de *Per* y *Cry* disminuye durante el periodo nocturno y se genera un nuevo ciclo (Figura 2)[29].

Algunos FT que son activados por el heterodímero CLOCK-BMAL1, son Rev-Erb α , Rev-Erb β que se unen a motivos RORE, y DBP, HLF, TEF y E4BP4, que se unen a D-boxes.

Los motivos E-box contienen una secuencia CANNTG, que es reconocida por los dominios básicos hélice-loop-hélice (bHLH) que contienen los factores de transcripción [31]. El motivo RORE es una secuencia rica en AT y se precede por el motivo GGTCA. Cuando el factor transcripcional REV-ERB se une a los elementos RORE presentes en el promotor de *Bmal1*, se reprime la transcripción de *Bmal1* [29, 30]. Las D-boxes son variantes del motivo de zipper de leucina (bZIP) y son secuencias de 9 o 10 pares de bases palindrómicas. Estos motivos son reconocidos por los dominios PAR-bZIP que se encuentran en los FT DBP, E4BP4, HLF y TEF [32].

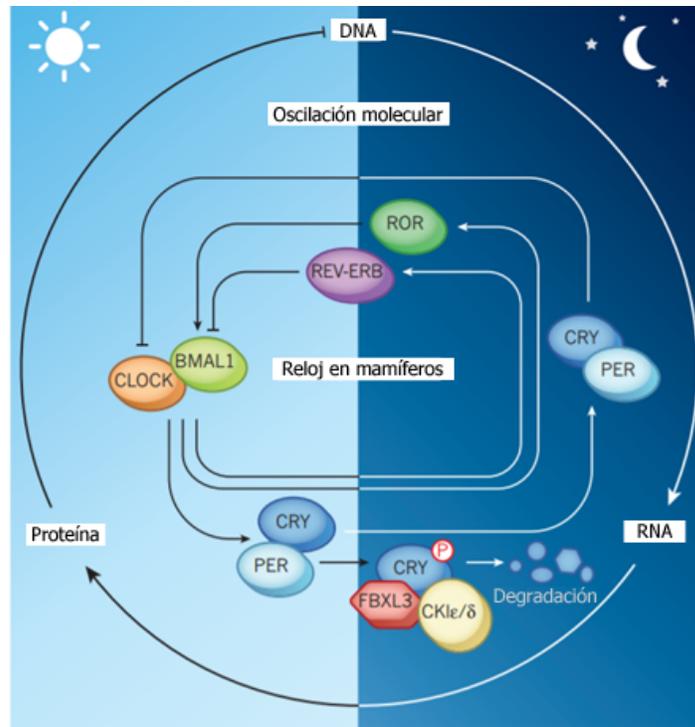


Figura 2: Mecanismo molecular del reloj circadiano. Formación del heterodímero CLOCK-BMAL1 y su regulación positiva para la transcripción de GCC. También se muestra la represión de PER y CRY en el complejo CLOCK-BMAL1. Por otro lado se muestran las oscilaciones en la expresión de los CCG en los relojes periféricos dadas por la maquinaria del reloj.

Imagen modificada de Bass, J. 2012.[2]

Diferentes evidencias demuestran que las modificaciones postraduccionales ayudan a mantener una oscilación de las proteínas del reloj, ya que permiten un retraso entre la activación y represión de la transcripción [33]. La fosforilación de las proteínas PER mediada por CK1ε y CKII controla la estabilidad de estas, así como su degradación por el proteosoma 26S. La degradación de las proteínas PER reinician el reloj, dando lugar a la activación del complejo CLOCK/BMAL1 [33]. Por otra parte, la fosforilación de BMAL1 efectuada por MAPK, se asocia a una disminución en su capacidad de unión a CLOCK para formar el heterodímero CLOCK/BMAL1 [34]. La acetilación es otra modificación importante que da más robustez a las oscilaciones del reloj. Se ha demostrado que CLOCK además de funcionar como factor de transcripción, tiene actividad de acetiltransferasa, lo que le confiere la capacidad de modificar dinámicamente la cromatina al acetilar H3 y H4 en los promotores de los GCC, lo que resulta en la transcripción de estos genes [35]. CLOCK

también acetila la lisina 537 de BMAL1, lo que da lugar al reclutamiento de CRY al heterodímero CLOCK/BMAL1 promoviendo así su represión transcripcional [36].

La expresión de mRNAs como *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Dbp*, *RevErb* α y β , *Cry1* y *Cry2* se ha encontrado de manera rítmica en relojes periféricos como hígado, corazón, pulmón, músculo esquelético, riñón y testículo [37]. Además mediante ensayos de expresión con luciferasa, se demostró que en explantes de hígado y pulmón, la oscilación circadiana de *Per2* y *Per3* está dictada por CLOCK, ya que su depleción genera una pérdida en la ritmicidad [38].

El funcionamiento adecuado de esta maquinaria permite que diferentes funciones biológicas se lleven a cabo, pero una disrupción en el reloj puede dar lugar a patologías que incluyen desórdenes metabólicos como la diabetes mellitus y obesidad, alteraciones del sueño, trastornos cardiovasculares, neuropsiquiátricos e incluso desarrollo de cáncer [39].

3.3 La obesidad y su relación con el reloj circadiano en mamíferos

La obesidad se caracteriza por la acumulación anormal de tejido adiposo en el cuerpo [40]. Este tipo de tejido es muy heterogéneo y se han caracterizado a las células que lo conforman como adipocitos blancos y pardos. El tejido pardo es altamente innervado y vascularizado, mientras que el blanco posee poca vascularización [41]. A estos tejidos se les han asociado funciones endócrinas, metabólicas para la regulación de glucosa y lípidos, respuesta inmune, sensibilidad a la insulina, termogénesis y función vascular-endotelial [42, 43]. Los adipocitos liberan hormonas y adipocinas como la leptina, angiotensinógeno, prostaglandinas, TNF α , IL-6, IL-8, fosfatasa alcalina y adiponectina, entre otras. La expresión de dichos factores depende del tamaño del adipocito y su localización, y participan modulando el metabolismo sistémico, por lo que un desbalance en la secreción de adipocinas en la grasa blanca, puede resultar en el desarrollo de enfermedades metabólicas [44].

También se conoce la relación que tiene el reloj circadiano con el incremento de peso y su repercusión en el desarrollo de obesidad y desórdenes metabólicos. Se sabe que la

maquinaria del reloj regula la actividad metabólica en los adipocitos [45] y que esta se ve alterada en una dieta rica en grasas, en la que hay incremento en tejido adiposo visceral que se asocia a resistencia a insulina y a inflamación sistémica y local [46].

Se ha demostrado que la alimentación funciona como un potente sincronizador en mamíferos, principalmente en los relojes periféricos, siendo el hígado un reloj altamente sensible a los cambios en la hora de alimentación. La disponibilidad de alimento como estímulo para sincronizar los ritmos endógenos se ha estudiado mediante la alimentación de roedores en sus horas de descanso (por el día), lo que invierte la expresión de genes controlados por el reloj (*Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry*, *Dbp*, *Rev-Erb α*) en relojes periféricos y convierte a la comida en un sincronizador que se desacopla del ciclo dictado por el reloj central [47]. Esta restricción alimenticia, al alterar la expresión de genes hepáticos, da lugar a un nuevo ritmo que es regulado por la alimentación [48].

En este escenario, la pérdida de ritmo en el consumo de alimentos así como cambios en la alimentación que propician un desacoplamiento de los relojes endógenos, pueden generar alteraciones metabólicas que conllevan a la obesidad y síndrome metabólico, lo que pone de manifiesto que el reloj circadiano y metabolismo se encuentran estrechamente ligados [49].

El uso de diferentes modelos de patrones de alimentación en roedores, como el ayuno intermitente, ayuno periódico, restricción calórica y restricción en el tiempo de alimentación se usan en la cronobiología para estudiar los efectos metabólicos de la ingesta de alimentos a horas específicas. En la restricción en tiempo de alimentación, el tiempo usado va de 2 a 12 horas de restricción y usualmente se mide el efecto en genes del reloj y GCC [50].

Modificar el tiempo de alimentación y la dieta es capaz de generar una reprogramación transcripcional. Se ha encontrado que someter a ayuno de 24 horas a los ratones genera que más del 80% de los transcritos rítmicos en alimentación *ad libitum*, dejen de oscilar, efecto que sugiere que una perturbación en el estado metabólico atenúa la expresión rítmica de la mayoría de los transcritos hepáticos [51].

Se ha demostrado que el consumo de una dieta rica en grasas induce la expresión de genes asociados al metabolismo de ácidos grasos, lo que contribuye a un incremento en la expresión de genes involucrados en la lipogénesis y secreción de lipoproteínas. Además, este tipo de dieta genera intolerancia a la glucosa así como resistencia a la insulina [52].

3.3.1 Modelos de estudio en ratones con mutaciones en genes del reloj para entender la obesidad

Mutaciones en diferentes genes del reloj permiten determinar la influencia que ejercen en el desarrollo de desórdenes metabólicos. Se ha estudiado el efecto de un knock-down para *Bmal1* en islotes pancreáticos de ratón, los cuales presentan una disminución en la secreción de insulina inducida por glucosa, lo que indica la persistencia en el bloqueo en la secreción de la insulina, dando lugar a hiperglucemia [53]. Por otro lado, la delección de *Bmal1* en hígado de ratones, conduce a hipoglicemia y cambio de expresión de genes hepáticos que regulan el metabolismo de glucosa [25]. Ratones con delección en *Per2* (*Per2*^{-/-}) muestran una reducción de peso y una disminución del 40% de grasa comparado con los WT. Además, los niveles en plasma de triacilglicéridos y ácidos grasos no esterificados se encuentran significativamente disminuidos, lo que demuestra una alteración en el metabolismo de lípidos causado por la delección del gen [54].

También se ha evaluado el efecto de una dieta rica en grasas, empleando como modelo ratones con mutaciones en genes del reloj, lo que permite describir mejor la relación entre el reloj endógeno y las patologías asociadas a desórdenes metabólicos. Un ensayo realizado en ratones C57BL/6J homocigotos para la delección del exón 19 del gen *Clock* (*ClockΔ19*) y WT alimentados con una dieta normal y una rica en grasa (HFD), muestran que la ganancia de tejido adiposo en los mutantes alimentados con dieta normal es 35% mayor que en los WT; mientras que en los ratones alimentados con HFD, los *ClockΔ19* tienen un incremento de tejido adiposo del 75% respecto a los WT, además de presentar adipocitos hipertróficos y acumulación de lípidos y glucógeno en hepatocitos, hipercolesterolemia,

hipertrigliceridemia, hiperglucemia e hipoinsulinemia, parámetros que reflejan el desarrollo de un desorden metabólico y que son más severos en animales *Clock* Δ 19 [49].

Por otro lado, ratones con delección homocigota para *Cry1*, muestran resistencia a la obesidad al ser sometidos a una HFD; este efecto se refleja en la pérdida de peso y disminución en el almacenamiento de grasa comparado con el control [55]. Mientras que la doble delección de *Cry1* y *Cry2* (*Cry1/2*^{-/-}) da lugar a hiperinsulinemia en condiciones basales de glucosa, y confiere resistencia a la insulina en tejido adiposo blanco, lo que promueve acumulación de lípidos y permite el desarrollo de obesidad y desórdenes metabólicos [56].

Ratones homocigotos para la mutaciones de *mPer2* (*mPer2*^{-/-}) alimentados con una HFD, tienden a comer más durante la fase diurna que su control *mPer2*^{+/+}, y en general presentan hiperfagia. Para explicar este cambio en la alimentación, se propone que la producción ineficiente del péptido α MSH en el inicio del periodo de luz da lugar a la hiperfagia y la evidencia que sostiene esta hipótesis se basa en la suplementación de α MSH en ratones, lo que genera que el consumo de alimentos al inicio de la fase diurna disminuya [57].

3.3.2 Polimorfismos en GCC asociados a enfermedades metabólicas en humanos

Diferentes estudios de GWAS (Genome-Wide Association Studies) han demostrado que polimorfismos en GCC se asocian a enfermedades metabólicas en humanos, principalmente a diabetes. A continuación se detalla la información encontrada en estudios realizados en humanos para diferentes GCC:

Tabla 1: Polimorfismos asociados a enfermedades metabólicas en humanos					
Gen	SNPs	Variación	Localización	Patología	Referencia
Clock	rs1801260	T>C	gen 4; 3' UTR	Dislipidemia y diabetes	[58]
	rs10002541	T>C	Cromosoma 4; intrón	Diabetes	[59]

	rs12649507	G>A	Cromosoma 4; intrón	Consumo de alimento	[60]
	rs4580704	G>C	Cromosoma 4; intrón	Diabetes	[61]
	rs4864546	G>A	Cromosoma 4; cerca gen-5'	Diabetes	[59]
Per3	rs57875989	Delección/ inserción	Cromosoma 1; 5' cerca gen	Diabetes	[62]
Bmal1	rs11022775	C>T	Cromosoma 11; intrón	Diabetes mellitus gestacional	[63]
	rs7950226A	G>A	Cromosoma 11; intrón	Diabetes mellitus gestacional	[63]
Cry1	rs12315175	T>C	Cromosoma 12	Diabetes	[64]
Cry2	rs2292912	C>G/T	Cromosoma 11; intrón	Diabetes	[64]

3.4 Organización nuclear del genoma

Adicionalmente a la relación que tiene el reloj circadiano con la aparición de enfermedades como la obesidad, se ha descrito que la epigenética puede también explicar el desarrollo de enfermedades complejas como la obesidad.

La epigenética, entendida como “el estudio de los procesos que controlan la expresión génica sin un cambio en la secuencia de DNA” [65], permite explicar cómo dichos cambios ocurren por alteraciones en la estructura de la cromatina.

La información genética de los organismos eucariontes está contenida en el núcleo celular y presenta diferentes niveles de compactación en forma de un complejo de DNA y proteínas denominado cromatina. La unidad estructural de la cromatina es el nucleosoma, constituido por un octámero de proteínas llamadas histonas, y una hebra de DNA de 147 pares de bases que la rodea en dos vueltas levóginas. Las histonas son proteínas cargadas

positivamente y típicamente un nucleosoma contiene dos pares de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. Dado que el DNA está cargado negativamente por los grupos fosfato que contiene, es capaz de formar enlaces, principalmente de tipo electrostático, con las histonas [66]. La cromatina es una estructura dinámica, que además de empaquetar el genoma eucarionte, puede tener implicaciones en los procesos de transcripción, reparación de DNA o replicación, dependiendo de la accesibilidad que tienen las maquinarias que median estos procesos para unirse a una región de cromatina [6, 67].

Desde el punto de vista estructural y funcional, la cromatina se clasifica en dos grupos: eucromatina y heterocromatina (Figura 3). La eucromatina, se refiere a regiones del genoma que poseen genes transcripcionalmente activos y donde las secuencias regulatorias son accesibles a las nucleasas. Además las histonas H3 y H4 presentan hiperacetilaciones en sus residuos N-terminal de lisina [66]. Por otro lado, la heterocromatina se refiere a regiones transcripcionalmente inactivas y condensadas; estas regiones son inaccesibles a las nucleasas y generalmente están metiladas en los dinucleótidos CpG, y a diferencia de la eucromatina, las histonas se encuentran hipacetiladas [66]. La heterocromatina a su vez, puede dividirse en heterocromatina constitutiva y facultativa. La primera se caracteriza por altos niveles de trimetilación de la lisina 9 de la histona 3 (H3K9me3) y metilación de DNA, además de encontrarse en regiones pobres en genes. Además puede aparecer en un cromosoma completo, ocupar grandes regiones del cromosoma o en regiones reguladoras del gen. Las proteínas del complejo Polycomb son importantes ya que dan lugar a la metilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27) que favorece la heterocromatinización. Por otro lado la dimetilación de la lisina 9 de la histona 3 (H3K9me2) se ha asociado a heterocromatina facultativa, sin embargo se desconoce cómo esta marca puede dar lugar a la condensación de la cromatina [68, 69].

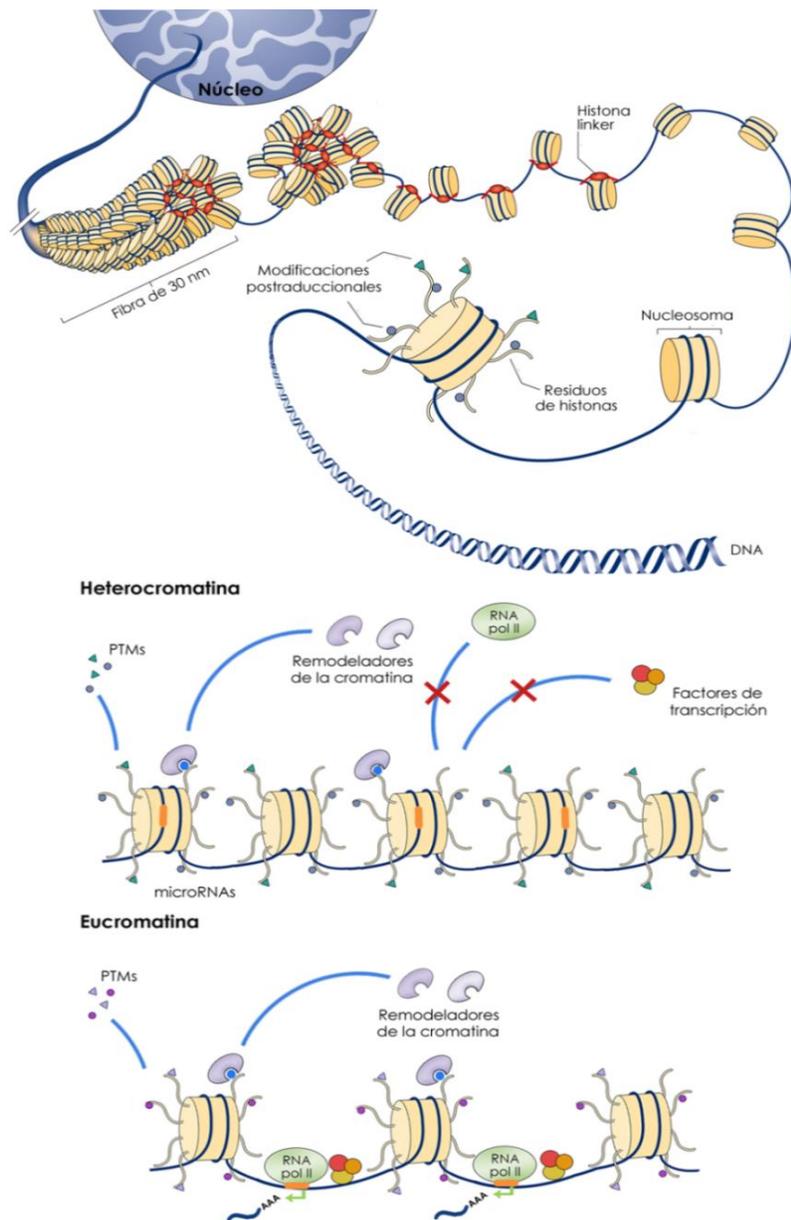


Figura 3: Organización nuclear del genoma y formación de heterocromatina y eucromatina. Niveles de organización de la cromatina desde su compactación en el núcleo hasta la unidad mínima estructural, el nucleosoma. Formación de heterocromatina, característica de un estado transcripcional represivo que necesita de la aparición de modificaciones postraduccionales (PTMs) específicas, así como remodeladores de la cromatina y microRNAs. La eucromatina posee marcas activadoras de la transcripción, así como el reclutamiento de la RNA polimerasa II y factores transcripcionales específicos.

Imagen modificada de Fyodorov [9], D., 2018 y Croken, M., 2012 [12].

La heterocromatina rodea los centrómeros y telómeros de los cromosomas, la región de heterocromatina que rodea los centrómeros se denomina heterocromatina pericéntrica. Este tipo de heterocromatina se considera constitutiva y es rica en regiones A+T, además de contener elementos transponibles de DNA y repetidos satelitales. La heterocromatina puede generar silenciamiento transcripcional al extenderse hasta encontrar un elemento

de barrera que impide su esparcimiento [70]. Este fenómeno se denominó variegación por efecto de posición y fue descubierto en *Drosophila melanogaster*. La heterocromatina pericéntrica se encuentra hipoacetilada y posee enriquecimiento de la proteína HP1, así como de metilaciones en la lisina 9 de la histona 3 (H3K9) [71].

3.4.1 Modificaciones postraduccionales de las histonas

La formación de eucromatina, así como la de heterocromatina, se dicta por la aparición de grupos químicos que se añaden a los aminoácidos terminales de las histonas, los cuales se denominan modificaciones postraduccionales de las histonas (PTMs). Algunas de las PTMs más estudiadas corresponden a la adición de grupos acetilos (acetilación), metilos (metilación), fosfatos (fosforilación), entre otros [72].

La aparición de PTMs afectan la estabilidad de los nucleosomas ya que alteran las interacciones químicas dentro del nucleosoma o con nucleosomas aledaños. Directamente, las PTM pueden modificar las interacciones DNA-histona o pueden regular el proceso de transcripción al reclutar proteínas de unión específicas mediante la aparición de marcas de histonas [18]. En relación a los efectos que pueden tener a nivel transcripcional, algunas marcas pueden actuar como activadoras o represoras [67]. Estas modificaciones al combinarse específicamente, generan una función nuclear determinada [73].

Las enzimas “escritoras, borradoras y lectoras” son los efectores centrales que permiten comprender las respuestas fisiológicas en diversos tipos celulares. Las enzimas que añaden PTMs a las histonas funcionan como “escritoras”. También hay enzimas que remueven PTM específicas y se denominan “borradoras”. Finalmente las enzimas “lectoras”, se encargan de reconocer las marcas específicas para dirigir un resultado transcripcional particular (Figura 4) [74].

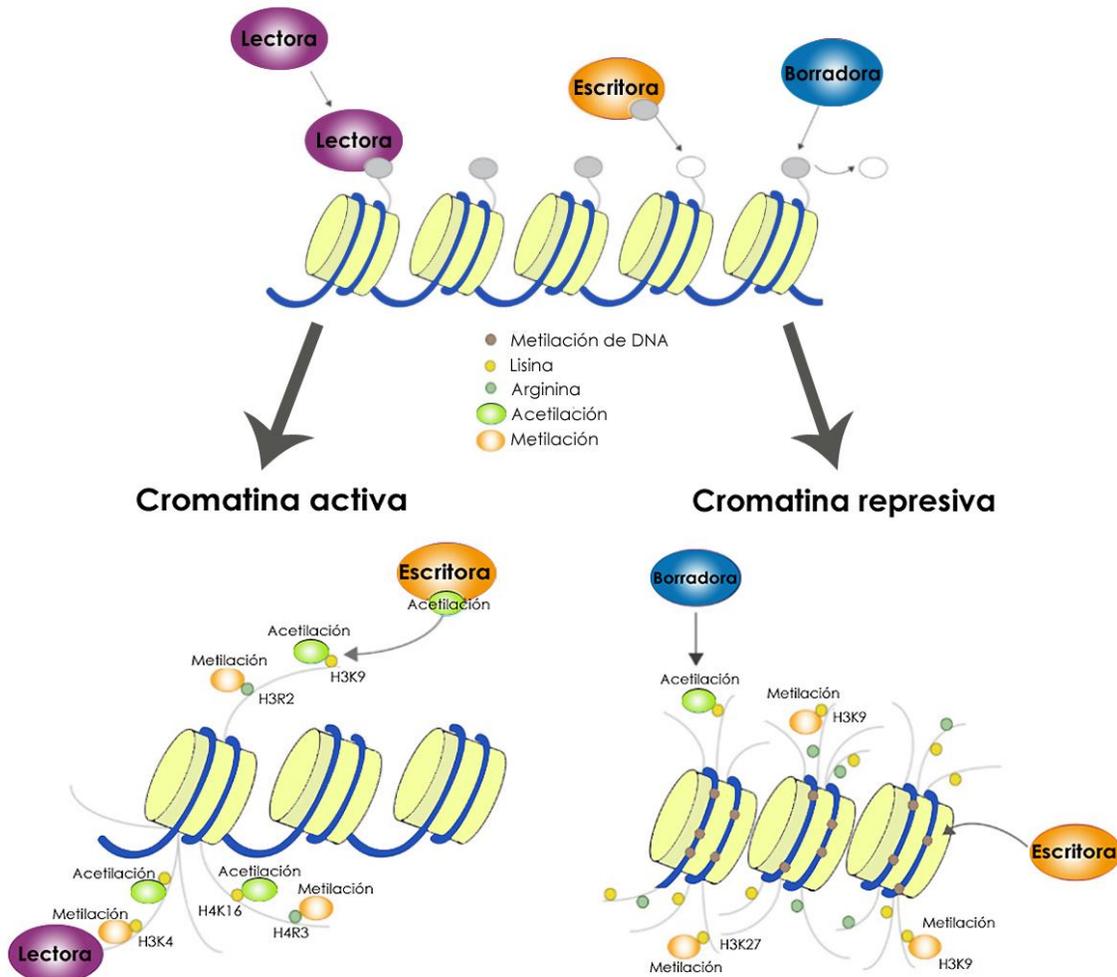


Figura 4: Mecanismo del código de histonas para dar lugar a cromatina activa y represiva. Se esquematiza el mecanismo general en el que proteínas “escritoras” adicionan PTMs a aminoácidos específicos de las histonas, las cuales son interpretadas por proteínas “lectoras”. Un grupo más de proteínas “borradoras” eliminan las PTMs. Estos 3 grupos de efectores epigenéticos participan modificando la accesibilidad de la cromatina generando un “código” que le permite estar laxa o compacta dependiendo del reclutamiento de los efectores epigenéticos, lo que da lugar a un programa transcripcional determinado.

Imagen modificada de Panzani, M, 2016 [10].

La acetilación de la histona 3 en residuos específicos de lisina, es una de las modificaciones postraduccionales más estudiadas y se ha asociado a la activación transcripcional [75, 76]. Por otro lado, la metilación ocurre en los residuos de lisina, arginina e histidina [72] y puede tener diferentes efectos en la función de la cromatina y esta variación depende del tipo de residuo y su posición. Es decir, las marcas en la histona 3 (H3) lisina 9 (K9) dimetilada (me₂), H3K9me₂, H3K9me₃ y H3K27me₃ se asocian a silenciamiento y heterocromatinización, mientras que las marcas H3K4me₃, H4K36me y H3K79me se asocian a cromatina activa [77].

3.4.1.1 Metiltransferasas de histonas

Las metiltransferasas de histonas (HMT) pueden actuar sobre diferentes aminoácidos y se distinguen en metiltransferasas de arginina (PRMT), metiltransferasas de lisina (KMT) y metiltransferasas de histidina.

Las PRMT pueden realizar mono (MMA) o dimetilación simétrica (SDMA) o asimétrica (ADMA), mientras que las KMT pueden hacer mono, di o trimetilación. Dependiendo de la marca generada, el efecto será de activación o represión transcripcional [6].

Las PRMT se dividen en 4 grandes grupos dependiente del tipo de los productos catalizados por su reacción. Ambas clases catalizan la formación de arginina monometilada (MMA). Las PRMT de tipo I catalizan la formación de ADMA. Las PRMT de clase II catalizan la formación de SDMA. En el tipo III, se encuentra PRMT7 que solo puede tener función de MMA. PRMT9 parece no tener función enzimática, así que se le asigna la clasificación en el grupo IV.

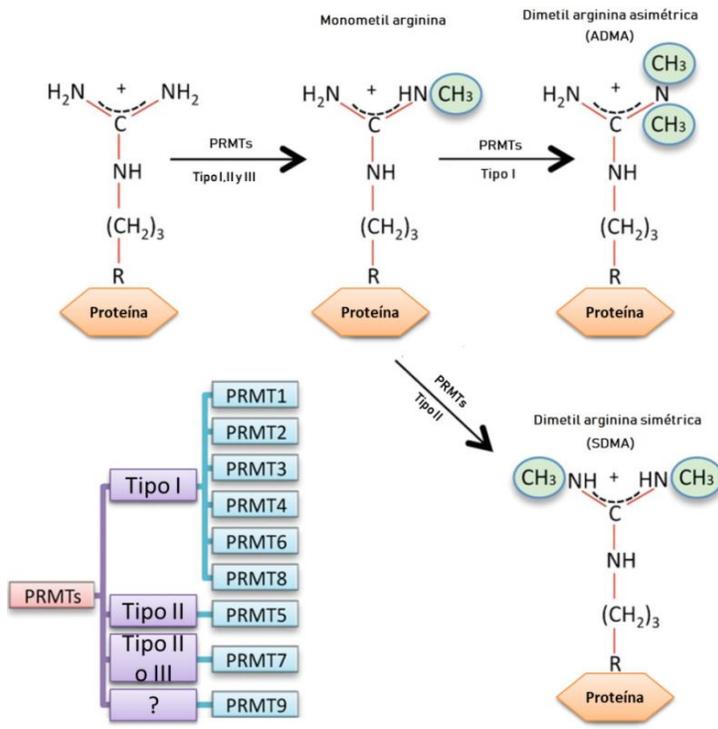


Figura 5: Mecanismo de formación de MMA, ADMA y SDMA catalizado por PRMTs. Se muestra además la clasificación de las PRMTs que se conocen.

Imagen modificada de Molina-Serrano, et al. 2013 [7]

La función principal de la metilación de arginina radica en la modulación de las interacciones proteína-proteína [7, 78, 79]. La figura 5 esquematiza la formación de productos catalizados por las PRMTs así como la clasificación de estas.

Por otro lado las KMTs clasifican en familias dependiendo de la similitud de las secuencias al dominio SET (Su(var)3-9, Enhancer of zeste y Trithorax), así como en sus características estructurales y presencia de otros dominios proteicos, lo que da lugar a 7 familias de KMTs (Figura 6). El dominio SET está conformado por 130-140 aminoácidos, es una secuencia altamente conservada y fue descubierto en las proteínas SUVAR39 (Suppressor Of Variegation 3-9 Homolog 1), EZH (Enhancer of zeste) y TRX (Trithorax) de *Drosophila melanogaster*. La familia SET1 se caracteriza por la presencia de un motivo post-SET en el C-terminal de la proteína. La familia SUVAR39 posee un dominio SET flanqueado por los motivos pre-SET y post-SET. En la familia SET2, el dominio SET está flanqueado por los motivos AWS (Associated with SET) y post-SET. En la familia EZH, el dominio SET está en el C-terminal y tiene motivos SANT (Swi3, Ada2, N-Cor, and TFIIIB). La familia SMYD2 (SET and MYND domain) contiene un motivo de dedos de zinc anterior al motivo SET. En la familia PRDM (PRDI-BF1 and RIZ homology domain containing) existen cambios de aminoácidos en un dominio altamente conservado dentro del dominio SET. Las KMTs con dominio SET que no comparten cualidades de las otras familias forman un grupo independiente. Existe además una KMT (Dot1l) que no posee dominio SET y tampoco forma parte de esta clasificación [6].

En el mecanismo que permite la metilación de las histonas participa un metabolito que actúa como donador de grupos metilo: la S-adenosil-L-metionina (SAM), que sufre un ataque nucleofílico por el residuo de lisina y permite la liberación de S-adenosin homocisteína (SAH) [80].

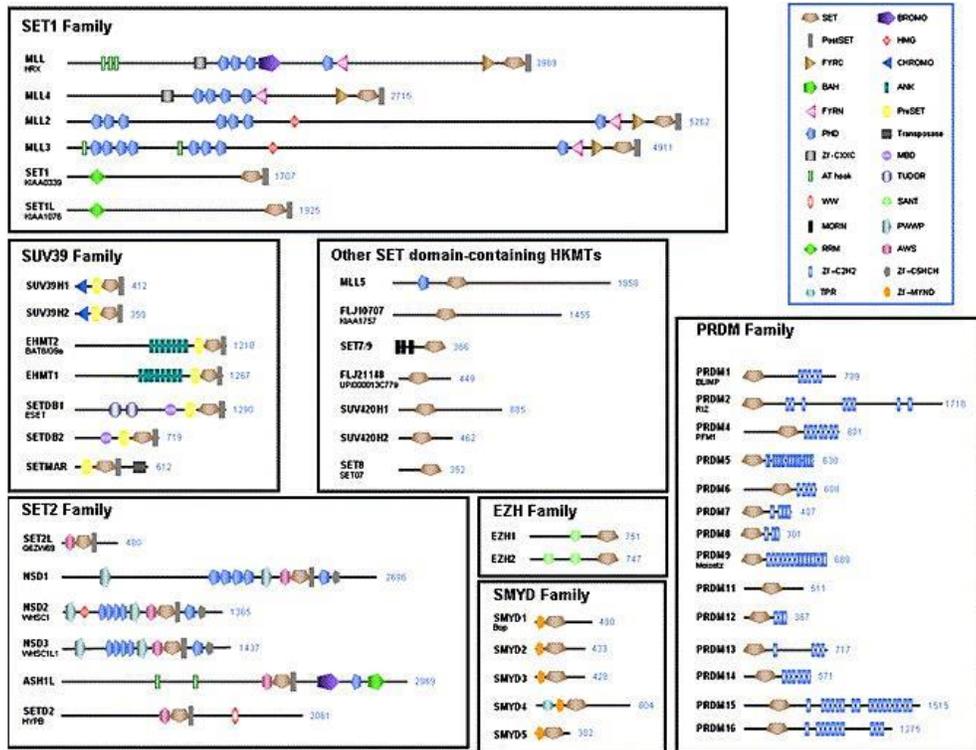


Figura 6: Clasificación de las KMTs. Se agrupan de acuerdo a la familia a la que pertenecen, así como las metiltransferasas de cada uno. No se incluye la única metiltransferasas conocida sin dominio SET.

Imagen tomada de Völkel, P, 2007[6].

La KMTs elegidas para el estudio presentan funciones en el metabolismo de lípidos, adipogénesis, obesidad o diabetes y algunas presentan antecedentes implicados en la regulación de la transcripción circadiana, los cuales son mostrados a continuación:

Familia KMT1

SUV39H1

Se sabe que Suv39h1 se encuentra incrementada en desarrollo, por lo que en ratones adultos la abundancia de mensajero es baja [81, 82]. SUV39H1 es la principal enzima que genera la marca H3K9me3. SIRT1 actúa sobre SUV39H1 promoviendo su desacetilación y su activación, lo que contribuye al incremento en los niveles de la marca H3K9me3 y con ello a la formación de heterocromatina [83]. Se ha reportado que SUV39H1 actúa en diferentes tejidos y diferentes procesos celulares. En diferenciación adipogénica, se ha encontrado

que las metiltransferasas SUV39H1 y G9A son reclutadas por AP-2 α al promotor del factor de transcripción C/EBP α , el cual permite la expresión de genes adipogénicos. Este reclutamiento dirigido a C/EBP α da lugar a la inhibición de su expresión [84]. Estudios circadianos en hígado de ratón muestran que la metiltransferasa SUV39H1 y HP1 γ forman parte del complejo PERIOD. HP1 γ se encarga de reclutar a SUV39H1 al promotor de *Per1* y da lugar a las marcas H3K9me2 y H3K9me3, las cuales aparecen de manera circadiana y dan lugar a un estado de cromatina represiva [85].

G9A

G9A es una metiltransferasa de histonas que actúa en la cromatina y genera la marca H3K9me2 asociada a silenciamiento transcripcional. G9A/GLP es capaz de interactuar físicamente con el Complejo Represivo Polycomb 2 (PRC2) mediante su unión con EZH2, siendo la actividad enzimática de G9A capaz de reclutar a la metiltransferasa EZH2 a diferentes genes blanco que en su mayoría están implicados en desarrollo, lo que da lugar a su silenciamiento, sin embargo el mecanismo específico se desconoce. Se propone que *in vitro*, el correclutamiento de G9A y PRC2 permite un estado de heterocromatina por la capacidad de G9A de generar la marca H3K27me, así como su marca canónica H3K9me2 [86]. La metiltransferasa G9A provee la marca H3K9me2 que sirve como sustrato para que Suv39H1 genere la H3K9me3, el enriquecimiento de esta marca en el promotor de C/EBP α da lugar a la inhibición de la adipogénesis [84]. Diferentes funciones metabólicas también se han asociado a esta metiltransferasas, por ejemplo, en diferenciación adipogénica, se ha reportado que la inhibición de G9A y con ello la disminución de la marca H3K9me2 en el locus de PPAR γ promueve la adipogénesis. Además, induce la expresión de *Wnt10a*, un represor adipogénico, cuya actividad está regulada de manera independiente a la actividad enzimática de G9A [87]. También se ha asociado a la eliminación de colesterol mediada por ácidos biliares, ya que interactúa con SHP quien reprime al promotor del gen que codifica para CYP7A1, enzima específica de hígado que cataliza el primer paso limitante en una de las vías de biosíntesis de ácidos biliares, por lo que se inhibe la síntesis de éstos. También se ha demostrado que G9A es capaz de regular la transcripción del gen *Fgf21*, el cual promueve lipólisis, oxidación de ácidos grasos y cetogénesis. En este modelo, G9A es

reclutada por E4BP4 al promotor del gen y con ello genera un enriquecimiento de la H3K9me2, propiciando su represión transcripcional en condiciones de alimentación e inhibiendo los procesos antes mencionados [88]. Se ha reportado que G9A presenta expresión rítmica en dieta rica en grasas pero no existen más estudios de la regulación circadiana sobre esta enzima [3].

SETDB2

Setdb2 genera la marca H3K9me3 asociada a heterocromatina [89]. Se ha descrito que SETDB2 induce la expresión del gen *Insig2* dependiendo del estado metabólico. En hígado de ratón, el reclutamiento de SETDB2 y del receptor de glucocorticoides (GR) en el *loci* +41kb de TSS del gen *Insig2* permite la interacción enhancer-promotor, favoreciendo la transcripción de este gen y la inhibición de lipogénesis en el ayuno [90].

Familia KMT2

MLL1

MLL1 realiza la marca H3K4me3 asociada a promotores de genes activos. Experimentos en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) muestran que MLL1 es capaz de formar un complejo con CLOCK/BMAL1 permitiendo su reclutamiento de manera rítmica a la cromatina en los promotores de GCC, lo que da lugar a la aparición de la marca H3K4me3 y que promueve la aparición de la marca de acetilación en H3K9/14. Adicionalmente se midió la expresión de los mensajeros de *Dbp* y *Per2* en ratones knock-out (KO) para Mll1 y en ratones WT, encontrando que los KO pierden oscilación rítmica de ambos mensajeros, por lo que MLL1 juega un papel importante en la manutención de oscilaciones en genes circadianos [71]. Interesantemente, en hígado de ratón se ha reportado la regulación circadiana de los niveles de H3K4me3. El mecanismo que explica este fenómeno, indica que MLL1 es acetilada por CBP y p300 y su desacetilación es llevada a cabo por SIRT1. SIRT1 es una deacetilasa de clase III cuya actividad depende de los niveles de su cofactor NAD⁺, el cual oscila circadianamente. Bajos niveles de NAD⁺ permiten la acetilación de MLL1 y con ello se favorece la activación transcripcional, mientras que al incrementar los niveles de

NAD⁺, se potencia la actividad de SIRT1 para desacetilar MLL1 de manera rítmica, lo que conlleva a una disminución de su actividad enzimática reflejada en la disminución de los niveles de H3K4me3 [91].

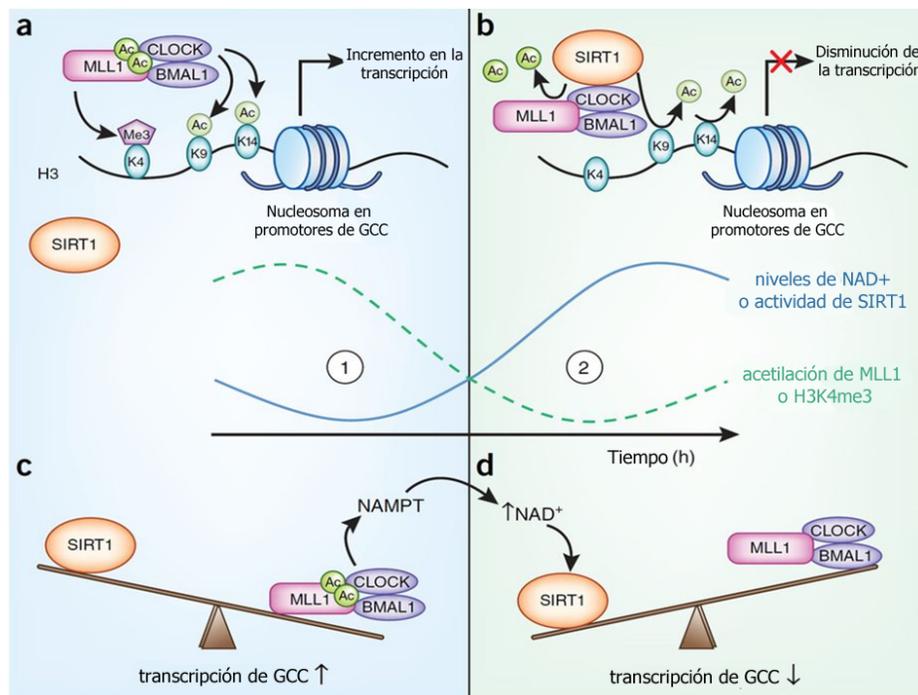


Figura 7: Regulación de la transcripción circadiana de GCC mediada por MLL1. a) Representación que muestra la formación del complejo CLOCK/BMAL1 con MLL1, favoreciendo la acetilación dependiente de la actividad HAT de CLOCK, así como la actividad de MLL1 para generar la H3K4me3 cuando los niveles de NAD⁺ y la actividad de SIRT1 son bajos, lo que da lugar a activación transcripcional. b) Escenario que muestra que el incremento en los niveles de NAD⁺ y de la actividad de SIRT1, se favorece la desacetilación de MLL1 y con ello el decremento de la H3K4me3, dando lugar a represión transcripcional. c-d) Esquema que muestra la transcripción circadiana favorecida de Nampt por la formación del complejo CLOCK/BMAL1 con MLL1. Lo que conlleva incremento en los niveles de NAD⁺ y el incremento de la actividad de SIRT1 que genera una disminución en la transcripción de GCC.

Imagen tomada de Tasselli, L. 2015 [11]

Familia KMT3

SMYD2

Esta metiltransferasa genera la marca H3K36me2 [92] cuyo enriquecimiento se observa en regiones promotoras y cuerpo del gen y se asocia a activación transcripcional [93]. La actividad de esta KMT se ha asociado principalmente a la regulación de ciclo celular, remodelamiento de la cromatina y regulación transcripcional, no obstante se ha reportado

que interactúa con proteínas implicadas en el desarrollo de diversos tipos de cáncer, por lo que su estudio se ha enfocado más a dicha patología [92].

NSD2

Metiltransferasa que genera la marca H3K36me₂, la cual se encuentra enriquecida en el cuerpo de gen y se asocia a la elongación de la transcripción. Su aparición en el promotor de genes indica actividad transcripcional, ya que impide la expansión de la metilación de H3K27 mediada por el complejo PRC2 de Polycomb [94]. Diversos estudios han demostrado la relación de NSD2 con diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) revelando que, en esta patología, la expresión de *Nsd2* se encuentra disminuida [95, 96]. Ensayos en líneas celulares de células β pancreáticas demuestran que la expresión ectópica de NSD2 favorece el incremento de la expresión del factor de transcripción *Pdx1*, y el mecanismo regulatorio se da a través de un incremento de NSD2 en el promotor del gen *Pax1*, acompañado del enriquecimiento de la marca H3K36me₂. Este mecanismo da lugar a un aumento en la secreción de insulina por la actividad de *Pdx1* [96]. También se ha estudiado el papel de NSD2 en adipogénesis mediante un modelo mutante para la histona H3.3: H3.3K36M, el cual mimetiza el efecto de la inhibición de NSD2 al disminuir los niveles de H3K36me₂. Este estudio revela dos mecanismos por los que se inhibe la adipogénesis: el primero mediante el incremento de los niveles de H3K27me₃ en diversos *loci* de *C/EBPα* lo que impide su expresión; y el segundo mediante la inhibición de la expresión inducida por ligandos de los genes diana de *PPARγ* [97]. Tanto *C/EBPα* como *PPARγ* son reguladores transcripcionales maestros de la adipogénesis por lo que resulta importante elucidar su regulación.

Familia KMT5

SUV420h2

La metiltransferasa SUV420h2 actúa trimetilando la histona 4 de la lisina 20 (H4K20me₃), cuya marca es abundante en regiones de heterocromatina pericentromérica, telómeros, regiones improntadas y elementos repetidos del genoma, por lo que mantiene un estado de heterocromatina constitutiva y se asocia a represión transcripcional [98]. Se ha

reportado que SUV420H1 actúa promoviendo la diferenciación de adipocitos marrón, y que su knock-down, genera una disminución en la expresión de marcadores adipogénicos importantes como *Ucp1*, *Pgc1α*, *Pparγ* y *αP2*, por lo que no descartan la importancia de esta KMT durante desarrollo de tejido adiposo [99].

Familia KMT6

EZH2

La metiltransferasa EZH2 realiza las marcas H3K27me2 y H3K27me3. Se ha demostrado que participa durante el compromiso adipogénico a través de S6K1, el cual fosforila el residuo 36 de serina de la histona H2B, lo que permite el reclutamiento de EZH2 a los promotores de sus genes blanco *Wnt6*, *Wnt10a* y *Wnt10b*, lo que da lugar a su represión transcripcional [100]. Por otro lado, se ha evaluado el efecto de realizar un knockdown dirigido a *mEZH2* en la línea celular NIH/3T3, lo que revela que esta metiltransferasas es indispensable para generar oscilaciones circadianas de *Bmal1* y *Per2*. Además se demostró mediante un ensayo de ChIP-qPCR la aparición rítmica de las marcas de H3K27me2 y H3K27me3 en los promotores de *Per1* y *Per2* [101].

3.5 Regulación epigenética de los ciclos circadianos

El remodelamiento de la cromatina, así como la accesibilidad de esta, son factores importantes para las modificaciones circadianas y que permiten regular la transcripción de genes [102].

A nivel de marcas epigenéticas, la transcripción de componentes del reloj como *Clock* y *Bmal1* se ha asociado a cambios circadianos en la acetilación de H3 y remodelación de la cromatina [27]. Mediante ensayos de ChIP-qPCR en hígado de ratón, se ha demostrado que la acetilación de H3 y la unión de RNAPol II se encuentran enriquecidas en las regiones promotoras de los genes *Per1*, *Per2* y *Cry* de manera rítmica, al igual que los niveles basales de mensajero. Este efecto puede ser explicado por la unión circadiana de la acetiltransferasa de histonas p300 a CLOCK, lo que indica que p300 forma parte del

complejo coactivador CLOCK-BMAL1. En el caso de la regulación negativa, se demostró que las proteínas CRY inhiben la transcripción inducida por la acetilación de p300 [103].

De manera interesante, se ha reportado la actividad de CLOCK como acetiltransferasa en la histona H3K9/K14, que se asocia a cromatina accesible para la transcripción. Esta proteína posiblemente también actúa con otras acetiltransferasas de histonas que permiten mantener los ritmos de acetilación en los promotores de GCC (Figura 8) [104].

Estudios de CHIP-seq en hígado obtenidos a lo largo de 24 horas revelan que las marcas de histonas H3K4me3 y H3K27ac presentan oscilaciones circadianas. Se analizaron las marcas H3K4me3, que se da a nivel de promotores y cuyos transcritos poseen ritmicidad circadiana, así como la H3K27ac se da a nivel de enhancers y promotores, encontrando que la actividad sinérgica genera transcritos oscilatorios [105].

Metiltransferasas de histonas también han sido objetos de estudio por la influencia que ejercen en la aparición rítmica de marcas de histonas. Como se describió anteriormente, tanto EZH2 [101] como MLL1[71, 91] son indispensables para mantener las oscilaciones de GCC (Figura 8). Se ha descrito también el papel de la demetilasa de histonas Jarid1a (que desmetila la marca H3K4me3/me2 y se sabe que interactúa con el complejo CLOCK/BMAL1, lo que da lugar a la inhibición del efecto de HDAC1 en la región promotora de *Per2*, por lo que se incrementan los niveles de acetilación y con ello la actividad transcripcional de *Per2* [106].

Un escenario más complejo de regulación involucra también la relación que tiene la transcripción circadiana en metabolismo. Se sabe que la desacetilasa SIRT1 desacetila blancos histónicos y no histónicos, entre ellos FT implicados en el control metabólico como miembros de la familia FOXO, PGC1 α y LXR. Además se ha demostrado que la expresión de SIRT1 ocurre de manera circadiana en hígado y MEFs sincronizados, y es capaz de unirse a CLOCK circadianamente, teniendo un pico en el ZT4 [107]. En relación a este estudio, también se ha comprobado que SIRT1 controla de manera circadiana la acetilación de BMAL1 y esta actividad enzimática puede estar regulada temporalmente por PTMs [108]. Aún más relevante resulta el hallazgo de la oscilación circadiana del cofactor de SIRT1,

NAD⁺. Se ha determinado que la oscilación circadiana de NAD⁺, se debe a la oscilación de la enzima limitante que participa en la vía de rescate de NAD: *Nampt*. Este gen posee 3 E-boxes altamente conservadas a las cuales se une el complejo CLOCK-BMAL1 lo que da lugar a su expresión cíclica [109].

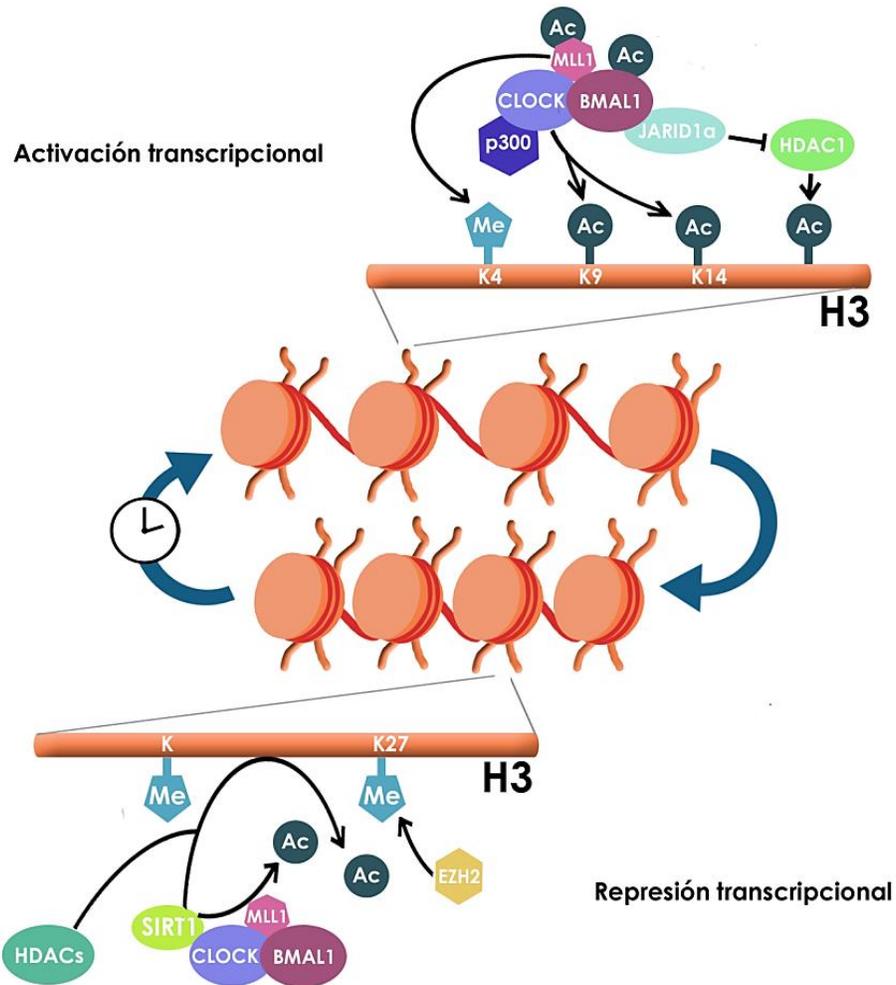


Figura 8: Cambios rítmicos en la cromatina dirigidos por efectores epigenéticos. Los cambios dinámicos en la cromatina que permiten la transcripción circadiana de genes se regula a través de mecanismos de activación y represión transcripcional. En el caso de activación, la actividad HAT de CLOCK, permite la acetilación de los residuos K9/14 de la histona 3. Además la acetilación de MLL1 en los residuos K1130 y K1133 permite que esta realice la marca H3K4me3. JARID1a al inhibir la actividad de HDAC1 da lugar al incremento en los niveles de acetilación globales. Por otra parte, la represión transcripcional puede estar mediada por la aparición rítmica de H3K27me3 generada por EZH2 en sus blancos, así como por el efecto de las HDACs y de SIRT1. SIRT1 tiene blancos histónicos y no histónicos, en este último caso, es capaz de desacetilar a MLL1 y con ello reducir su actividad enzimática, reflejada en la disminución de los niveles de H3K4me3 en regiones promotoras de sus blancos.

3.6 Regulación epigenética de los ciclos circadianos en un modelo de obesidad inducida por la dieta

A nivel del genoma, se sabe que la alimentación con dieta rica en grasas genera cambios en los perfiles de expresión de los genes. Muchos de estos genes codifican enzimas o intermediarios involucrados en el metabolismo de glucosa y lípidos y responden muy eficazmente a los cambios en la dieta. El hígado, un órgano altamente metabólico y que participan en la respuesta a condiciones de alimentación, ayuno y re-alimentación, también presenta cambios en su perfil de expresión a nivel transcripcional, modificándose bajo el estímulo de los factores mencionados [110]. Se ha demostrado que en el hígado ratones WT alimentados con una dieta normal, presenta alrededor de 10-30% de genes que oscilan circadianamente [111].

También se ha comparado la oscilación circadiana de transcritos en hígados de ratones sometidos a una HFD, evidenciando pérdida de oscilación en un grupo de genes en los hígados de los animales alimentados con una HFD. También se observa el efecto opuesto, es decir, que transcritos que oscilan únicamente en una HFD no muestran oscilaciones cuando se les alimenta con una dieta control, por lo que la dieta es capaz de generar una reprogramación del transcriptoma circadiano (Figura 9).

Se ha propuesto que la pérdida de oscilación de genes puede ocasionarse por la falta de reclutamiento de CLOCK/BMAL1 hacia sus blancos, acompañado de un decremento en los niveles de la marca H3K4me3 en los promotores, lo que genera disminución de la oscilación en la transcripción. El mecanismo propuesto que atribuye la ganancia *de novo* de oscilación de genes, está dado por la acumulación de PPAR γ , que es traslocado al núcleo de manera circadiana y permite el reclutamiento rítmico de la proteína a sus genes blancos [3].

La disponibilidad de metabolitos también es un regulador del epigenoma, ya que estos funcionan como cofactores de enzimas modificadoras de la cromatina. Se han estudiado los efectos globales en los niveles de acetilación en ratones alimentados con una HFD y se encontró que los niveles de acetil-coA y de acetilación se da de manera tejido-específica,

siendo WAT un tejido con altos niveles de ambos, mientras que en hígado y páncreas este fenómeno no se observa [112].

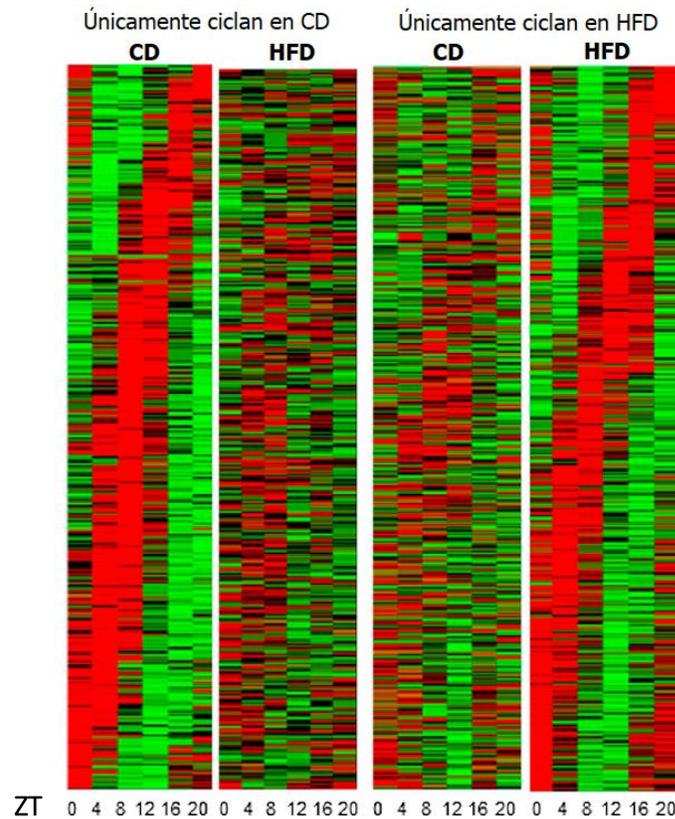


Figura 9: Reprogramación de la transcripción en un paradigma de DIO. Heat-maps que muestran los cambios en la oscilación de transcritos expresados en hígados de ratón alimentados con una CD y una HFD en diferentes ZTs. Los transcritos que oscilan en condiciones de CD (panel 1), pierden oscilación cuando los animales son alimentados con HFD (panel 2), mientras que los transcritos que en una HFD oscilan (panel 4), al compararse con las condiciones de CD (panel 3), estos no se expresan rítmicamente. El color rojo indica un incremento en la expresión de los transcritos y el verde, disminución de la expresión en estos.

Imagen tomada de Eckel-Mahan, 2013 [5].

Por otro lado, la metilación de histonas también ha sido objeto de estudio para explicar el fenotipo de obesidad y, particularmente, se ha identificado a la demetilasa de histonas JHDM2a como un actor importante. Ratones JHDM2a $-/-$ presentan disminución en la capacidad de oxidar ácidos grasos, lo que ocasiona un incremento en los depósitos de grasa y adipocitos hipertróficos. Interesantemente, JHDM2a remueve la metilación en H3K9 en los promotores de *Adamts9*, implicado en el desarrollo de tejido adiposo, y de *ApoC1*, que actúa como inhibidor de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lo que favorece la

transcripción de estos genes y la aparición de obesidad [113]. También se ha reportado que el knockdown de JHDM2a incrementa los niveles de H3K9me2 en la región enhancer de *Ppara* y en el elemento de respuesta a PPAR (REPP) del gen *Ucp1*, ambos implicado en el metabolismo energético, lo que incrementa también su transcripción e induce la aparición de obesidad [114].

En un estudio de microarreglos realizado en hígados de ratones alimentados con una HFD, aparece una ganancia de oscilación del RNAm de la metiltransferasa G9A, por lo que no se descarta la participación que puedan tener las metiltransferasas en general y G9A en particular, en la regulación del epigenoma circadiano de un modelo de obesidad [115]. Sin embargo no se cuentan con evidencias concluyentes sobre esta posibilidad, por lo que más estudios son necesarios para corroborar la ganancia de oscilación de G9A en hígado de ratones obesos, y sus posibles efectos en el fenotipo de la obesidad inducida por la dieta.

4. Justificación

Marcas activadoras y represoras de la transcripción aparecen de manera rítmica en los GCC, para dirigir la expresión de genes en ciclos de 24 horas. Numerosos estudios en hígado de ratón demuestran que la H3K9ac, H3K27ac, así como la H3K4me3 y la H3K27me2/me3 oscilan de manera circadiana en GCC en condiciones de alimentación normocalóricas. Además, es vital el mantenimiento de las KMTs que efectúan estas marcas para mantener la expresión cíclica de sus genes blancos. De especial interés es la marca H3K9me2, que se ha reportado actúa de manera *loci*-específica para regular la expresión de genes implicados en metabolismo.

El efecto transcripcional que resulta del enriquecimiento de dicha marca aún no ha sido explorado en un modelo de obesidad inducido por la dieta. Además, existe alguna evidencia que demuestra que la KMT que genera esta marca, G9A, presenta cambios a nivel transcripcional en hígados de ratones alimentados con dieta rica en grasas. En este escenario, diferentes KMTs podrían actuar de manera *loci*-específica en genes metabólicos que regulan la aparición de obesidad.

Por todo lo anterior, es importante evaluar si cambios en los niveles transcripcionales y proteicos, así como la función de las KMTs bajo condiciones de alimentación normocalórica y obesogénica, determinan la expresión diferencial de genes que se transcriben rítmicamente y que están implicados en el control metabólico en hígado de ratón.

5. Hipótesis

El perfil de expresión y de actividad circadiana de las metiltransferasas de histonas expresadas en hígado se modificará bajo un esquema de dieta rica en grasas. Estos cambios podrían regular la expresión *loci*-específica de los blancos de las metiltransferasas de histonas estudiadas.

6. Objetivos

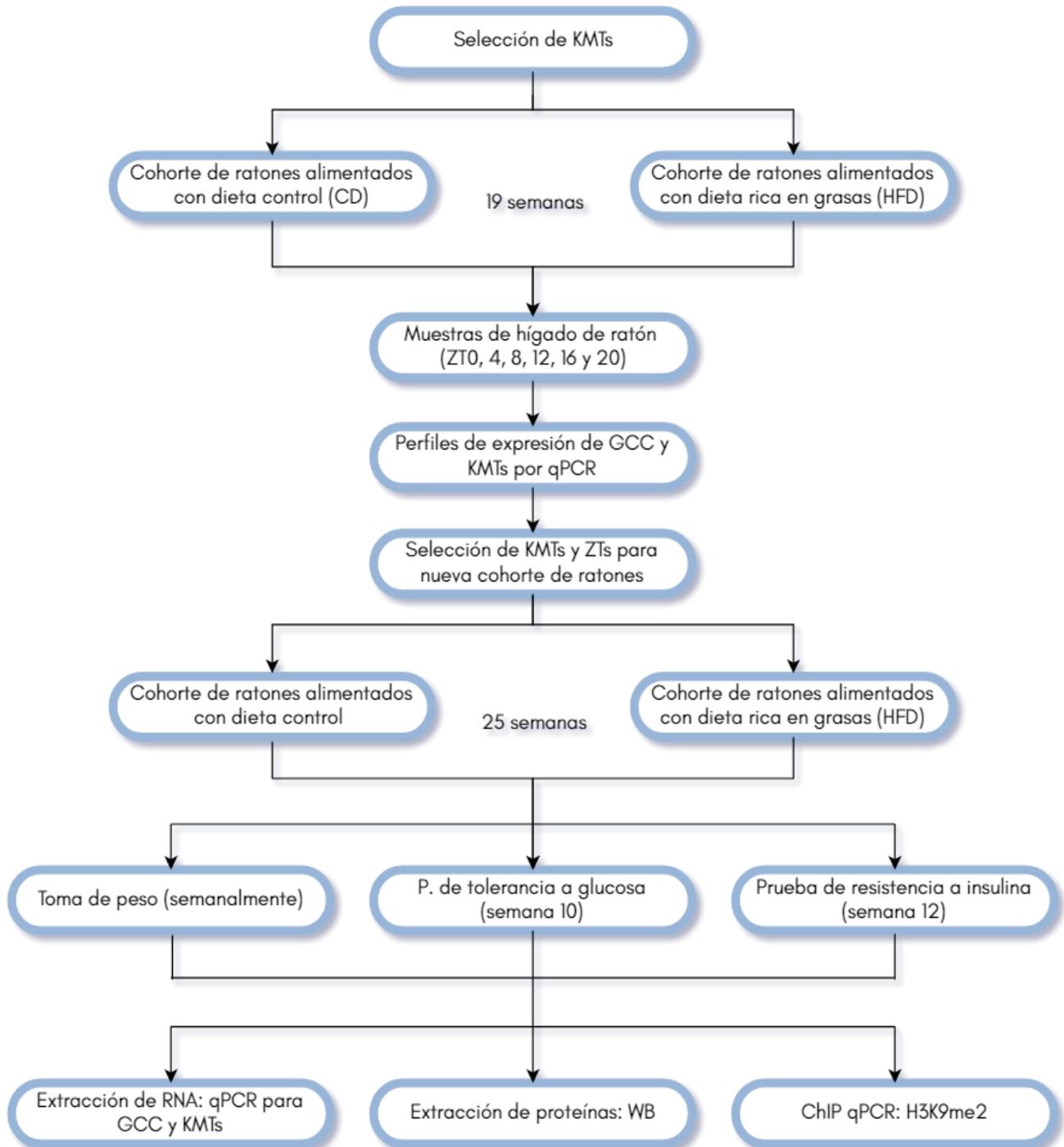
6.1 Objetivo general

Evaluar la expresión y la actividad circadiana de las metiltransferasas de histonas de lisina en hígados de ratones sanos y obesos para determinar si están alteradas y definir efectores epigenéticos que participan en el fenotipo de DIO.

6.2 Objetivos particulares

- ✓ Realizar un análisis *in silico* para determinar las metiltransferasas que se evaluarán en el proyecto.
- ✓ Implementar un modelo control y uno de obesidad *in vivo* en ratones.
- ✓ Determinar qué metiltransferasas de histonas presentan expresión rítmica durante el ciclo circadiano en condiciones normales y de obesidad.
- ✓ Evaluar si las metiltransferasas diferencialmente reguladas en condiciones normales y de obesidad tienen un papel en los cambios epigenéticos que se observan en el hígado de ratones obesos.

7. Metodología



7.1 Selección *in silico* de metiltransferasas de histonas: criterios de inclusión y exclusión

Para tener un panel de KMTs de estudio, se establecieron criterios de inclusión y exclusión.

Se establecieron como criterios de inclusión:

- a) Oscilación circadiana reportada en la base de datos CircadiOmics [116, 117]: Se analizaron los datos obtenidos de microarreglos de ratones C57BL/6J alimentados con dieta control y HFD [3] que se visualizaron en la base de datos CircadiOmics ajustado los datos al análisis con el programa JTK_CYCLE[118]. La tablas obtenidas de CircadiOmics, indican diferentes parámetros que permiten conocer la ganancia o pérdida de oscilación entre el grupo control y HFD. Los parámetros analizados incluyen:
 - ✓ P value: Valor de p ajustado según lo informado por JTK_CYCLE: Para determinar si una metiltransferasa presenta oscilaciones circadianas, se tomó en cuenta el valor p , que debe ser menor a 0.05 [116, 117].
 - ✓ Periodo: Se tomaron en cuenta las KMTs que tuviera un periodo de entre 20 y 28 horas.
 - ✓ La acrofase no fue limitada para el estudio, por lo que no se consideró parámetro de inclusión.
- b) Antecedentes sobre implicación en procesos metabólicos y circadianos: Se revisó la bibliografía existente que relacionara a las KMTs en procesos como adipogénesis, metabolismo de lípidos, obesidad y diabetes, o que presentara antecedentes bibliográficos que las implican en la regulación de los ritmos circadianos.

Como parte de los criterios de excusión se definieron los siguientes parámetros:

- a) Se descartaron metiltranferasas con nula expresión en hígado. Se consultó la expresión reportada en datos obtenidos de RNA-seq de hígado de ratones de 8 semanas C57BL/6 obtenidos del consorcio ENCODE [1], con el número de referencia GSE78583 (Tabla S1). Además se descartaron las KMTs que presentaran una

expresión menor a 100 unidades relativas en los resultados de microarreglos obtenidos por Eckel-Mahan y col. [3] (Tabla S2). Se debe tener en cuenta que 100 unidades relativas se observan para genes que no se expresan en el tejido analizado de manera robusta o que son específicos de otros tejidos.

- b) Se descartaron KMTs que no hubieran sido implicadas anteriormente en el control de los ritmos circadianos o en metabolismo de lípidos, adipogénesis, obesidad o diabetes; a excepción de un control negativo seleccionado en este estudio.

7.2 Inducción de obesidad en modelo biológico

Se utilizaron 21 ratones machos de la cepa C57BL/6J, que se separaron en 2 cohortes de 11 y 10 individuos cada uno, ambas cohortes fueron sometidas a un ciclo de luz/obscuridad (12/12 horas) a temperatura constante de 24°C, con humedad al 44%. El ZT0 se estableció a la hora del encendido de las luces, que corresponde a las 7 am. A partir de las 4 semanas de edad, una cohorte se alimentó *ad libitum* con una dieta rica en grasas (HFD) donde las grasas corresponden al 29% del peso total del alimento y 53.5 kcal/g se obtienen de las grasas (TD. 160547 Teklad Custom Diet) por 25 semanas (Tabla S3). Paralelamente una cohorte control se alimentó *ad libitum* con una dieta normocalórica en la que las grasas corresponden al 6.2% del peso total del alimento (TD 20185 Teklad global 18% protein rodent diet) durante 25 semanas (Tabla S3). Semanalmente se tomó el peso de cada individuo y se midió el consumo de alimento. Los ratones de 29 semanas se sacrificaron a los ZT8 y ZT20 y se extrajeron los hígados, que fueron preservados a -80°C hasta su uso. Se siguieron los lineamientos establecidos por el CICUAL del Instituto de Investigaciones Biomédicas, con los procedimientos aprobados por este comité para el proyecto ID240.

7.3 Prueba de tolerancia a la glucosa e insulina

Se establecieron los ZT3 y ZT15 para ambas pruebas. Para la prueba de tolerancia a la glucosa, a las 10 semanas de dieta se separaron en lotes aleatorios a los ratones y se mantuvieron en ayuno de 12 horas. Posteriormente, se realizó la medición de glucosa basal al ZT correspondiente y se administró una solución de glucosa de concentración 2 g/kg

intraperitonealmente. A los 15, 30, 60 y 120 minutos después de la inyección, se realizó la medición de los niveles en sangre de glucosa (Accu-chek Active, 06658008001). Para la prueba de tolerancia a insulina a las 12 semanas de dieta, los ratones se separaron en los mismos lotes que para la prueba de glucosa, se mantuvieron en ayuno durante 5 horas previas al experimento, y en el ZT correspondiente se realizó la medición basal de glucosa. Posteriormente, se inyectó una solución de insulina de acción rápida al 0.6 UI/kg (Humulin Regular, HI-210) y se hizo la medición de los niveles en sangre de glucosa bajo el mismo esquema temporal que la prueba de glucosa.

7.4 Extracción de RNA

Se siguió el protocolo de extracción empleando el reactivo TRIzol® (Ambion). Para cada hígado de ratón, en un microtubo de 2 mL, se homogenizó el tejido con 600 μ l de TRIzol en el homogeneizador Kinemática CH-6010 en el nivel 3. Posteriormente, se añadieron 120 μ l de cloroformo a cada tubo y se agitaron vigorosamente durante 15 segundos, y las muestras se incubaron por 3 minutos a temperatura ambiente (TA). Transcurrido el tiempo, las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 12 000 g y a 4°C. Se separó la fase acuosa de cada muestra y se transfirió a un nuevo tubo de microcentrífuga. Para el aislamiento de RNA, lavado y resuspensión, se agregaron 300 μ l de isopropanol y se agitaron suavemente, posteriormente se incubaron 10 minutos a 4°C y se centrifugaron 10 minutos a 12 000 g y 4°C. Se desechó el sobrenadante por decantación y el pellet se resuspendió en 600 μ l de etanol al 75%. Las muestras se agitaron brevemente y se centrifugaron durante 5 minutos a 7500 g y a 4°C. El sobrenadante obtenido fue desechado por decantación y las muestras se dejaron secar al aire por aproximadamente 20 minutos. Finalmente el pellet fue resuspendido en 20 o 50 μ l de agua libre de RNasa, (de acuerdo al tamaño de pellet obtenido) y se guardaron a 4°C toda la noche para permitir la resuspensión completa. Se almacenaron a -20°C para su cuantificación en NanoDrop y para su uso posterior se resguardan a -80°C.

7.5 Síntesis de DNA complementario

Se empleó la técnica de RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) para sintetizar DNAC a partir del RNA obtenido. Para las muestras de tejido de ratón se empleó el kit iScript™ cDNA Synthesis (#1708891, Bio-Rad). Se realizó una mix por muestra que contiene 5x iScript Mix y iScript Reverse Transcriptase, además del volumen de cada muestra de RNA a la concentración de 0.1 µg/µl. Se obtuvo un volumen final por muestra de 10 µl que se llevaron al termociclador para el protocolo de reacción siguiendo el programa: 25°C por 5 minutos, 46°C por 20 minutos para la retrotranscripción, un minuto a 95°C para la inactivación de la enzima y finalmente se reservaron a -20°C hasta su uso.

7.6 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo (qPCR)

Se realizó la amplificación de los fragmentos de los genes de interés utilizando el iTaq™ Universal SYBR®Green One-Step kit (#172-5150, Bio-Rad). Se realizó una mix de reacción que contiene iTaq™ Universal SYBR®Green reaction mix, primers forward y reverse para cada gen de interés (concentración 10µM), cDNA y agua libre de nucleasas. Los parámetros de ciclado fueron: Desnaturalización inicial 94°C por 2 minutos, ciclos: desnaturalización 94°C por 15 segundos, alineación y elongación 60°C por un minuto y se realizaron 35 ciclos. Como control interno o gen constitutivo, se utilizó el gen BM2. En la Tabla S4 se incluyen las secuencias para los primers usados para las muestras de hígados de ratón. El análisis de los datos se realizó con el cálculo de $-\Delta\Delta CT$ [119].

7.7 Análisis de oscilaciones circadianas

Para determinar si existen oscilaciones circadianas para cada transcrito se realizó un análisis con el software CircWave v1.4 en donde los datos normalizados obtenidos de qPCR, se ajustan a la transformada de Fourier suponiendo que las oscilaciones se conforman de una o varias ondas sinusoidales y presentan generalmente distribución normal que es independiente de la magnitud de medición [120]. Es decir, que la expresión de genes que no sea circadiana aparece como una línea recta y su valor estadístico es mayor a 0.05, a

diferencia de los datos que indiquen ritmicidad, cuya gráfica se representa como oscilaciones y el valor calculado de p es menor a 0.05

7.8 Extracción de proteínas

Se realizó la extracción de proteínas de células con el buffer de lisis RIPA. Se preparó una solución que contenga inhibidores de proteasas (IP) cOmplete de Sigma en relación 1:25 y buffer RIPA (Tris-HCl 50 mM pH8, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM pH8, NP-40 1%, deoxicolato de sodio al 0.5%, SDS al 0.1%). Se pesaron 30 mg de hígado que fueron homogenizados en 800 μ l de la solución RIPA+IP, el homogenado se incubó durante 20 minutos a 4° C vortexeando cada 5 minutos cada muestra. Posteriormente se centrifugaron a 13 000 RPM durante 20 minutos, se recuperó el sobrenadante y se centrifugó en las mismas condiciones 2 veces más. Las proteínas totales que se guardaron a -80°C hasta su uso.

7.9 Cuantificación de proteínas

Las proteínas totales fueron cuantificadas mediante el método de Bradford. Para ello se realizó una curva de diluciones seriadas partiendo de una concentración de 200 μ g/ μ l de albúmina sérica bovina (BSA) como se muestra en la tabla 2, y se realizaron duplicados para cada punto.

Posteriormente en una placa de 96 pozos se colocaron 200 μ l de reactivo de Bradford y se adicionó 1 μ l de cada concentración de la curva por duplicado, seguido de 1 μ l de cada muestra. Se incubaron en obscuridad por 10 minutos y se leyeron a 595 nm en lector de placas (BioTek, Synergy H1 microplate reader). Para cada muestra de hígado se calculó el volumen necesario para obtener un stock de 2 μ g/ μ l de proteína que contuviera además DTT y buffer de carga 6X, y en caso de ser necesario para obtener el volumen deseado se añadió RIPA+IP.

Tabla 2: Preparación de curva estándar para cuantificación de proteínas				
Tubo	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Vol. del stock (μl)	Vol. de dilución RIPA (μl)	Vol. final
1	6.4	1.28 BSA 200 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	38.72	40
2	3.2	20 μl de tubo 1	20	40
3	1.6	20 μl de tubo 2	20	40
4	0.8	20 μl de tubo 3	20	40
5	0.4	20 μl de tubo 4	20	40
6	0	0	20	20

7.10 Western blot

Las proteínas se desnaturalizaron mediante calentamiento a 95°C durante 5 minutos en buffer Laemmli (SDS al 4%, glicerol al 20%, Tris-HCl 1M pH8 120 mM, azul de bromofenol al 0.02%). Se prepararon geles desnaturalizantes de acrilamida al 8 % (para detectar G9A) y al 10% (para PPAR γ y NSD2) y geles concentradores al 4%. Se cargaron 40 μg de cada muestra así como el marcador de peso molecular PAGE Ruler (Thermo Scientific, 26619). Se corrió a voltaje constante de 100V durante 2 horas con buffer de corrida (Tris base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%). Se realizó la transferencia a una membrana de PVDF con buffer de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%) a 300 mA por 3 horas en frío (para G9A y PPAR γ) y durante toda la noche a 40V (para NSD2), posteriormente la membrana se bloqueó con buffer de bloqueo (TBS 1X-Tween 0.5% + leche deshidratada sin grasa 5%) durante 1 hora. Las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario anti-G9A dilución 1:1000 (Abcam, AB185050), anti-PPAR γ (Cell Signaling, 81B8) dilución 1:1000 más TBS-Tween y BSA 5% y anti-NSD2 (Active Motif, 39880) dilución 1:2000 TBS-Tween 0.1% + leche 5%, como control de carga se emplearon los anticuerpos anti-p84 dilución 1:1000 (GenTex, GTX70220) y anti-GAPDH dilución 1:20000 (GeneTex, GTX627408-01). Se lavaron las membranas con TBS-Tween 0.5% para eliminar el exceso de anticuerpo, y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con los

anticuerpos secundarios anti-conejo-HRP (65-6120, Invitrogen dilución 1:8000- 1:10 000) y anti-ratón-HRP (Sigma, A9044, dilución 1:80 000). Se realizaron lavados para eliminar el exceso de anticuerpo y finalmente se reveló la membrana por quimioluminiscencia con el kit Chemiluminiscent HRP substrate (Millipore, WBKL50100), en el fotodocumentador Kodak, Gel Logic 1500. Las imágenes se procesaron con el software Kodak Molecular Imaging. Las densitometrías se obtuvieron con el software ImageJ 1.52a.

7.11 Diseño de primers para ChIP

Los primers para ChIP se diseñaron con el programa MP Primer3 y Primer Blast. Se corroboró la eficiencia *in silico* de los primers diseñados con la herramienta BioAnalyzer de IDT. La secuencia de los primers para Ppar γ 2 se tomaron de Wang, et al [85]. Las secuencias y las regiones de los primers diseñados se encuentran en la TablaS4.

7.12 Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Se realizó la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina a partir de muestras de hígado de ratones sanos y obesos. Se pesaron 30 mg de tejido y se cortó en piezas pequeñas que fueron resuspendidas en 5 ml de PBS 1X a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó el entrecruzamiento añadiendo formaldehído a concentración final 1%, que se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y en rotación. La reacción de entrecruzamiento se detuvo adicionando glicina (concentración final de 0.125 M) que fue incubada 5 minutos en agitación a 4°C.

Las muestras se centrifugaron a 1000 RPM durante 10 minutos a 4°C y el pellet recuperado se resuspendió en 2 ml de PBS 1X+IP para disgregarse con el homogenizador Dounce. Los homogenados se centrifugaron 10 minutos a 1000 *g* a 4°C y a los pellets se le realizó un lavado con 1 ml de PBS 1X + IP, posteriormente las muestras se centrifugaron 10 minutos a

1000 *g* a 4°C y los pellets recuperados se resuspendieron en buffer de lisis (1% SDS, 50mM TrisHCl pH 8, 10 mM EDTA, 1mM PMSF, 1X IP) y se incubaron durante 10 minutos a 4°C. Se tomaron 300 μ l de cromatina de cada muestra y se sonicaron en equipo Bioruptor®Pico (Diagenode) durante 15 ciclos (30 segundos encendido/30 segundos apagado) a 4°C. Las muestras se centrifugaron a 13 500 *g* para eliminar la fracción insoluble. Se tomaron alícuotas de 10 μ l de las muestras para realizar extracción de DNA por fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1), a la fase recuperada, se le añadieron 1 μ l de glucógeno, 20 μ l de acetato de sodio 3M, y 440 μ l de etanol 100% y se precipitaron toda la noche a -80°C, las muestras se centrifugaron 25 minutos, 4°C a 16 000 G, se desechó el sobrenadante y el pellet seco se disolvió en 20 μ l de agua grado biología molecular.

El DNA purificado se corrió un gel de agarosa al 2% para el tamaño de los fragmentos obtenidos, que debe ser de entre 100 a 500 pb (Figura S1). La fracción sonicada se llevó a una dilución 1:10 con buffer de dilución (1%TritónX-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris HCl pH8, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1X IP) y se separaron en Input (10% de la cromatina sonicada por muestra) e inmunoprecipitados (IP). A los IPs se les añadieron 50 μ l de perlas de agarosa (Protein G-PLUS-Agarose sc-2002, Santa Cruz) y 3 μ g de anticuerpo anti H3K9me2 (ABCAM, ab1220), y 3 μ g de anticuerpo anti-IgG (18765, Sigma).

Las muestras se incubaron toda la noche en rotación a 4°C. Se realizaron 3 lavados con buffers cuya concentración de sales incrementaba progresivamente. Cada lavado fue de 10 minutos a 4°C y en rotación. El primer lavado se realizó con el buffer de lavado 1 (20 mM Tris HCl pH8, 0.1% SDS, 1% Tritón X-100, 150 mM NaCl y 2 mM EDTA), las muestras se centrifugaron a 1500 *g* por 5 minutos a 4°C. La fracción con perlas recuperada se lavó con buffer de lavado 2 (20 mM Tris HCl pH8, 0.1% SDS, 1% Tritón X-100, 500 mM NaCl y 2 mM EDTA), finalmente se dio un lavado con buffer de lavado 3 (10 mM TrisHCl pH8, 250 mM LiCl, 1% NP-40, 1% deoxicolato de sodio).

Para eluir la cromatina de las perlas, estas se resuspendieron en buffer de elución (10 mM Tris HCl pH8, 0.5% SDS, 300 mM NaCl, 5mM EDTA y 0.05mg/ml proteinasa K). Las muestras se incubaron toda la noche a 65°C para revertir el entrecruzamiento y se añadieron 10 µg de RNasa A que se incubaron 30 minutos a 37°C. Se centrifugaron a 10 000 *g* por 1 minuto y al sobrenadante recuperado se le realizó extracción con fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1), a la fase recuperada se le añadieron 2 µl de glucógeno, 40 µl de acetato de sodio 3M, y 1 ml de etanol 100% y se precipitaron toda la noche a -80°C, las muestras se centrifugaron 30 minutos, 4°C a 16 000 G, se desechó el sobrenadante y el pellet se lavó con 1 ml de etanol 75%, posteriormente las muestras se centrifugaron 10 minutos, 4°C y a 16 000 *g*, descartando el sobrenadante. Los pellets secos se resuspendieron en 40 µl de agua grado biología molecular.

7.13 Estadística

Para los análisis estadísticos se empleó el programa GraphPad Prism 7.00. De 2 a 6 réplicas biológicas fueron usadas para los experimentos. Los datos obtenidos para las pruebas con mayor resolución temporal (ZT0, ZT4, ZT8, ZT12, ZT16 y ZT20), así como el seguimiento de peso y las pruebas de GTT e ITT fueron analizados con ANOVA de dos vías y se empleó el post-test de Bonferroni. Las pruebas realizadas en los ZT8 y ZT20 fueron analizadas con ANOVA de una vía. Los resultados del área bajo la curva (AUC) se analizaron con la prueba t-Student. Todos los datos graficados representan el promedio ± el error estándar (SEM) y corresponden a un mínimo de 1 experimento.

8. Resultados

El proyecto se planteó usando como modelo de estudio un cultivo primario de hepatocitos de ratón alimentados con una CD o HFD con el fin de comparar si los resultados reportados obtenidos *in vivo*, podrían reproducirse *in vitro*, y con ello ganar información acerca de los mecanismos epigenéticos que regulan la transcripción de genes metabólicos que participan en la DIO.

Los resultados obtenidos de la aproximación abordada se muestran en la Figura S2. En el panel a se muestran fotografías representativas de los cultivos obtenidos donde se aprecia una morfología característica de estas células. El panel b y c muestran el rendimiento y viabilidad obtenidos en los diferentes ensayos realizados, y en ellos se observa un incremento en el número de células obtenidas por hígado perfundido (Figura S2b) pero variabilidad en la viabilidad (Figura S2c). Lo recomendado para este tipo de cultivo, es tener un rendimiento de 40 millones de células por hígado, así como una viabilidad celular mayor al 80% para considerar el procedimiento exitoso [121].

Adicionalmente, los hepatocitos se sincronizaron con dexametasona a los tiempos 0, 16, 22, 28, 34, 40 y 46. La Figura S1d muestra el perfil de expresión de *Bmal1* y *Dbp* en hepatocitos de un control alimentado con dieta control *ad-libitum* obtenido por duplicado. La figura S2e muestra un incremento en la resolución temporal adicionando el CT46 e incrementando las réplicas técnicas a 3. A partir de la información obtenida en estos ensayos, por el momento se descartó el uso de hepatocitos primarios como modelo de estudio, ya que no se logró obtener un rendimiento, así como viabilidad óptima para la realización de los experimentos, lo que se reflejó en la dificultad para sincronizar a los hepatocitos. En este escenario, decidimos emplear hígados de ratones alimentados con los distintos tipos de dieta CD y HFD.

8.1 Selección *in silico* de las KMTs a evaluar

A partir de los parámetros de inclusión y exclusión establecidos en la metodología, se determinó que las metiltransferasas cuya expresión transcripcional gana oscilación circadiana en hígados de ratones alimentados con dieta obesogénica según datos de microarreglos publicados [3] son: *Ehmt2* (Tabla S2A), *Smyd3* y *Nsd2* (Tabla S2C). En particular, el perfil de expresión de *G9a* (Tabla S1A) muestra abundancia de transcrito. Además, existen reportes que relacionan el papel de esta KMT en procesos metabólicos [85-88], lo que indica que puede participar como un efector epigenético en obesidad. El análisis de expresión de *Nsd2* muestra su presencia en hígado (Tabla S1C). Sus antecedentes también la involucran en regulación del metabolismo [95-97], por lo que es un buen blanco de estudio. Se descartó *Smyd3* porque no existen antecedentes que la involucren en metabolismo de lípidos o que tenga actividad circadiana y por su baja expresión en hígado (Tabla S1C).

Las metiltransferasas que pierden oscilación en situación de obesidad según los datos de microarreglos obtenidos de hígados de animales sanos y obesos son *Setdb2* (Tabla S2A), *Setd1b* (Tabla S2B), *Dot1l* (Tabla S2D), *Suv420h1* y *Suv420h2* (Tabla S2E). En los datos obtenidos de RNA-seq existe expresión de *Suv420h2* (Tabla S1E) en hígado de ratón. Como se mencionó, esta KMT tiene antecedentes que la involucran en procesos metabólicos [99], por lo que podría actuar como un efector epigenético de la obesidad inducida por la dieta. Al analizar los datos de RNA-seq se observa abundancia del transcrito de *Setdb2* en hígado (Tabla S1A), y además esta KMT presenta antecedentes en regulación del metabolismo lipídico [90] por lo que podría estar involucrado en el desarrollo de obesidad. *Setd1b* (Tabla S1B) y *Dot1l* (Tabla S1D) se descartaron por la poca expresión que tienen en hígado y la falta de reportes que las involucren en procesos metabólicos de lípidos. *Suv420h1* se descartó por no presentar antecedentes que la implicasen en el control del metabolismo de lípidos o en la regulación de ritmos circadianos.

Se añadieron las metiltransferasas *Suv39h1*, *Ezh2* y *Mll1* debido a sus antecedentes que las involucran en la regulación de ritmos circadianos, y la metiltransferasa *Smyd2* como control

negativo ya que no presenta oscilación, además de no participar en la regulación de los ritmos circadianos ni procesos metabólicos. En particular, *Suv39h1* no presenta perfil de transcripción cíclico según datos de microarreglos publicados (Tabla S2A), sin embargo participa en la regulación de procesos metabólicos y circadianos [83], por lo que no se descarta que pueda funcionar como efector epigenético durante la DIO. En el caso de *Mll1*, su perfil de transcripción no presenta ritmicidad circadiana según estudios previos (Tabla S2B), pero se ha reportado su participación en la regulación de transcripción rítmica [71, 91], lo que sugiere que podría participar como efector epigenético en nuestro modelo de obesidad. Por otra parte, *Ezh2* muestra bajos niveles de transcripción en hígado (Tabla S1F), y pese a no presentar tampoco expresión rítmica detectable (Tabla S2F), se añadió al estudio porque está involucrada en el control de ciertos procesos metabólicos y en el mantenimiento de oscilación de genes circadianos [100, 101]. Finalmente, *Smyd2* se incluyó en este estudio como control negativo, ya que no se ha reportado en metabolismo de lípidos [92] ni presenta oscilación circadiana (Tabla S2C) aunque sí se expresa en hígado (Tabla S1C).

A continuación se muestra una tabla que resume las funciones a las que se asociaron las KMTs elegidas en el proyecto:

Tabla 3: Resumen de funciones de las KMTs elegidas en el estudio					
KMT	Marca	Función	Oscilación circadiana		Referencia
			CD	HFD	
Suv39h1	H3K9me3	Adipogénesis, regulación de expresión rítmica de genes	No	No	[82, 83]
G9a	H3K9me2	Adipogénesis, metabolismo lipídico y de ácidos biliares	No	Sí	[82, 85-88]

Setdb2	H3K9me3	Metabolismo de lípidos	Sí	No	[90]
Mll1	H3K4me3	Regulación de la expresión rítmica de genes	No	No	[71, 91]
Smyd2	H3K36me2	Ciclo celular, cáncer	No	No	[92]
Nsd2	H3K36me2	Diabetes, adipogénesis	No	Sí	[96, 97]
Suv420h2	H4K20me3	Adipogénesis	Sí	No	[99]
Ezh2	H3K27me2/me3	Adipogénesis, regulación de la expresión rítmica de genes	No	No	[100, 101]

8.2 La alimentación con dieta rica en grasas induce cambios en la expresión génica y ganancia de oscilación circadiana en la transcripción de las metiltransferasas G9a y Nsd2.

Con el objetivo de evaluar la sincronización de los ratones, e identificar posibles KMTs con expresión transcripcional rítmica, se evaluó la expresión transcripcional de GCC y KMTs en muestras de hígado de ratones normales y obesos sacrificados a los ZT0, 4, 8, 12, 16 y 20 (estas muestras estaban disponibles en el laboratorio). Se obtuvieron los perfiles de expresión de genes del reloj *Bmal1*, *Per2* y *Nr1d1* (Figura 10a) y las KMTs previamente seleccionadas: *G9a*, *Nsd2* (Figura 10b), *Suv420h2*, *Setdb2* (Figura 10c), y *Ezh2*, *Mll1*, *Suv39h1* y *Smyd2* (Figura 10d). Los resultados demuestran un cambio de fase en la expresión de los genes reloj cuando se comparan los perfiles de expresión entre las dos dietas (Figura 10a). Este cambio es particularmente evidente para el gen *Bmal1*, donde se observa avance en su fase de expresión de alrededor de cuatro horas en los hígados provenientes de animales alimentados con dieta obesogénica respecto de los controles. Para el gen *Nr1d1*, se observa algo similar, con un avance de fase que mueve la acrofase cuatro horas, hasta ZT4 en los hígados de ratones alimentados con dieta rica en grasas, además de una disminución significativa en la amplitud de su expresión. En el análisis de

expresión de *Per2*, se observa disminución en la amplitud de su expresión en hígados de los ratones obesos respecto de sus correspondientes controles, así como el avance en la fase expresión similar al observado para los otros dos genes reloj. Estos datos coinciden con lo reportado en la literatura, ya que la dieta rica en grasas puede reorganizar el reloj hepático generando cambios en la expresión de los genes reloj similares a los observados en nuestro análisis [122, 123]. Por tanto, podemos considerar que los ratones utilizados en este estudio estuvieron correctamente sincronizados y además mostraron los efectos de la reorganización del reloj hepático inducida por una dieta rica en grasas.

Posteriormente, se analizaron los patrones de expresión diurna de la metiltransferasas de lisina previamente seleccionadas para nuestro estudio (Figura 10 b-d). Interesantemente, observamos que la expresión de *G9a* (Figura 10b) tiene un perfil similar en ambas condiciones, que es ligeramente diferencial en el periodo nocturno, aunque no alcanza la significancia estadística en el ZT20 al compararla con los animales control. El gen *Nsd2* (Figura 10b) presentó un incremento en la amplitud en los hígados de los animales obesos. Para el gen *Suv420h2*, se observó un incremento en su expresión en condiciones de dieta rica en grasa, que también fue detectado para el gen, *Setdb2* (Figura 10c). El perfil de expresión de *Ezh2* (Figura 10d) también mostró un incremento en los hígados de los animales obesos, particularmente evidente del ZT4 al ZT20. Los análisis de expresión para los genes *Mll1* y *Suv39h1* (Figura 10d) no mostraron cambios muy drásticos en las condiciones analizadas. Finalmente, el gen *Smyd2* (Figura 10d) presentó algunas variaciones en su expresión que sólo resultaron ser significativas al ZT8.

Con el fin de detectar patrones de oscilación circadianos en la expresión de los genes analizados por RT-qPCR, se utilizó el programa estadístico CircWave, que busca patrones oscilatorios en una serie de datos, y cuyo análisis se detalla en la metodología. Los resultados de este análisis estadístico se reportan en la Tabla 4, indicando en color rojo aquellos cuyo valor $p < 0.05$, por lo tanto se considera que oscilan de manera circadiana.

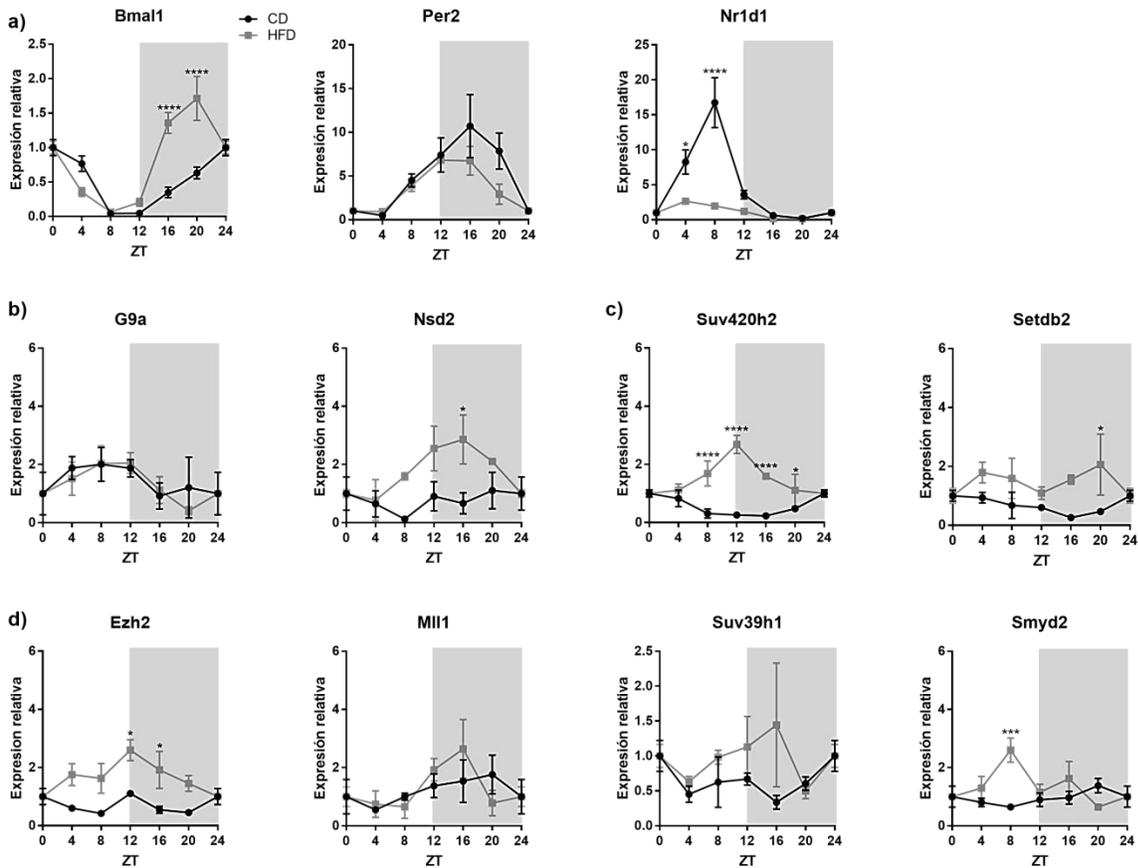


Figura 10: Perfiles de expresión en hígado de GCC y KMTs en condiciones de CD y HFD

a) Perfiles de expresión de genes del reloj (*Bmal1*) y GCC (*Per2* y *Nr1d1*) en hígados de ratones alimentados con dieta control (CD) y dieta rica en grasas (HFD) $n=3$, en los ZT establecidos. b) Perfiles de expresión de metiltransferasas de histonas (KMTs) que oscilan en ratones obesos, $n=3$. c) Perfiles de expresión de KMTs que oscilan en ratones alimentados dieta normocalórica, $n=3$. d) Expresión de KMTs que no presentan oscilación bajo condiciones CD o HFD, $n=3$. Todos los perfiles se normalizaron con la expresión de *B2m*. Los resultados son el promedio + SEM ($n=3$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$, con prueba de ANOVA de dos vías. El periodo diurno de los ratones se indica del ZT0 al ZT12, mientras que el periodo nocturno se denota en un recuadro gris, que va del ZT12 al ZT24.

Como se observa, en condiciones CD o HFD las oscilaciones en la expresión de *Bmal1*, *Per2* y *Nr1d1* se mantienen estadísticamente significativa ($p<0,05$); *Smyd2* no oscila en ninguna condición; las metiltransferasas que ganan ritmicidad en su expresión en las condiciones de alimentación con dieta rica en grasas son *G9a* y *Nsd2*, y las que la pierden en el mismo esquema son *Setdb2* y *Suv420h2*. Finalmente, los resultados de *Mll1*, *Suv39h1* y *Ezh2* muestran que su expresión no oscila en ninguna condición, por lo que de acuerdo a las evidencias obtenidas por microarreglos en hígados de ratón [1], los resultados que se obtuvieron en este modelo mediante la técnica de RT-PCR coinciden con lo reportado.

Tabla 4: Oscilación de GCC y KMTs en hígado de ratón		
	Valor p en CD	Valor p en HFD
Bmal1	0.0000015	0.0000007
Per2	0.0006718	0.0000429
Nr2d1	0.0000474	0.0000004
Smyd2	NeuN	NeuN
G9a	NeuN	0.0089
Nsd2	NeuN	0.0066
Setdb2	0.0442	NeuN
Suv420h2	0.0014	NeuN
Ezh2	NeuN	NeuN
Mll1	NeuN	NeuN
Suv39h1	NeuN	NeuN

Tabla 4: Oscilación de GCC y KMTs en hígado de ratón

La tabla muestra los valores estadísticos calculados por el programa CircWave, siendo $p < 0.05$ los que presentan oscilación circadiana, y los cuales se encuentran marcados con color rojo. NeuN = indefinido, patrón de expresión no oscilatorio.

8.3 La dieta rica en grasas genera cambios fisiológicos y metabólicos que inducen la aparición de obesidad

Con el fin de estudiar a nivel molecular el papel de las metiltransferasa seleccionadas para nuestro estudio en la reprogramación de la transcripción circadiana observada en hígados de ratones obesos, se decidió realizar los estudios siguientes acotando los análisis a dos ZT representativos: ZT8 (día) y ZT20 (noche). Además, se decidió aumentar el tiempo de exposición a la dieta obesogénica a 25 semanas, frente a las 19 semanas del experimento anterior, con el fin de maximizar los posibles efectos epigenéticos que este paradigma nutricional pueda tener en el hígado de ratón, incrementando así las posibilidades de identificar más robustamente los mecanismos que son el objeto de nuestro estudio.

El utilizar una nueva camada de ratones también nos permitirá replicar los resultados, comprobar que los datos obtenidos son consistentes a dos tiempos distintos de la longitud del paradigma de alimentación. Por tanto, se conformaron 2 cohortes en las que 11 ratones se alimentaron con una dieta control y 10 con una HFD.

A partir de la semana 8 y hasta la semana 25, hay un incremento significativo en el peso de los animales alimentados con una dieta rica en grasa respecto a los controles (Figura 11a). Al final del paradigma dietético, en los animales alimentados con dieta rica en grasas se obtuvo un incremento de peso del 27.12% respecto al control (Figura 11a, b).

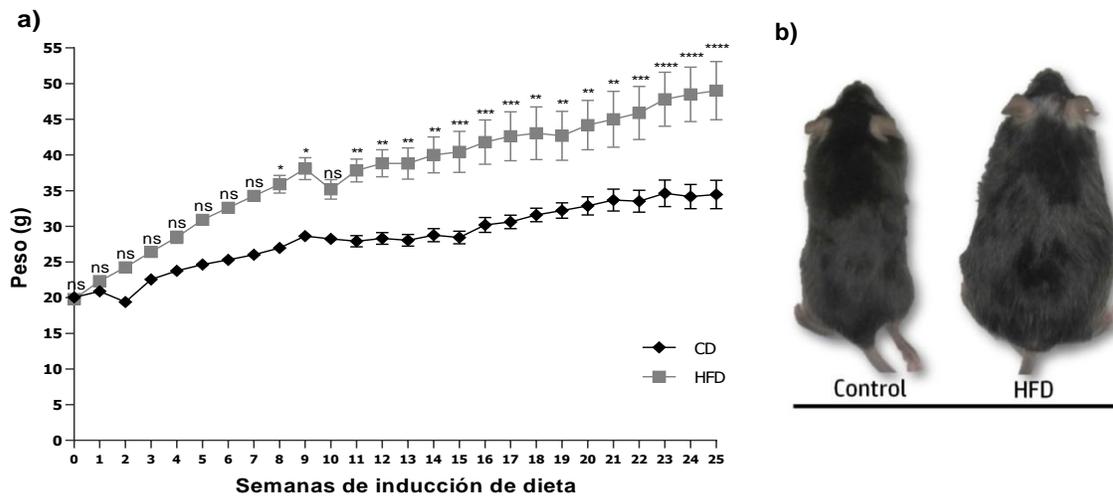


Figura 11: Seguimiento del peso de animales para generar un modelo de obesidad

a) Seguimiento semanal de peso de ratones control (CD) y ratones alimentados con una dieta rica en grasas (HFD). La gráfica representa el promedio + SEM (n=10 individuos por grupo), ns= no significativo, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, con prueba de ANOVA de dos vías.

b) Imagen representativa del incremento de peso de un individuo obeso comparado un control.

Para corroborar si existen cambios metabólicos en los ratones obesos, se realizaron las pruebas de tolerancia a la glucosa al ZT3 y ZT15 una semana antes de ser sacrificados (Figura 12). Los resultados obtenidos para ambos ZT muestran que los ratones alimentados con dieta rica en grasas no son capaces de regular el metabolismo de glucosa como los control, especialmente cuando la prueba se realiza en su periodo de descanso (ZT3, figura 12a y 12c). Los resultados también demuestran un incremento significativo en la concentración de glucosa en sangre en los animales alimentados con HFD comparados con los control (Figura 12).

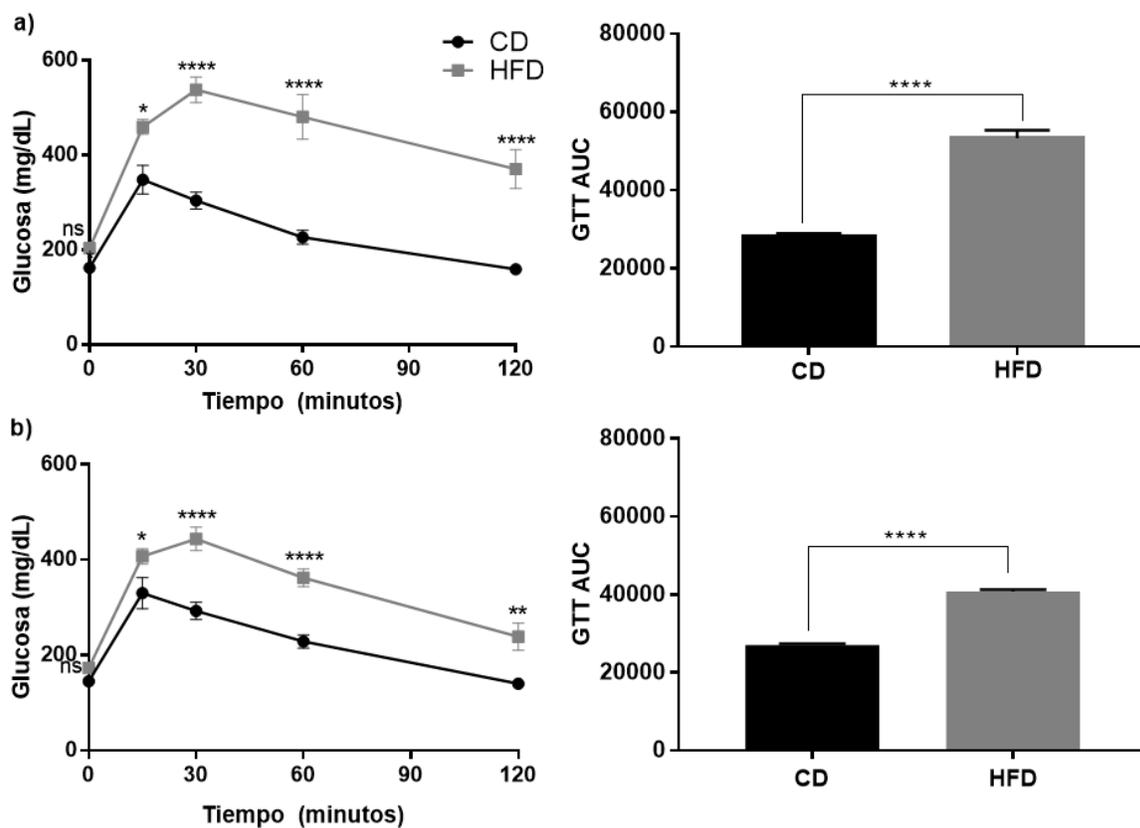


Figura 12: Cambios en la tolerancia a la glucosa de ratones alimentados con HFD como reflejo de la inducción de obesidad

Concentraciones de glucosa en plasma después de la inyección intraperitoneal de glucosa y área bajo la curva de glucosa en el ZT3 (a) y ZT15 (b).

Los resultados son el promedio + SEM (n=5). Para las curvas temporales: ns= no significativo, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, se realizó la prueba de ANOVA de dos vías. Para el área bajo la curva (AUC): ****p<0.0001, se realizó la prueba t-Student. GTT AUC = Área bajo la curva prueba de tolerancia a la glucosa

Además, para indagar si los animales obesos presentan resistencia a la insulina, se realizaron pruebas de resistencia a la insulina a ZT3 (Figura 13a) y ZT15 (Figura 13b). En ambos ZT, los niveles de glucosa se encuentran incrementados durante toda la prueba en los ratones alimentados con una HFD dado que han desarrollado resistencia a los efectos de la hormona inyectada.

El incremento de glucosa, así como la aparición de resistencia a la insulina, refleja la disregulación en el metabolismo de glucosa de los animales alimentados con una HFD. Este grupo presenta intolerancia a la glucosa, que es evidente a partir de los 15 minutos a los que se les inyecta glucosa. El incremento de glucosa tras la inyección de insulina,

indican la pérdida de sensibilidad al efecto biológico de esta hormona [50]. A partir de los resultados del control de peso y las pruebas de tolerancia a la glucosa e insulina se logró establecer un modelo de obesidad en ratones, así como cambios en el metabolismo de glucosa.

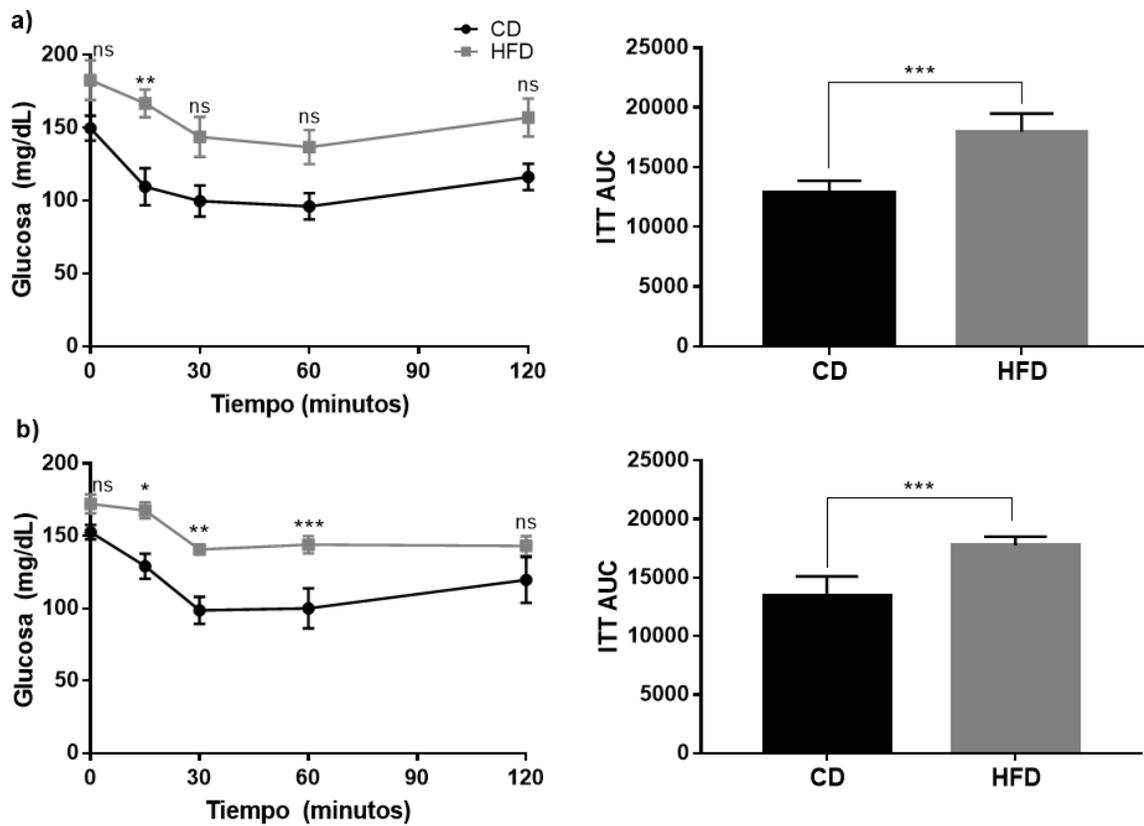


Figura 13: Cambios en la tolerancia a la insulina de ratones alimentados con HFD como reflejo de la inducción de obesidad

Concentraciones de glucosa en sangre después de la inyección intraperitoneal de insulina y área bajo la curva de glucosa en el ZT3 (a) y ZT15 (b).

Los resultados son el promedio + SEM (n=5). Para las curvas temporales: ns= no significativo, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, se realizó la prueba de ANOVA de dos vías. Para el área bajo la curva (AUC): ***p<0.001, se realizó la prueba t-Student.

8.4 La alimentación con dieta rica en grasas induce oscilación circadiana en la expresión proteica de la metiltransferasa G9a.

Una vez establecido el modelo de obesidad, se sacrificaron ratones a los ZT8 y ZT20 (n= 5-6 por ZT), y se midió la expresión de *Bmal1* y *Per2* para comprobar su sincronización (Figura 14). Como se observa, *Bmal1* se expresa diferencialmente en las condiciones CD y HFD, siendo el ZT8 donde existe una menor abundancia de transcrito. En el caso de *Per2*, también se observaron los cambios de expresión de acuerdo a lo esperado para esta resolución temporal y los ZT escogidos.

Concluimos que esta cohorte de ratones parece estar adecuadamente sincronizada, y que la dieta rica en grasas impuso cambios de fase en genes del reloj de acuerdo a lo esperado.

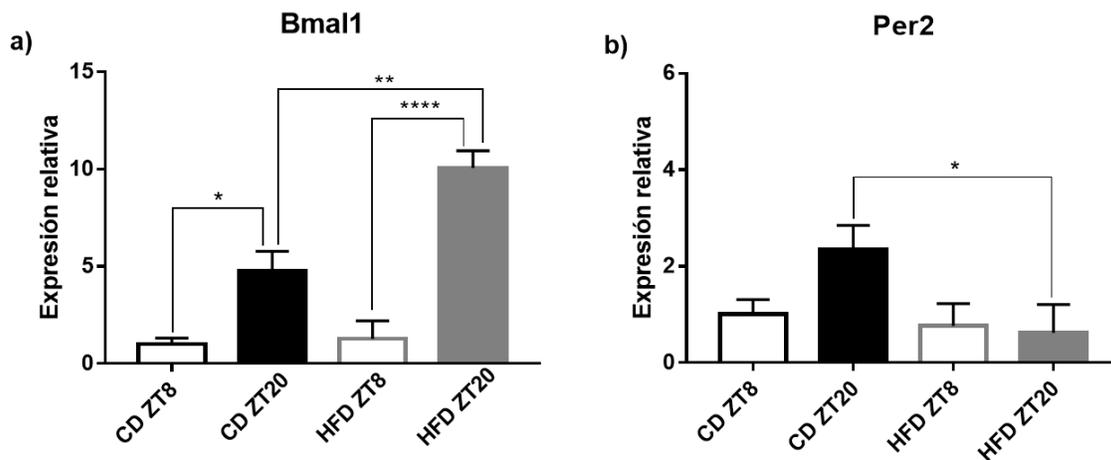


Figura 14: Expresión de genes del reloj en ratones sacrificados a ZT8 y ZT20

a) Expresión de *Bmal1* en hígado en CD y HFD., b) Expresión de *Per2* en hígado de ratón. Los perfiles se normalizaron con la expresión de B2m. Los resultados son el promedio + SEM (n=5). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, con prueba de ANOVA de una vía seguido del post-test de Bonferroni.

Posteriormente, se evaluó la expresión génica de *G9a* y *Nsd2* en esta nueva cohorte de ratones expuestos a la alimentación con HFD a los dos ZT: ZT8 (día) y ZT 20 (noche). El análisis de expresión del gen *G9a* (Figura 15a) mostró de manera significativa la oscilación del mensajero en los animales obesos, lo que atribuimos al incremento en el tiempo de dieta, que pudo robustecer los cambios en la expresión de esta KMT.

Para determinar si estos cambios se reflejan a nivel de proteína, se realizaron ensayos de Western blot (n=2) (Figura 15b, c). Se observó que durante el ZT20, en los hígados de los animales alimentados con HFD, hay una disminución significativa de la proteína que no se observa en los hígados de los animales control (Figura 15b, c), lo cual coincide con la dinámica diferencial entre el día y la noche del RNAm (Figura 15a).

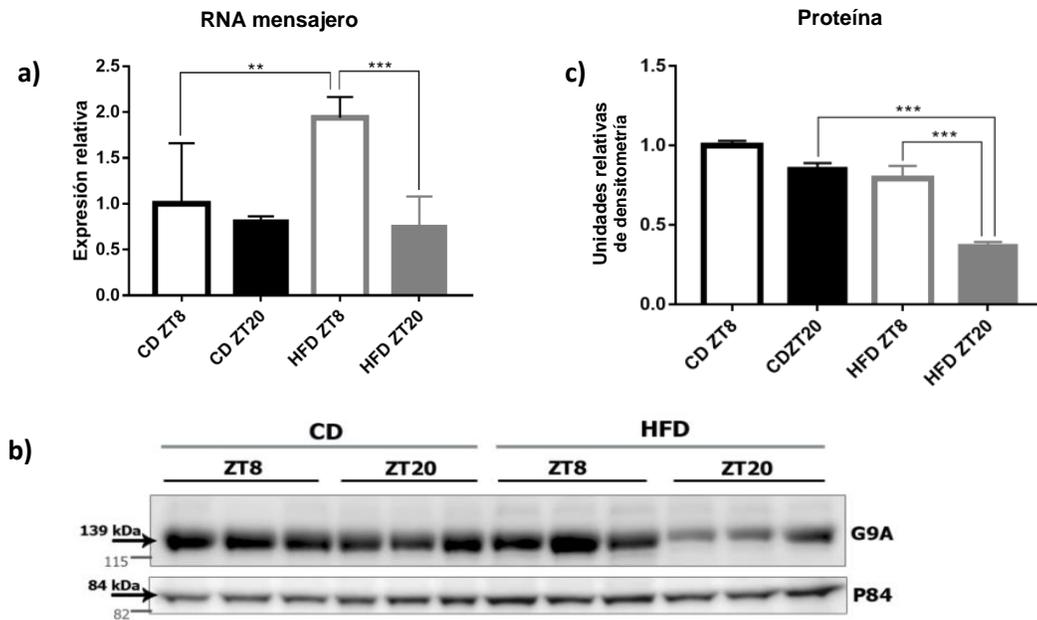


Figura 15: Oscilación de la proteína G9A en condiciones de HFD en hígado

a) Expresión del RNAm de G9a en ratones sacrificados al ZT8 y ZT20, la expresión se normalizó con el gen B2m. Los resultados son el promedio + SEM (n=5). **p<0.01, ***p<0.001, análisis realizado con prueba de ANOVA de una vía.
b) Western blot representativo de la ganancia de oscilación de la proteína G9A en condiciones de HFD, c) Densitometría del WB representativo en la que se observa un cambio significativo en la disminución de G9Aa ZT20 en la HFD comparada con el ZT8 y los animales sometidos a CD. Los resultados son el promedio + SEM (n=3). ***p<0.001 con prueba de ANOVA de una vía.

Los resultados para el transcrito de *Nsd2* (Figura 16a) mostraron de nuevo que no existe oscilación de este transcrito en los hígados de los animales control, pero sí en aquellos alimentados con HFD, siendo evidente el incremento significativo durante el ZT20. Al analizar los resultados de expresión de la proteína NSD2 mediante Western blot (Figura 16b,c), se observa que la isoforma II en condiciones de dieta control presenta expresión diferencial entre ZT 8 y 20, siendo más abundante en el periodo nocturno (ZT20). En cambio, no se aprecia esta expresión diferencial los hígados de ratones obesos, donde los

niveles de proteína permanecen bajos. Los análisis para la isoforma I de la KMT NSD2 no muestran diferencias significativas entre las condiciones analizadas. Este resultado evidencia la importancia de la regulación post-transcripcional y traduccional en el control del reloj circadiano, puesto que las diferencias en la expresión diferencial de un transcrito entre el día y la noche no siempre se ven reflejadas en cambios significativos u oscilaciones en los niveles de la proteína respectiva.

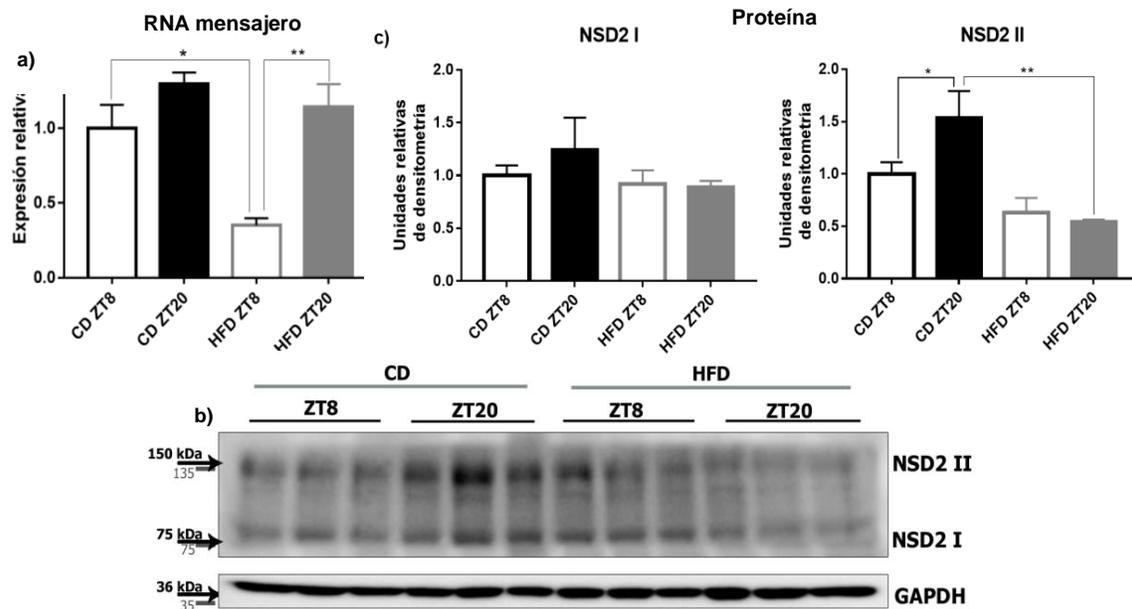


Figura 16: Oscilación del transcrito *Nsd2* en condiciones de HFD en hígado

a) Expresión de *Nsd2* en ratones sacrificados al ZT8 y ZT20, la expresión se normalizó con el gen B2m. Los resultados son el promedio + SEM (n=5). *p<0.05, **p<0.01, análisis realizado con prueba de ANOVA de una vía. b) Western blot (WB) representativo de la expresión de NSD2 en condiciones de CD y DIO, c) Densitometría del WB representativo en la que se aprecia oscilación de la proteína en condiciones de dieta control. Los resultados son el promedio + SEM (n=3). Análisis estadístico con prueba de ANOVA de una vía.

Estos datos indican que efectivamente, G9A podría actuar como un regulador epigenético sobre la reprogramación transcripcional circadiana observada en hígado de ratones ante un reto nutricional como la obesidad inducida por la dieta, mientras que la isoforma I de NSD2 parecería no estar involucrada, puesto que los niveles de proteína permanecen equivalentes en condiciones de obesidad. Interesantemente, la isoforma II de NSD2 aparece como un posible regulador de los cambios transcripcionales que se observan en el

transcriptoma circadiano en condiciones de obesidad inducida por la dieta en hígado de ratón.

8.5 Cambios en la expresión de genes del metabolismo como efecto de la dieta rica en grasa

Debido a la existencia en la bibliografía de más información sobre el papel de G9A en la regulación del metabolismo lipídico en comparación con NSD2, decidimos centrarnos en el estudio esta primera KMT. Así, para conocer si G9A puede participar como un efector epigenético durante el desarrollo de obesidad inducida por la dieta, se buscaron genes candidato sobre los que evaluar cambios en la marca epigenética catalizada por G9a, H3K9me2. Esta es una marca indicadora de silenciamiento transcripcional, asociada principalmente a heterocromatina facultativa [67], por lo que podríamos asumir que la disminución de la actividad de G9A durante el periodo nocturno observada en los hígados de ratones sometidos a una dieta rica en grasa podría inducir sobreexpresión de genes regulados por G9A, específicamente en dicho periodo.

En una búsqueda bibliográfica, observamos que G9A genera la marca H3K9me2 en diferentes regiones del gen *Pparγ*, la cual disminuye al progresar el evento de diferenciación adipogénica, acompañando a la expresión del gen [85]. Además, sabemos que PPARγ está involucrado en el desarrollo de hígado graso en respuesta a dietas obesogénicas, y en la fisiopatología de la obesidad inducida por la dieta, particularmente en el hígado [123]. Por ello, se eligió al regulador maestro *Pparγ*, en sus 2 isoformas, *Pparγ1* y *Pparγ2* como genes candidato para la regulación por G9A.

Primero, se determinó si este factor transcripcional se encuentra desregulado en nuestro paradigma experimental, es decir, en nuestros ratones y con la dieta utilizada para nuestro modelo, así como su dinámica ante distintos tiempos de reto nutricional. Para ello, primero se evaluó la expresión de las isoformas *Pparγ1* y *Pparγ2* a los tiempos 19 y 25 semanas de

alimentación con dieta rica en grasas, y sus correspondientes controles con dieta normocalórica (Figura 17).

Los resultados demuestran que al tiempo más corto (19 semanas de dieta, figura 17a) *Pparγ1* se sobreexpresa durante el periodo nocturno en el hígado de los animales alimentados con HFD, mientras que en los controles, el transcrito parece oscilar de manera antifásica. Además, *Pparγ2* gana oscilaciones significativas con gran amplitud durante el periodo diurno en los hígados de los animales obesos (Figura 17b). Al incrementar el tiempo de inducción de la dieta a 25 semanas (Figura 17c), se observa que *Pparγ1* presenta expresión diferencial en los animales control, y un incremento del mensajero en los animales HFD únicamente evidente al ZT20 (figura 17c), similar a lo observado en el análisis a las 19 semanas (Figura 17b). Para *Pparγ2*, se observa un aumento constitutivo en su expresión en los hígados de ratones obesos respecto de los controles, al incrementar el tiempo de alimentación con HFD a 25 semanas (Figura 17c).

Para corroborar el papel del receptor nuclear PPAR γ en la fisiopatología de la obesidad inducida por la dieta en el hígado de ratón, fue necesario primero evaluar los niveles de la proteína. Para ello, se realizaron ensayos de Western blot, donde se observa que la isoforma PPAR γ 1 se expresa en menor proporción a PPAR γ 2 tanto en las condiciones control como de HFD (Figura 18) para ambos ZT analizados. Interesantemente, PPAR γ 2 incrementa en el hígado de los animales alimentados con HFD comparados con los controles, en los 2 ZT evaluados (Figura 18). A partir de esta información, se puede afirmar que una HFD es capaz de generar cambios a nivel transcripcional y proteico de la expresión de PPAR γ 1 y PPAR γ 2.

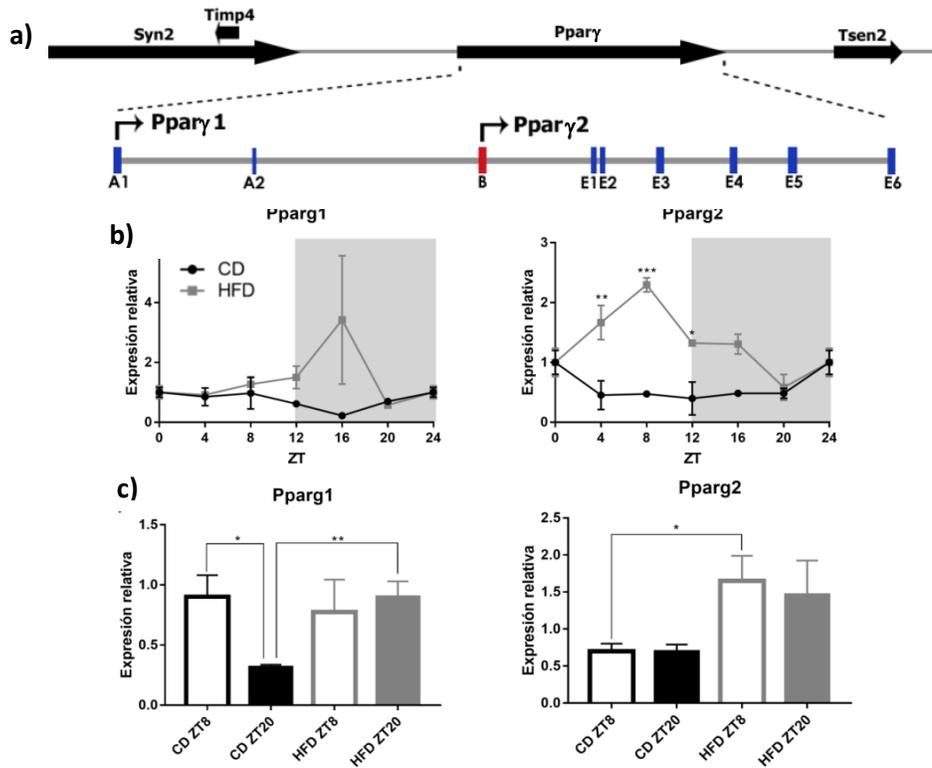


Figura 17: Perfiles de expresión de Ppar γ 1 y Ppar γ 2 en hígados de ratones bajo CD y HFD

a) Esquema de la estructura del gen Ppar γ de ratón. Se muestran los exones A1 y A2 para la isoforma 1 y el exón B donde inicia la isoforma 2. Ambos comparten los exones E1 al E6. b) Expresión de 2 isoformas de Ppar γ en ratones sacrificados cada 4 horas. Los resultados son el promedio + SEM (n=3). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, con prueba de ANOVA de dos vías. c) Expresión de Ppar γ 1 y Ppar γ 2 en ratones sacrificados en los ZT8 y ZT20. Los resultados son el promedio + SEM (n=5). *p<0.05, **p<0.01, con prueba de ANOVA de una vía.

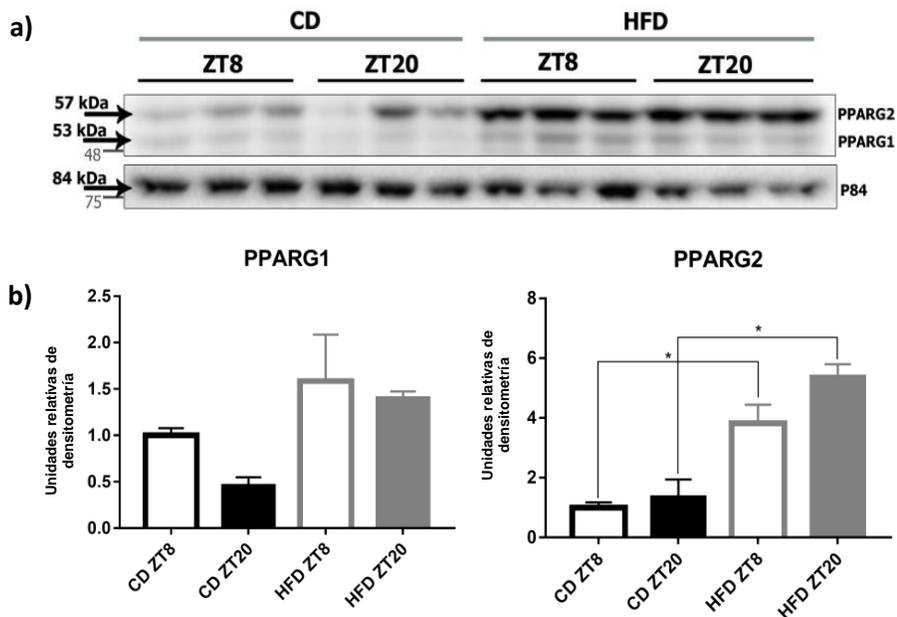


Figura 18: Expresión de las proteínas PPARG γ 1 y PPARG γ 2 en hígado

a) Western blot representativo de la expresión de PPARG γ en condiciones de CD y HFD a diferentes ZT, b) Densitometría del WB representativo en la que se observa un cambio significativo en el incremento de PPARG γ 2 en las condiciones de HFD para el ZT8 y ZT20. Los resultados son el promedio + SEM (n=3). *p<0.05 con prueba estadística de ANOVA de una vía.

Por otra parte, se seleccionaron genes control que presentaran un comportamiento en su expresión contrario a nuestro gen blanco, *Pparγ*. Para este caso, se decidió analizar a los genes *Gsta2* y *Gsta4*, que codifican para glutatión-S-transferasas, los cuales se ha reportado que se encuentran disminuidos en condiciones de obesidad, ya que al reducir la conjugación de glutatión, se disminuyen los procesos de desactivación de especies reactivas de oxígeno (ROS), dando lugar a procesos proinflamatorios característicos del hígado graso [50]. Para corroborar que en nuestro modelo de obesidad se comportaran de acuerdo a lo reportado previamente, se cuantificó la expresión de *Gsta2* y *Gsta4* en los hígados ratones sacrificados a los ZT8 y ZT20 (Figura 19).

Como se observa en la figura 19, es evidente la disminución significativa en la expresión de *Gsta2* y la tendencia a disminuir de *Gsta4* en los hígados de los ratones alimentados con dieta rica en grasas, a ambos ZT.

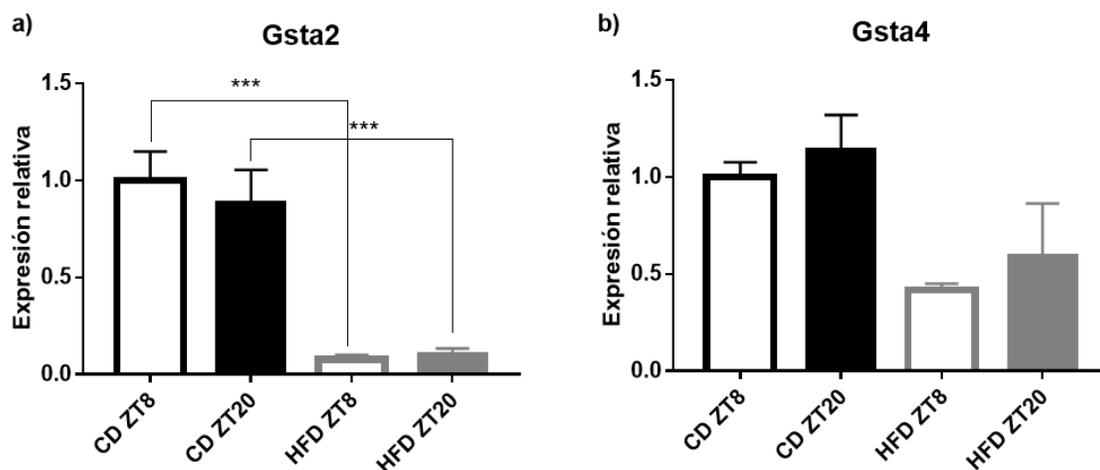


Figura 19: Perfil de expresión de *Gsta2* y *Gsta4* en hígado de ratón

a) Expresión de *Gsta2* en ratones sacrificados en los ZT8 y ZT20. b) Expresión de *Gsta4* en ratones sacrificados en los ZT8 y ZT20. Los resultados son el promedio + SEM (n=5), ***p<0.001, se realizó la prueba estadística ANOVA de una vía.

Finalmente, como control negativo se empleó al gen *Tbp*, que a partir del perfil obtenido y normalizado contra *B2m* (Figura 20), se encontró como un buen candidato por mantener una expresión constitutiva en las condiciones CD y HFD.

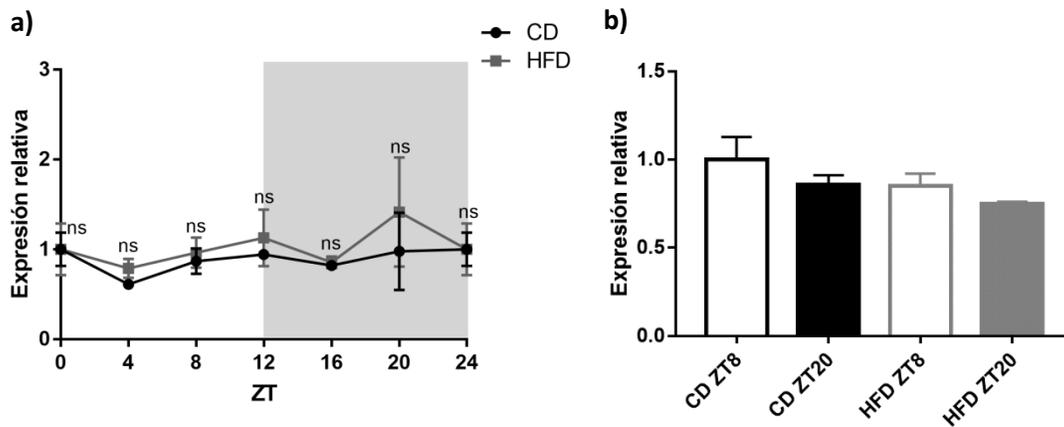


Figura 20: Perfil de expresión de *Tbp* en condiciones de CD y HFD

a) Perfil de expresión de *Tbp* constante en las condiciones CD y HFD durante 24 horas. Los resultados son el promedio + SEM (n=3), ns=no significativo, se realizó prueba de ANOVA de una vía. b) Expresión de *Tbp* en ratones sacrificados a los ZT8 y ZT20. Los resultados son el promedio + SEM (n=4-5), se realizó prueba estadística ANOVAded una vía. Todos los datos se normalizaron con la expresión de B2m.

8.6 La marca epigenética H3K9me2 presenta una dinámica específica para distintos *loci* genómicos en respuesta a la dieta

Con el fin de establecer la posible relación entre el enriquecimiento de la marca H3K9me2 en regiones específicas del gen *Pparγ* y determinar si la aparición rítmica de la marca permite la expresión cíclica de *Pparγ*, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) en los promotores de genes candidato.

Primeramente, se evaluó la presencia de H3K9me2 en los promotores de los genes *Gsta2* y *Gsta4*, los cuales se encuentran significativamente reprimidos en los hígados de los animales obesos (Figura 19). Los ChIPs muestran que la marca H3K9me2 se encuentra incrementada en los promotores de estos genes en los hígados de los ratones obesos comparados con sus correspondientes controles (Figura 21a), de manera más evidente en el ZT8 para *Gsta2*. Sin embargo, se considera este resultado una tendencia, pues las pruebas estadísticas realizadas no alcanzaron la significancia (*t* de Student, *Gsta2* $p=0.5537$, *Gsta4* $p=0.2917$). Posteriormente, se analizó los niveles de H3K9me2 en el promotor de *Tbp*, el cual no presenta cambios en su expresión entre las condiciones nutricionales analizadas (Figura 21b). En este caso, se observa que la marca analizada presenta unos niveles comparables entre las distintas condiciones temporales y nutricionales analizadas (Figura 21b), lo que hace de este *locus* seleccionado un buen

control negativo para nuestro análisis. Finalmente, analizamos los niveles de H3K9me2 en el primer intrón de los genes *Pparγ1* y *Pparγ2*, estos sitios genómicos se eligieron en base a reportes previos que identifican la presencia de H3K9me2 en el gen *Pparγ* [85]. Nuestros experimentos muestran mayores niveles de H3K9me2 tanto en *Pparγ1* como en *Pparγ2* en los hígados de los animales controles comparados con los alimentados con dieta rica en grasas (Figura 21c). Particularmente, en el periodo diurno (ZT8), esta diferencia es mayor, alcanzando el nivel de significancia en ambos casos (Figura 21c). Estas variaciones en la marca H3K9me2 podrían explicar los cambios en niveles de transcripción de *Pparγ*, el cual se ha reportado ampliamente como gen sobreexpresado en modelos de hígado graso no alcohólico [124, 125]. En particular, nuestros datos evidencian un aumento en la expresión de la isoforma *Pparγ2* en los hígados de los animales alimentados con dieta rica en grasas, el cual se hace patente tras 19 semanas de dieta y se potencia tras 25 semanas (Figura 17). Dado que H3K9me2 es una marca epigenética característica de heterocromatina facultativa y silenciamiento transcripcional [67], su disminución en el gen *Pparγ* en el hígado de los animales obesos podría estar potenciando su expresión transcripcional, específicamente de la isoforma *Pparγ2*, lo cual se traduce en mayores niveles de proteína (Figura 18) y consecuentemente en la activación de un programa de expresión génica mediado por el receptor nuclear PPARγ. Los cambios en los niveles de la metiltransferasa G9A detectados en este trabajo (Figura 15) y la participación de otros efectores epigenéticos, podrían contribuir a la regulación transcripcional de *Pparγ*.

Cabe señalar, que a pesar de que las tendencias indican una correlación entre el enriquecimiento de la marca H3K9me2 y la expresión de dos de los transcritos analizados, no es posible asegurar que la regulación transcripcional se efectúe por efecto de G9A, ya que se necesita incrementar el número de muestras para obtener resultados que le den robustez al ensayo, y realizar experimentos de CHIP para evaluar la presencia de G9A en los *loci* analizados. Además, sería importante evaluar el papel de las demetilinasas de histonas que tiene como blanco la H3K9me2, ya que el incremento de su actividad puede propiciar la disminución en los niveles de la marca y con ello regular la transcripción de *Pparγ*.

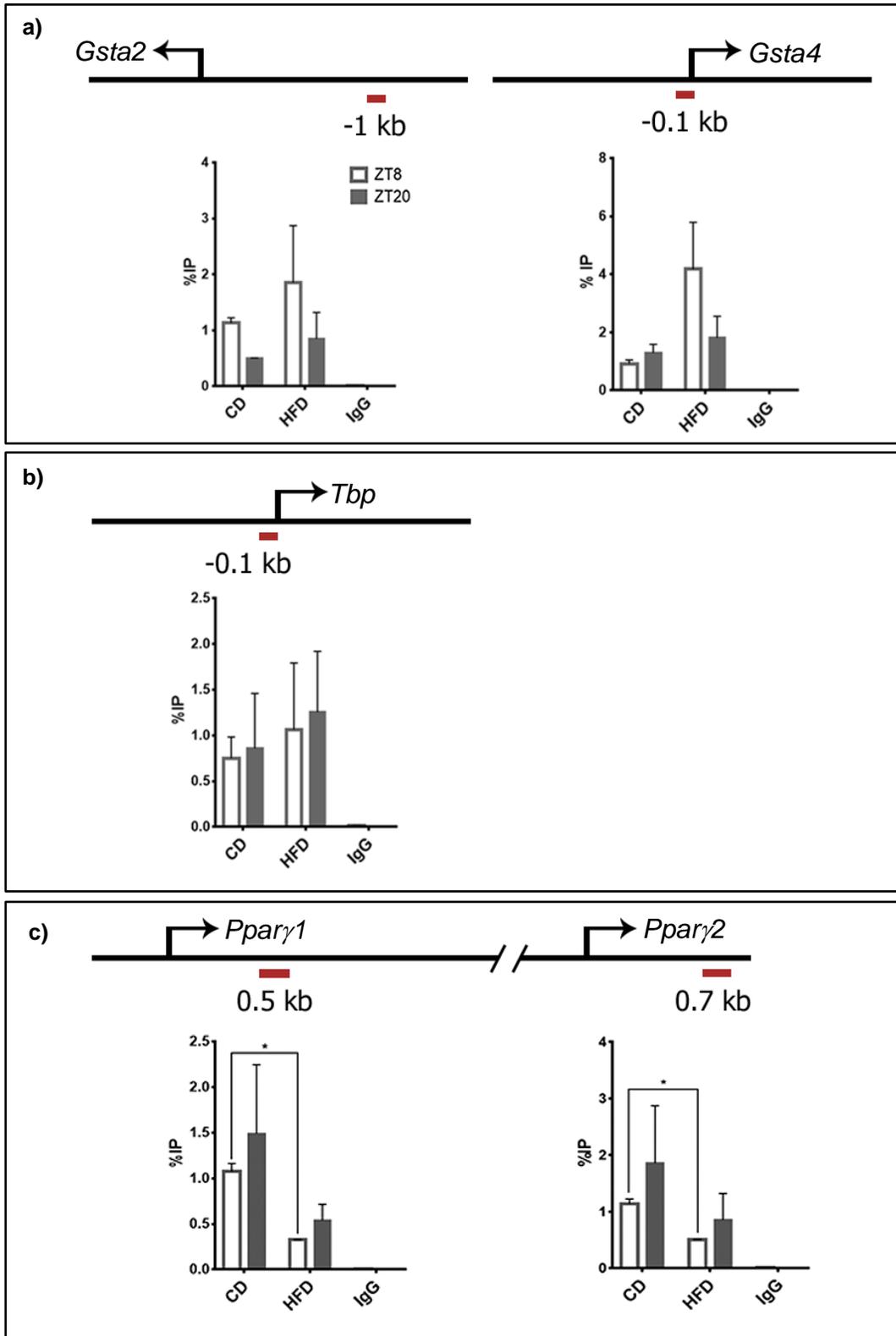


Figura 21: ChIP-qPCR del enriquecimiento de H3K9me2 en diferentes loci genómicos

a) Abundancia de la marca en controles positivos. b) Abundancia de la marca en control negativo. c) Abundancia de la marca en *loci* de interés para *Pparγ1* y *Pparγ2*. Arriba de cada gráfica se muestra la región para la que se diseñaron los primers. Los resultados son el promedio + SEM (n=2-3), * p>0.05, se realizó prueba estadística t de Student.

9. Discusión

El propósito de este proyecto era determinar si ciertas metiltransferasas de histonas pueden funcionar como efectores epigenéticos que favorecieran el desarrollo de obesidad inducida por la dieta, a través de la modulación de la expresión de genes circadianos. Para ello, primero se estableció el panel de KMTs a estudiar. Una vez planteados posibles blancos, se determinaron los perfiles de expresión de genes del reloj para verificar la sincronización del reloj endógeno en nuestro modelo animal. Posteriormente, se obtuvieron los perfiles de expresión de las KMTs elegidas (Figura 14 y Tabla 4). A partir del hallazgo de que ciertas las metiltransferasas que ganan oscilación en su expresión hepática en condiciones de alimentación con dieta obesogénica, se decidió estudiar más a fondo a G9A y NSD2. Para ello, se estableció una cohorte más grande de ratones que fueron sacrificados en el ZT8 (día) y ZT20 (noche), en los que se evaluó también la fisopatología de la obesidad inducida por la dieta (Figura 11,12 y 13).

La obesidad es una patología multifactorial que se caracteriza por el incremento de peso, ganancia de tejido adiposo, alteraciones en el metabolismo de glucosa y colesterol y aparición de biomarcadores de inflamación. Un modelo de DIO usualmente requiere alrededor de 16 semanas de dieta para generar cambios fisiológicos característicos de la obesidad. Después de 4 semanas de dieta, el incremento gradual de peso se vuelve notorio, y al final del periodo de inducción, se espera que el peso de los ratones con DIO sea del 20-30% mayor que los control [126]. En nuestro modelo, (Figura 11) este último parámetro se cumple, ya que el incremento promedio de peso de los ratones obesos es del 27% respecto a los control. Este incremento de peso diferencial entre grupos se vuelve significativo a partir de la semana 8 de dieta, lo cual puede deberse a la edad a la que los ratones fueron sometidos a la dieta obesogénica, ya que se ha reportado que ratones C57BL de 3 semanas alimentados con una HFD, desarrollan resistencia a la DIO y el incremento de peso se observa a partir de la semana 8 [127]. No obstante, distintos

componentes nutricionales en las dietas o factores ambientales podrían contribuir significativamente a la implementación del modelo.

Se ha reportado que en roedores, la gluconeogénesis hepática se incrementa al iniciar su fase activa, así como el incremento en la transcripción de diversos genes que controlan el metabolismo de la glucosa como la glucosa-6-fosfato (*G6P*) y el transportador de glucosa tipo 2 (*Glut2*), los cuales se sabe, se expresan de manera circadiana en hígado [128]. Por ende, el reloj en hígado regula la producción de glucosa hepática. Este incremento en los niveles de glucosa en su fase activa, se observa como un pico cercano al ZT12-ZT14, y su disminución se observa en la fase opuesta, es decir al ZT0-ZT2 [129, 130]. Por ello, se eligieron los ZT3 y ZT15 para realizar las pruebas de tolerancia a la glucosa e insulina. En los resultados obtenidos (Figura 12), es evidente que cuando los animales son sometidos a una dieta HF, se genera un incremento en los niveles de glucosa y resistencia a la insulina (Figura 13), esto debido a que la inflamación y el consumo excesivo de energía regulan a la baja la expresión del receptor de insulina y con ello se alteran vías de señalización río abajo, induciendo la disminución en la capacidad de eliminación de glucosa sérica [131]. De manera interesante, en la prueba de resistencia a la insulina, la respuesta de nuestros ratones fue similar en los ZT3 y ZT15. Este efecto pudo ocasionarse por ejemplo, por el corrimiento en la actividad y con ello en la alimentación de los ratones, que genera que la alimentación no solo se limitase al periodo nocturno, sino que también consuman alimento durante el periodo de luz.

La persistencia en las oscilaciones transcripcionales de genes del reloj a pesar del cambio en la dieta, es un efecto notado en diversos estudios [122, 123]. Los resultados obtenidos mostraron para *Bmal1* un cambio de fase, donde la acrofase se alcanza en el ZT20, mientras que en condiciones de CD la acrofase se encuentra en el ZT24. La expresión del gen *Per2*, demuestra que la amplitud de las oscilaciones disminuyen en un paradigma de obesidad, y los resultados fueron comparables en las 2 cohortes de animales estudiadas, mientras que *Nr1d1* (*Rev-Erba*) presentó una notoria pérdida de amplitud en los ratones alimentados con una dieta HF, así como un cambio de fase, donde la acrofase en

condiciones de dieta HF se desplazó al ZT4. Estos datos coinciden con lo previamente reportado [3, 132].

Por otro lado, los perfiles de expresión de las KMTs muestran más variabilidad entre condiciones, donde se pone de manifiesto que la dieta puede funcionar como un sincronizador que modifica los perfiles de expresión génica a lo largo del día. A partir del análisis predictivo realizado con CircWave, se encontró que las metiltransferasas *G9a* y *Nsd2* ganan oscilación en sus niveles de transcrito en los hígados de los animales obesos, mientras que *Suv420h2* y *Setdb2* pierden oscilación en estos animales. De la misma manera, cuando la población se incrementó a 5-6, así como el periodo de dieta a 25 semanas, los resultados obtenidos fueron reproducibles (Figuras 15 y 16) por lo que la obesidad inducida por la dieta es capaz de generar cambios transcripcionales en genes que codifican para KMTs.

Es de particular interés el perfil de expresión detectado para las metiltransferasas *G9a* y *Nsd2*. Se ha reportado que los metabolitos S-adenosil-metionina (SAM) y S-adenosin-homocisteína (SAH), ganan oscilación en hígados de ratones alimentado con dieta rica en grasas[3]. SAM es el donador universal de grupos metilo y SAH, es el metabolito generado una vez realizada la transferencia de grupo metilo, por lo que se sugiere que la ganancia de oscilación de algunas KMTs puede deberse a la ganancia de oscilación de ambos metabolitos [3].

Con el fin de evaluar la posibilidad de que las KMTs tuvieran actividad rítmica sobre sus blancos, primero se observó la expresión proteica. En el caso de NSD2 no se observaron diferencias en la expresión de las 2 isoformas en la condición de obesidad, pero sí de la isoforma 2 en la dieta control. Interesantemente, se ha reportado que durante la diferenciación adipogénica en BAT, la depleción de la marca generada por NSD2, H3K36me2, en preadipocitos, inhibe la adipogénesis, generando un incremento de H3K27me3 que impide la inducción de C/EBP α y de blancos de PPAR γ como *Cd36* y *Lpl* [97]. En un modelo de ratas obesas, en riñón existe un incremento significativo de la marca H3K36me2 en el promotor del gen *Foxo1*, el cual aumenta su expresión en condiciones de

obesidad. A partir de estos antecedentes, es posible pensar que el efecto de la marca H3K36me2 pudiera estar regulando de alguna manera la transcripción de genes metabólicos que se encuentran sobreexpresados en obesidad. Puesto que encontramos cambios significativos en los niveles de la isoforma II de NSD2 en la condición de obesidad, no se descarta que esta proteína pudiera estar implicada en la reprogramación transcripcional sobre la expresión de genes circadianos observada en condiciones de obesidad inducida por la dieta en hígado de ratón.

En el caso de G9A, los resultados mostraron una clara y reproducible expresión diferencial de la proteína en las condiciones de obesidad, particularmente al ZT20, lo que correlaciona con su dinámica a nivel transcripcional. Adicionalmente se ha reportado que durante 26 semanas de inducción de HFD [133], los niveles de G9A disminuyen respecto a los control, tal y como se observa en los resultados obtenidos para el ZT20. El efecto de esta disminución se ha analizado en cultivo celulares de hepatocitos de ratón y muestran que se favorece la expresión del RNAm del receptor de insulina (INSR), así como la disminución en los niveles de expresión de IRS-2 y de las proteínas IR α e IR β , siendo este comportamiento independiente de su actividad como metiltransferasa. Lo que pone de manifiesto la importancia que ejerce G9A en la regulación de insulina en un sistema *in vitro* [133]. A partir de los antecedentes que involucran a G9A con metabolismo [86-88] se planteó evaluar la actividad metiltransferasa de G9A en *Ppar γ* como blanco.

Se eligió al FT PPAR γ ya que los efectos de una HFD revelan el enriquecimiento en las vías de señalización dirigidas por PPAR γ , así como un incremento en su expresión tanto a nivel de transcrito como de proteína a partir de la semana 8 en modelos de obesidad inducida por la dieta [124]. Además, se ha reportado que su actividad transcripcional puede estar dirigida por G9A durante la diferenciación adipogénica [85].

Para determinar si en el modelo de estudio se observaba la sobreexpresión de *Ppar γ* , se evaluó su expresión a nivel de transcrito y de proteína, mostrando un incremento en la expresión de la isoforma 2 de *Ppar γ* en las condiciones dieta HF (Figura 17), lo que coincide con reportes previos [125]. Además, se ha reportado que el dominio N-terminal de *Ppar γ 2*,

le confiere una respuesta de activación transcripcional mayor que la de *Pparγ1*, y esta respuesta se incrementa bajo un estímulo de insulina [134], por lo que sería de esperar que en los individuos obesos presentaran mayor activación de PPARγ2 ya que los niveles de insulina se encuentran incrementados en obesidad [135].

Por otra parte, en los resultados obtenidos (figuras 17 y 18) se observó un incremento en el RNAm de *Pparγ 2* y de la proteína en las condiciones de dieta HF, pero no se observa expresión diferencial entre el día y la noche a nivel proteico. Se ha descrito que PPARγ puede propiciar la ganancia *de novo* de oscilaciones de diversos transcritos al translocar a la proteína nuclear de manera rítmica a sus genes blanco en condiciones de una HFD [3]. Esta oscilación de la proteína se observa en la fracción nuclear y no en la citoplásmica, siendo los ZT nocturnos donde incrementan los niveles de proteína [3, 136]. Por ello, es posible que en los resultados obtenidos no se aprecie la ganancia de oscilación de PPARγ2, por lo que sería conveniente realizarlo en la fracción nuclear.

Durante la diferenciación adipogénica, los niveles de G9a disminuyen así como los de la marca H3K9me2, mientras que los de PPARγ incrementan [85]. Estos hallazgos correlacionan con los resultados obtenidos en el estudio, donde se observa que al reducir los niveles de G9A (Figura 15b y c), los niveles de PPARγ incrementan (Figura 18). A partir de los resultados obtenidos de ChIP, las tendencias en enriquecimiento de H3K9me2 en el promotor de *Pparγ* (Figura 21c) sugieren que esta marca puede variar de manera *loci*-específica, lo que se puede asociar a cambios en la expresión de diversos genes.

En los resultados observamos un incremento de la marca en los genes reprimidos en condiciones de HFD, como *Gsta2* y *Gsta4* (Figura 21a), y estos cambios correlacionan con la expresión de RNAm (Figura 19). En el caso de la regulación de *Pparγ1* y *Pparγ2* en condiciones de obesidad, se aprecia un incremento en los niveles de transcrito en los ZTs analizados (Figura 17c), esto posiblemente por una disminución en los niveles de la marca H3K9me2 (Figura 21c), pero al analizar los niveles de la proteína G9A, se aprecia que en el ZT8, la expresión proteica no es estadísticamente significativa al compararla contra las condiciones control, por lo que en el ZT8 los cambios observados podrían ser explicados

por el incremento de la actividad de una demetilasa de histonas que actúe sobre H3K9me2 más que sobre el efecto de G9A *loci* específico en *Pparγ*. En el caso del ZT20, en el que se observa una disminución estadísticamente significativa de la expresión proteica de G9A comparada contra el ZT20 en obesidad, los niveles de expresión de transcrito de *Pparγ* podrían deberse a la falta de reclutamiento de G9A a sus sitios blancos o la pérdida de actividad de una demetilasa específica para H3K9me2 con actividad rítmica, aunque no se descarta que otro mecanismo pueda regular la expresión del gen. A partir de la información obtenida en este proyecto, podría pensarse que H3K9me2 es necesaria para regular la transcripción en genes implicados en metabolismo.

En datos de GRO-seq de hígado de ratón alimentados con CD o HFD (GSE59486, GSM2915334)[137, 138], no se observa de manera clara la abundancia de RNA naciente de *Pparγ* en las condiciones de HFD a los ZT7 y ZT19 (Figura 22), pero ensayos realizados en el laboratorio (publicación en proceso), sugieren que el pre-RNA se expresa diferencialmente entre ZT6 y ZT18, siendo el ZT18 donde se observa un incremento de pre-RNA. Al contrastar estos resultados con la información disponible, se sabe que la expresión rítmica de preRNA puede no dar lugar a RNAm oscilantes, ya que los RNAm de vida media larga pueden enmascarar la transcripción. Particularmente un grupo de genes que presentan esta característica, en la que el preRNA tiene expresión rítmica, pero no su RNAm, corresponde a genes implicados en el metabolismo de lípidos [80], como pudiera ser el caso de *Pparγ*.

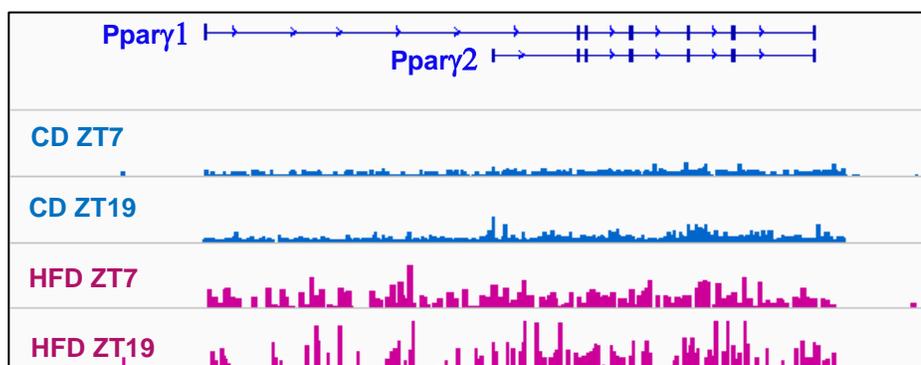


Figura 22: GRO-seq entre dieta control y dieta rica en grasas a los ZT7 y ZT19 en la región de *Pparγ1* y *Pparγ2*

En las condiciones de dieta control se observa que la transcripción ocurre de manera similar en ambos ZTs para el locus de *Pparγ1* y *Pparγ2*. Para el caso de la HFD se observa una muy ligera la tendencia al incrementar la transcripción en el ZT19 en la región de *Pparγ1* y *Pparγ2*. Imágenes realizadas a partir de los datos de RNA-seq obtenidos de GEO (GSE59486, GSM2915334)[3, 4].

A nivel epigenético, diferentes evidencias demuestran la importancia de la regulación de los niveles de H3K9me2 no solo mediada por G9A, sino también por demetilinas de histonas específicas para este residuo de lisina. Además se ha encontrado que la marca no únicamente se encuentra enriquecida en *loci* de genes metabólicos, sino también de genes involucrados en la respuesta inmune, lo que pone de manifiesto la importancia del enriquecimiento de esta marca en el genoma.

Por ejemplo, se sabe que la demetilina JHDM2a participa en la regulación de expresión de genes implicados en metabolismo y obesidad [114]. En células estelares hepáticas humanas, se ha reportado que el knock-down de JMJD1A (demetilina que remueve la marca H3K9me2 y H3K9me) incrementa los niveles de H3K9me2 en el promotor de *Ppar γ* , lo que reduce su expresión y favorece la aparición de fibrosis hepática [139]. Además, el perfil de expresión rítmica del RNAm de esta demetilina, muestra que oscila en condiciones de dieta control y en condiciones de obesidad [3], lo que no descarta la posibilidad de pensar que la expresión proteica de JMJD1A sea circadiana y pueda regular los niveles de H3K9me2 en el locus de *Ppar γ* .

Interesantemente en células 3T3-L1, la demetilina JMJD2B disminuye los niveles de H3K9me2/me3 en regiones promotoras de *Ppar γ* y *C/EBP*, por lo que induce la expresión de ambos en adipogénesis. Análisis de Ontología de Genes (GO) para los niveles globales de H3K9me2 en preadipocitos 3T3-L1, reportan el enriquecimiento de la marca en genes asociados a respuesta inmune e inflamación [85], evidencia que ha sido soportada de manera directa en MEFs sometidos a un reto inmunológico y en los que al depletar G9A, se incrementa la expresión de genes INF y pone de manifiesto la regulación directa entre H3K9me2 y la expresión de blancos específicos inflamatorios [140]. La obesidad, al acompañarse de inflamación sistémica, ha sido blanco de estudio para la prueba de terapias génicas en moduladores inmunológicos que buscan atenuar o revertir los daños metabólicos generados por la DIO. Ejemplo de ello, se ha observado en la sobreexpresión en WAT de IFN β , la cual mejora la resistencia a la insulina así como la homeostasis de

glucosa, aunque no es capaz de revertir el hígado graso generado en un fenotipo de DIO en ratones [141].

Estos hallazgos nos hacen pensar que durante la obesidad, la acción combinatoria de diversos efectores epigenéticos sobre sus genes blanco puede regular programas de expresión génica relativos al metabolismo lipídico y respuesta inmune, lo que resulta en una red compleja de regulación que media los efectos fisiopatológicos de la obesidad. Este proyecto, sugiere que *Ppar γ 2* es en parte regulado por G9A en hígado de ratones, y que esta regulación se da de manera diferencial en condiciones de alimentación con dieta control y dieta obesogénica en el día y la noche (Figura 23).

Por los resultados encontrados, así como la evidencia reportada, sería importante determinar mediante análisis genómico, el enriquecimiento de H3K9me2 en condiciones CD y de HFD, ya permitiría determinar regiones en las que se encuentra enriquecida y si estos *loci* corresponden a genes implicados en metabolismo. Estos datos podrían ayudar a determinar blancos que modulen la inflamación o el metabolismo y diseñar terapias epigenéticas dirigidas al tratamiento de obesidad.

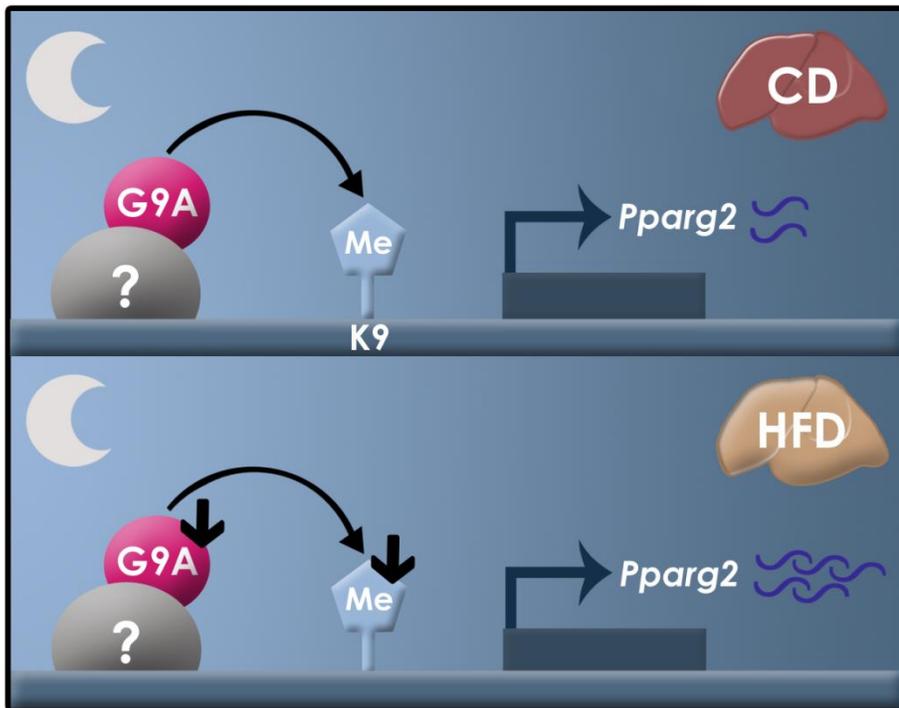


Figura 23: Modelo del efecto represor de G9A sobre Pparg2 en condiciones de dieta control (CD) y dieta rica en grasas (HFD) al ZT20

El primer panel muestra que en la alimentación con una CD al ZT20, se lleva a cabo el reclutamiento de G9A a su sitio blanco, dando lugar a la marca H3K9me2, y con ellos a niveles basales del transcrito de Pparg2. El panel inferior muestra que la implementación de una HFD modifica los niveles de la proteína G9A y esto se acompaña de disminución en los niveles de la marca H3K9me2, generando un incremento en la transcripción de Pparg2.

10. Conclusiones

- ✓ El implemento de una dieta rica en grasa por 25 semanas generó un modelo de obesidad en ratones C57BL, que adicionalmente presentaban daños a nivel metabólico, observados en el incremento en los niveles de glucosa en sangre así como resistencia a la insulina.
- ✓ Se obtuvieron perfiles de expresión de KMTs en hígado de ratón bajo un modelo de CD y DIO, los cuales revelaron la oscilación de *Nsd2* en HFD a nivel de transcrito con incremento en la expresión durante el ZT20. A nivel proteico, no se encontró expresión diferencial de la isoforma NSD2 I, sin embargo, la isoforma NSD2 II presentó expresión diferencial en el día y la noche en condiciones de alimentación normal. Adicionalmente se identificó la oscilación de *G9a* en HFD a nivel de RNAm y de proteína, con una disminución en el ZT20 comparada con el ZT8, así como disminución en los niveles de H3K9me2 para ambos ZTs.
- ✓ Se identificó a PPAR γ 2 como un factor transcripcional sobreexpresado en condiciones de obesidad a nivel de transcrito y proteína, cuya regulación transcripcional podría deberse al efecto de G9A en condiciones de obesidad al ZT20, y no así al ZT8. Aunque no se descarta la posible participación de una demetilasa de histonas que tenga como blanco la H3K9me2 y regule la transcripción cíclica de *Ppar γ 2* al ZT8.

11. Perspectivas

- ✓ Realizar estudios a nivel genómico del enriquecimiento de la marca H3K9me2 y de G9A en la DIO para la identificación de posibles blancos implicados en los cambios metabólicos observados en la HFD.
- ✓ Establecer un modelo *in vitro* de cultivo de hepatocitos para manipular la expresión de G9a y conocer el efecto de su depleción en un fenotipo de DIO, dado que sus antecedentes indican que pueden generar cambios en la expresión de genes metabólicos por el efecto realizado por las marcas epigenéticas.
- ✓ Realizar una búsqueda *in silico* de demetilasas de histonas cuyo blanco sea H3K9me2 y puedan mediar la transcripción de Ppar γ en condiciones de obesidad.
- ✓ Estudiar el papel de *Nsd2* en la regulación de la transcripción de sus genes blancos en condiciones de obesidad inducida por la dieta.

12. Referencias

1. Consortium, E.P., *An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome*. Nature, 2012. **489**(7414): p. 57-74.
2. Bass, J. and M.A. Lazar, *Circadian time signatures of fitness and disease*. Science, 2016. **354**(6315): p. 994-999.
3. Eckel-Mahan, K.L., et al., *Reprogramming of the circadian clock by nutritional challenge*. Cell, 2013. **155**(7): p. 1464-78.
4. Volkel, P. and P.O. Angrand, *The control of histone lysine methylation in epigenetic regulation*. Biochimie, 2007. **89**(1): p. 1-20.
5. Molina-Serrano, D., V. Schiza, and A. Kirmizis, *Cross-talk among epigenetic modifications: lessons from histone arginine methylation*. Biochem Soc Trans, 2013. **41**(3): p. 751-9.
6. Koch, B.C., et al., *Circadian sleep-wake rhythm disturbances in end-stage renal disease*. Nat Rev Nephrol, 2009. **5**(7): p. 407-16.
7. Fyodorov, D.V., et al., *Emerging roles of linker histones in regulating chromatin structure and function*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018. **19**(3): p. 192-206.
8. Panzeri, I., G. Rossetti, and M. Pagani, *Basic Principles of Noncoding RNAs in Epigenetics*. Medical Epigenetics, 2016: p. 47-63.
9. Tasselli, L. and K.F. Chua, *Methylation gets into rhythm with NAD(+)-SIRT1*. Nat Struct Mol Biol, 2015. **22**(4): p. 275-7.
10. Croken, M.M., S.C. Nardelli, and K. Kim, *Chromatin modifications, epigenetics, and how protozoan parasites regulate their lives*. Trends Parasitol, 2012. **28**(5): p. 202-13.
11. Buhr, E.D. and J.S. Takahashi, *Molecular components of the Mammalian circadian clock*. Handb Exp Pharmacol, 2013(217): p. 3-27.
12. Vitaterna, M.H., J.S. Takahashi, and F.W. Turek, *Overview of circadian rhythms*. Alcohol Res Health, 2001. **25**(2): p. 85-93.
13. Sahar, S. and P. Sassone-Corsi, *The epigenetic language of circadian clocks*. Handb Exp Pharmacol, 2013(217): p. 29-44.
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. Bedrosian, T.A., L.K. Fonken, and R.J. Nelson, *Endocrine Effects of Circadian Disruption*. Annu Rev Physiol, 2016. **78**: p. 109-31.
16. Moore, R.Y., *The suprachiasmatic nucleus and the circadian timing system*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2013. **119**: p. 1-28.
17. Moore, R.Y., *Entrainment pathways and the functional organization of the circadian system*. Prog Brain Res, 1996. **111**: p. 103-19.
18. Refinetti, R., C.M. Kaufman, and M. Menaker, *Complete suprachiasmatic lesions eliminate circadian rhythmicity of body temperature and locomotor activity in golden hamsters*. J Comp Physiol A, 1994. **175**(2): p. 223-32.
19. Stephan, F.K. and I. Zucker, *Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1972. **69**(6): p. 1583-6.
20. Ralph, M.R., et al., *Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period*. Science, 1990. **247**(4945): p. 975-8.

21. Radziuk, J.M., *The suprachiasmatic nucleus, circadian clocks, and the liver*. Diabetes, 2013. **62**(4): p. 1017-9.
22. Dibner, C., U. Schibler, and U. Albrecht, *The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks*. Annu Rev Physiol, 2010. **72**: p. 517-49.
23. 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.
24. Balsalobre, A., F. Damiola, and U. Schibler, *A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells*. Cell, 1998. **93**(6): p. 929-37.
25. Balsalobre, A., et al., *Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling*. Science, 2000. **289**(5488): p. 2344-7.
26. Yamajuku, D., et al., *Real-time monitoring in three-dimensional hepatocytes reveals that insulin acts as a synchronizer for liver clock*. Sci Rep, 2012. **2**: p. 439.
27. Takahashi, J.S., et al., *The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease*. Nat Rev Genet, 2008. **9**(10): p. 764-75.
28. Gustafson, C.L. and C.L. Partch, *Emerging models for the molecular basis of mammalian circadian timing*. Biochemistry, 2015. **54**(2): p. 134-49.
29. Altman, B.J., et al., *MYC Disrupts the Circadian Clock and Metabolism in Cancer Cells*. Cell Metab, 2015. **22**(6): p. 1009-19.
30. Papazyan, R., Y. Zhang, and M.A. Lazar, *Genetic and epigenomic mechanisms of mammalian circadian transcription*. Nat Struct Mol Biol, 2016. **23**(12): p. 1045-1052.
31. Gallego, M. and D.M. Virshup, *Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(2): p. 139-48.
32. Sanada, K., T. Okano, and Y. Fukada, *Mitogen-activated protein kinase phosphorylates and negatively regulates basic helix-loop-helix-PAS transcription factor BMAL1*. J Biol Chem, 2002. **277**(1): p. 267-71.
33. Doi, M., J. Hirayama, and P. Sassone-Corsi, *Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase*. Cell, 2006. **125**(3): p. 497-508.
34. Hirayama, J., et al., *CLOCK-mediated acetylation of BMAL1 controls circadian function*. Nature, 2007. **450**(7172): p. 1086-90.
35. Yamamoto, T., et al., *Transcriptional oscillation of canonical clock genes in mouse peripheral tissues*. BMC Mol Biol, 2004. **5**: p. 18.
36. DeBruyne, J.P., D.R. Weaver, and S.M. Reppert, *Peripheral circadian oscillators require CLOCK*. Curr Biol, 2007. **17**(14): p. R538-9.
37. Fuhr, L., et al., *Circadian systems biology: When time matters*. Comput Struct Biotechnol J, 2015. **13**: p. 417-26.
38. Kwok, K.H., K.S. Lam, and A. Xu, *Heterogeneity of white adipose tissue: molecular basis and clinical implications*. Exp Mol Med, 2016. **48**: p. e215.
39. Giordano, A., et al., *White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ*. Eur J Endocrinol, 2014. **170**(5): p. R159-71.
40. Khan, A.H. and J.E. Pessin, *Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways*. Diabetologia, 2002. **45**(11): p. 1475-83.
41. Chudek, J. and A. Wiecek, *Adipose tissue, inflammation and endothelial dysfunction*. Pharmacol Rep, 2006. **58 Suppl**: p. 81-8.
42. Ali, A.T., et al., *Adipocyte and adipogenesis*. Eur J Cell Biol, 2013. **92**(6-7): p. 229-36.
43. Shimba, S., et al., *Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(34): p. 12071-6.

44. Fischer, I.P., et al., *A history of obesity leaves an inflammatory fingerprint in liver and adipose tissue*. Int J Obes (Lond), 2017.
45. Damiola, F., et al., *Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus*. Genes Dev, 2000. **14**(23): p. 2950-61.
46. 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.
47. Turek, F.W., et al., *Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice*. Science, 2005. **308**(5724): p. 1043-5.
48. Manoogian, E.N.C. and S. Panda, *Circadian rhythms, time-restricted feeding, and healthy aging*. Ageing Res Rev, 2017. **39**: p. 59-67.
49. Vollmers, C., et al., *Time of feeding and the intrinsic circadian clock drive rhythms in hepatic gene expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(50): p. 21453-8.
50. Toye, A.A., et al., *Subtle metabolic and liver gene transcriptional changes underlie diet-induced fatty liver susceptibility in insulin-resistant mice*. Diabetologia, 2007. **50**(9): p. 1867-1879.
51. Marcheva, B., et al., *Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes*. Nature, 2010. **466**(7306): p. 627-31.
52. Grimaldi, B., et al., *PER2 controls lipid metabolism by direct regulation of PPARgamma*. Cell Metab, 2010. **12**(5): p. 509-20.
53. Griebel, G., et al., *Mice deficient in cryptochrome 1 (cry1 (-/-)) exhibit resistance to obesity induced by a high-fat diet*. Front Endocrinol (Lausanne), 2014. **5**: p. 49.
54. 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.
55. Yang, S., et al., *The role of mPer2 clock gene in glucocorticoid and feeding rhythms*. Endocrinology, 2009. **150**(5): p. 2153-60.
56. Uemura, H., et al., *Variant of the clock circadian regulator (CLOCK) gene and related haplotypes are associated with the prevalence of type 2 diabetes in the Japanese population*. J Diabetes, 2016. **8**(5): p. 667-76.
57. Ye, D., et al., *Associations of polymorphisms in circadian genes with abdominal obesity in Chinese adult population*. Obes Res Clin Pract, 2016. **10 Suppl 1**: p. S133-S141.
58. Dashti, H.S., et al., *Habitual sleep duration is associated with BMI and macronutrient intake and may be modified by CLOCK genetic variants*. Am J Clin Nutr, 2015. **101**(1): p. 135-43.
59. Corella, D., et al., *CLOCK gene variation is associated with incidence of type-2 diabetes and cardiovascular diseases in type-2 diabetic subjects: dietary modulation in the PREDIMED randomized trial*. Cardiovasc Diabetol, 2016. **15**: p. 4.
60. Karthikeyan, R., et al., *Per3 length polymorphism in patients with type 2 diabetes mellitus*. Horm Mol Biol Clin Investig, 2014. **18**(3): p. 145-9.
61. Pappa, K.I., et al., *The major circadian pacemaker ARNT-like protein-1 (BMAL1) is associated with susceptibility to gestational diabetes mellitus*. Diabetes Res Clin Pract, 2013. **99**(2): p. 151-7.
62. Kelly, M.A., et al., *Circadian gene variants and susceptibility to type 2 diabetes: a pilot study*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e32670.
63. Pinel, C., B. Prainsack, and C. McKeivitt, *Markers as mediators: A review and synthesis of epigenetics literature*. Biosocieties, 2019. **13**(1): p. 276-303.

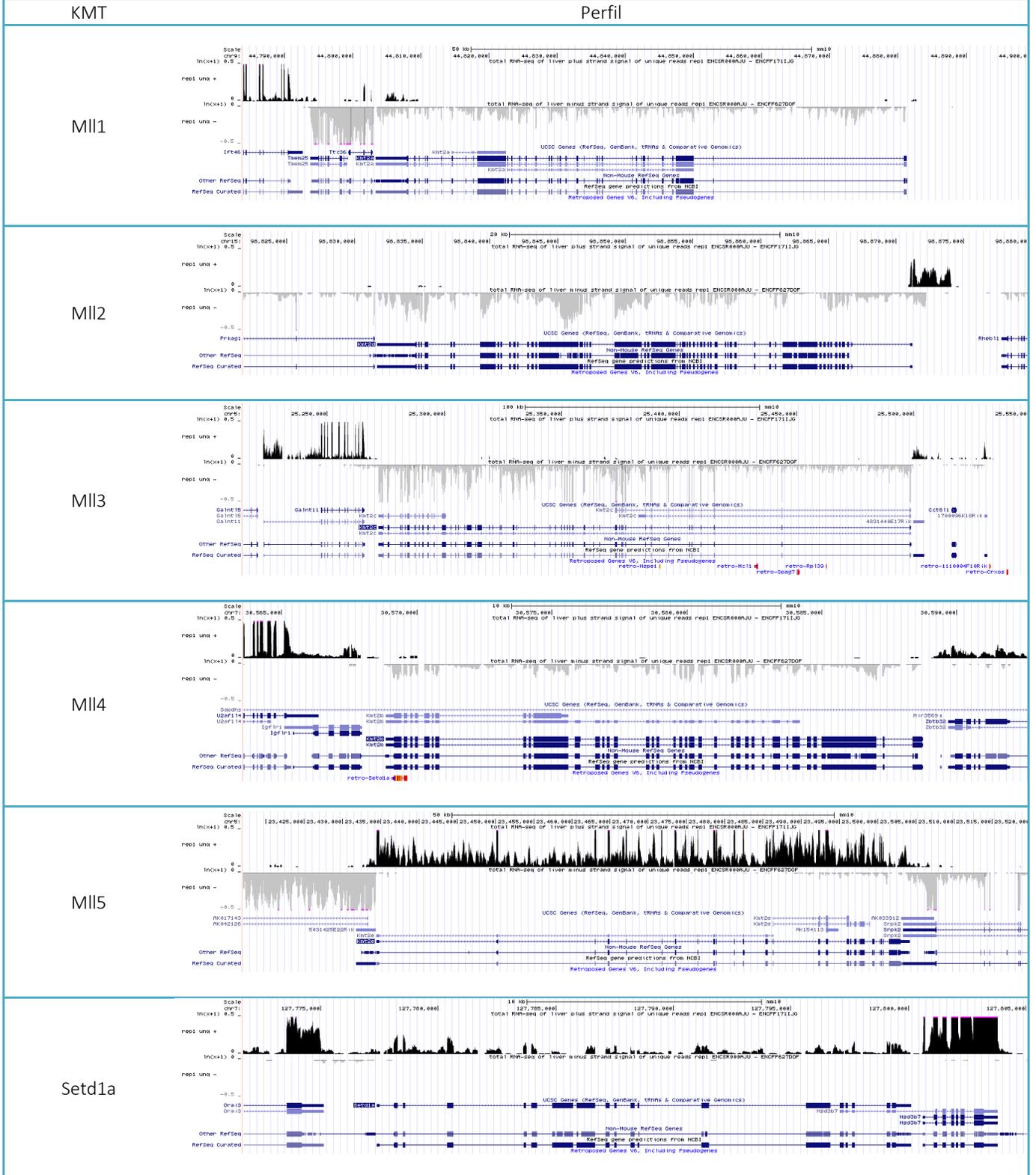
64. Quina, A.S., M. Buschbeck, and L. Di Croce, *Chromatin structure and epigenetics*. *Biochem Pharmacol*, 2006. **72**(11): p. 1563-9.
65. Venkatesh, S. and J.L. Workman, *Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015. **16**(3): p. 178-89.
66. Dejardin, J., *Switching between Epigenetic States at Pericentromeric Heterochromatin*. *Trends Genet*, 2015. **31**(11): p. 661-672.
67. Trojer, P. and D. Reinberg, *Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature?* *Mol Cell*, 2007. **28**(1): p. 1-13.
68. Raab, J.R. and R.T. Kamakaka, *Insulators and promoters: closer than we think*. *Nat Rev Genet*, 2010. **11**(6): p. 439-46.
69. Maison, C. and G. Almouzni, *HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. **5**(4): p. 296-304.
70. Greer, E.L. and Y. Shi, *Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance*. *Nat Rev Genet*, 2012. **13**(5): p. 343-57.
71. Katada, S. and P. Sassone-Corsi, *The histone methyltransferase MLL1 permits the oscillation of circadian gene expression*. *Nat Struct Mol Biol*, 2010. **17**(12): p. 1414-21.
72. Gillette, T.G. and J.A. Hill, *Readers, writers, and erasers: chromatin as the whiteboard of heart disease*. *Circ Res*, 2015. **116**(7): p. 1245-53.
73. Strahl, B.D. and C.D. Allis, *The language of covalent histone modifications*. *Nature*, 2000. **403**(6765): p. 41-5.
74. Masri, S. and P. Sassone-Corsi, *Plasticity and specificity of the circadian epigenome*. *Nat Neurosci*, 2010. **13**(11): p. 1324-9.
75. Jaskelioff, M. and C.L. Peterson, *Chromatin and transcription: histones continue to make their marks*. *Nat Cell Biol*, 2003. **5**(5): p. 395-9.
76. Kolbel, K., et al., *Type I Arginine Methyltransferases PRMT1 and PRMT-3 Act Distributively*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(13): p. 8274-82.
77. Di Lorenzo, A. and M.T. Bedford, *Histone arginine methylation*. *FEBS Lett*, 2011. **585**(13): p. 2024-31.
78. Zhang, Y. and D. Reinberg, *Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails*. *Genes Dev*, 2001. **15**(18): p. 2343-60.
79. Lu, H., et al., *Hepatic ontogeny and tissue distribution of mRNAs of epigenetic modifiers in mice using RNA-sequencing*. *Epigenetics*, 2012. **7**(8): p. 914-29.
80. Menet, J.S., et al., *Nascent-Seq reveals novel features of mouse circadian transcriptional regulation*. *Elife*, 2012. **1**: p. e00011.
81. Vaquero, A., et al., *SIRT1 regulates the histone methyl-transferase SUV39H1 during heterochromatin formation*. *Nature*, 2007. **450**(7168): p. 440-4.
82. Zhang, Z.C., et al., *Suv39h1 mediates AP-2alpha-dependent inhibition of C/EBPalpha expression during adipogenesis*. *Mol Cell Biol*, 2014. **34**(12): p. 2330-8.
83. Duong, H.A. and C.J. Weitz, *Temporal orchestration of repressive chromatin modifiers by circadian clock Period complexes*. *Nat Struct Mol Biol*, 2014. **21**(2): p. 126-32.
84. Mozzetta, C., et al., *The histone H3 lysine 9 methyltransferases G9a and GLP regulate polycomb repressive complex 2-mediated gene silencing*. *Mol Cell*, 2014. **53**(2): p. 277-89.
85. Wang, L., et al., *Histone H3K9 methyltransferase G9a represses PPARgamma expression and adipogenesis*. *EMBO J*, 2013. **32**(1): p. 45-59.
86. Meaney, S., *Epigenetic regulation of cholesterol homeostasis*. *Front Genet*, 2014. **5**: p. 311.
87. Goodwin, B., et al., *A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis*. *Mol Cell*, 2000. **6**(3): p. 517-26.

88. Tong, X., et al., *Recruitment of histone methyltransferase G9a mediates transcriptional repression of Fgf21 gene by E4BP4 protein*. J Biol Chem, 2013. **288**(8): p. 5417-25.
89. Becker, J.S., D. Nicetto, and K.S. Zaret, *H3K9me3-Dependent Heterochromatin: Barrier to Cell Fate Changes*. Trends Genet, 2016. **32**(1): p. 29-41.
90. Roqueta-Rivera, M., et al., *SETDB2 Links Glucocorticoid to Lipid Metabolism through Insig2a Regulation*. Cell Metab, 2016. **24**(3): p. 474-484.
91. Aguilar-Arnal, L., et al., *NAD(+)-SIRT1 control of H3K4 trimethylation through circadian deacetylation of MLL1*. Nat Struct Mol Biol, 2015. **22**(4): p. 312-8.
92. Brown, M.A., et al., *Identification and characterization of Smyd2: a split SET/MYND domain-containing histone H3 lysine 36-specific methyltransferase that interacts with the Sin3 histone deacetylase complex*. Mol Cancer, 2006. **5**: p. 26.
93. Wagner, E.J. and P.B. Carpenter, *Understanding the language of Lys36 methylation at histone H3*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(2): p. 115-26.
94. Yuan, W., et al., *H3K36 methylation antagonizes PRC2-mediated H3K27 methylation*. J Biol Chem, 2011. **286**(10): p. 7983-9.
95. Wang, J., et al., *Reprogramming metabolism by histone methyltransferase NSD2 drives endocrine resistance via coordinated activation of pentose phosphate pathway enzymes*. Cancer Lett, 2016. **378**(2): p. 69-79.
96. Shi, S., L. Zhao, and L. Zheng, *NSD2 is downregulated in T2DM and promotes beta cell proliferation and insulin secretion through the transcriptional regulation of PDX1*. Mol Med Rep, 2018. **18**(3): p. 3513-3520.
97. Zhuang, L., et al., *Depletion of Nsd2-mediated histone H3K36 methylation impairs adipose tissue development and function*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 1796.
98. Jorgensen, S., G. Schotta, and C.S. Sorensen, *Histone H4 lysine 20 methylation: key player in epigenetic regulation of genomic integrity*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(5): p. 2797-806.
99. Son, M.J., et al., *Methyltransferase and demethylase profiling studies during brown adipocyte differentiation*. BMB Rep, 2016. **49**(7): p. 388-93.
100. Yi, S.A., et al., *S6K1 Phosphorylation of H2B Mediates EZH2 Trimethylation of H3: A Determinant of Early Adipogenesis*. Mol Cell, 2016. **62**(3): p. 443-452.
101. Etchegaray, J.P., et al., *The polycomb group protein EZH2 is required for mammalian circadian clock function*. J Biol Chem, 2006. **281**(30): p. 21209-15.
102. Onishi, Y. and R. Kiyama, *Enhancer activity of HS2 of the human beta-LCR is modulated by distance from the key nucleosome*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(16): p. 3448-57.
103. Etchegaray, J.P., et al., *Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock*. Nature, 2003. **421**(6919): p. 177-82.
104. Aguilar-Arnal, L. and P. Sassone-Corsi, *Chromatin landscape and circadian dynamics: Spatial and temporal organization of clock transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(22): p. 6863-70.
105. Vollmers, C., et al., *Circadian oscillations of protein-coding and regulatory RNAs in a highly dynamic mammalian liver epigenome*. Cell Metab, 2012. **16**(6): p. 833-45.
106. DiTacchio, L., et al., *Histone lysine demethylase JARID1a activates CLOCK-BMAL1 and influences the circadian clock*. Science, 2011. **333**(6051): p. 1881-5.
107. Asher, G., et al., *SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation*. Cell, 2008. **134**(2): p. 317-28.
108. Nakahata, Y., et al., *The NAD+ dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control*. Cell, 2008. **134**(2): p. 329-40.
109. Nakahata, Y., et al., *Circadian control of the NAD+ salvage pathway by CLOCK-SIRT1*. Science, 2009. **324**(5927): p. 654-7.

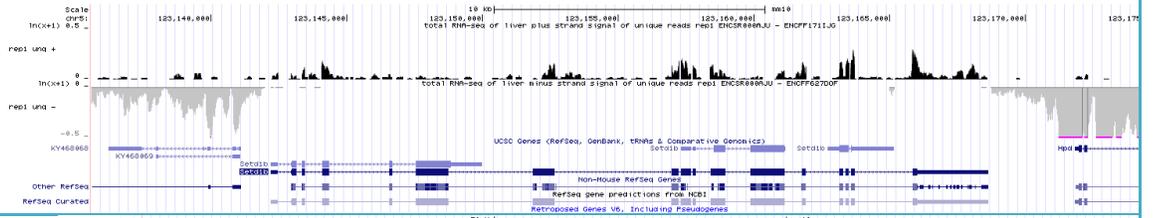
110. Kim, S., et al., *Hepatic gene expression profiles in a long-term high-fat diet-induced obesity mouse model*. *Gene*, 2004. **340**(1): p. 99-109.
111. Storch, K.F., et al., *Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart*. *Nature*, 2002. **417**(6884): p. 78-83.
112. Carrer, A., et al., *Impact of a High-fat Diet on Tissue Acyl-CoA and Histone Acetylation Levels*. *J Biol Chem*, 2017. **292**(8): p. 3312-3322.
113. Inagaki, T., et al., *Obesity and metabolic syndrome in histone demethylase JHDM2a-deficient mice*. *Genes Cells*, 2009. **14**(8): p. 991-1001.
114. Tateishi, K., et al., *Role of Jhdm2a in regulating metabolic gene expression and obesity resistance*. *Nature*, 2009. **458**(7239): p. 757-61.
115. Krishnaiah, S.Y., et al., *Clock Regulation of Metabolites Reveals Coupling between Transcription and Metabolism*. *Cell Metab*, 2017. **25**(5): p. 1206.
116. Patel, V.R., et al., *CircadiOmics: integrating circadian genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics*. *Nat Methods*, 2012. **9**(8): p. 772-3.
117. Ceglia, N., et al., *CircadiOmics: circadian omic web portal*. *Nucleic Acids Res*, 2018.
118. 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.
119. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
120. van der Spek, R., et al., *Daily Gene Expression Rhythms in Rat White Adipose Tissue Do Not Differ Between Subcutaneous and Intra-Abdominal Depots*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018. **9**: p. 206.
121. Yin, Z., E.C. Ellis, and G. Nowak, *Isolation of mouse hepatocytes for transplantation: a comparison between antegrade and retrograde liver perfusion*. *Cell Transplant*, 2007. **16**(8): p. 859-65.
122. Hsieh, M.C., et al., *Abnormal expressions of circadian-clock and circadian clock-controlled genes in the livers and kidneys of long-term, high-fat-diet-treated mice*. *Int J Obes (Lond)*, 2010. **34**(2): p. 227-39.
123. Barnea, M., Z. Madar, and O. Froy, *High-fat diet delays and fasting advances the circadian expression of adiponectin signaling components in mouse liver*. *Endocrinology*, 2009. **150**(1): p. 161-8.
124. Li, X., Z. Wang, and J.E. Klaunig, *Modulation of xenobiotic nuclear receptors in high-fat diet induced non-alcoholic fatty liver disease*. *Toxicology*, 2018. **410**: p. 199-213.
125. Hasenfuss, S.C., et al., *Regulation of steatohepatitis and PPARgamma signaling by distinct AP-1 dimers*. *Cell Metab*, 2014. **19**(1): p. 84-95.
126. Wang, C.Y. and J.K. Liao, *A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance*. *Methods Mol Biol*, 2012. **821**: p. 421-33.
127. Chu, D.T., et al., *C57BL/6J mice as a polygenic developmental model of diet-induced obesity*. *Physiol Rep*, 2017. **5**(7).
128. Panda, S., et al., *Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock*. *Cell*, 2002. **109**(3): p. 307-20.
129. Ando, H., et al., *Daily Fasting Blood Glucose Rhythm in Male Mice: A Role of the Circadian Clock in the Liver*. *Endocrinology*, 2016. **157**(2): p. 463-9.
130. Kalsbeek, A., S. la Fleur, and E. Fliers, *Circadian control of glucose metabolism*. *Mol Metab*, 2014. **3**(4): p. 372-83.

131. Nagy, C. and E. Einwallner, *Study of In Vivo Glucose Metabolism in High-fat Diet-fed Mice Using Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) and Insulin Tolerance Test (ITT)*. J Vis Exp, 2018(131).
132. Kohsaka, A., et al., *High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice*. Cell Metab, 2007. **6**(5): p. 414-21.
133. Xue, W., et al., *Histone methyltransferase G9a modulates hepatic insulin signaling via regulating HMGA1*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2018. **1864**(2): p. 338-346.
134. Werman, A., et al., *Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma). Differential activity of PPARgamma1 and -2 isoforms and influence of insulin*. J Biol Chem, 1997. **272**(32): p. 20230-5.
135. Kahn, B.B. and J.S. Flier, *Obesity and insulin resistance*. J Clin Invest, 2000. **106**(4): p. 473-81.
136. Ribas-Latre, A., et al., *Rosiglitazone reverses high fat diet-induced changes in BMAL1 function in muscle, fat, and liver tissue in mice*. Int J Obes (Lond), 2019. **43**(3): p. 567-580.
137. Fang, B., et al., *Circadian enhancers coordinate multiple phases of rhythmic gene transcription in vivo*. Cell, 2014. **159**(5): p. 1140-1152.
138. Guan, D., et al., *Diet-Induced Circadian Enhancer Remodeling Synchronizes Opposing Hepatic Lipid Metabolic Processes*. Cell, 2018. **174**(4): p. 831-842 e12.
139. Jiang, Y., et al., *Histone H3K9 demethylase JMJD1A modulates hepatic stellate cells activation and liver fibrosis by epigenetically regulating peroxisome proliferator-activated receptor gamma*. FASEB J, 2015. **29**(5): p. 1830-41.
140. Fang, T.C., et al., *Histone H3 lysine 9 di-methylation as an epigenetic signature of the interferon response*. J Exp Med, 2012. **209**(4): p. 661-9.
141. Alsaggar, M., M. Mills, and D. Liu, *Interferon beta overexpression attenuates adipose tissue inflammation and high-fat diet-induced obesity and maintains glucose homeostasis*. Gene Ther, 2017. **24**(1): p. 60-66.

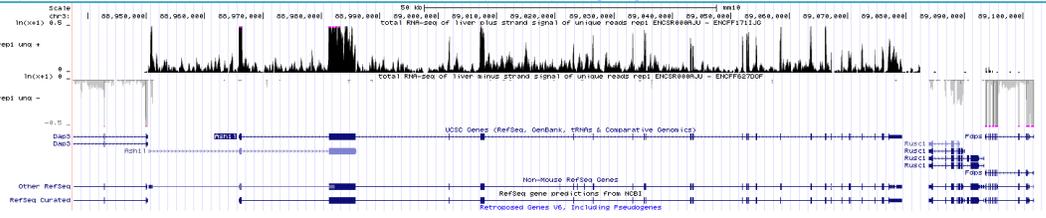
Tabla S1B: Metiltransferasas de lisina (KMTs) familia KMT2



Setd1b



Ash1l



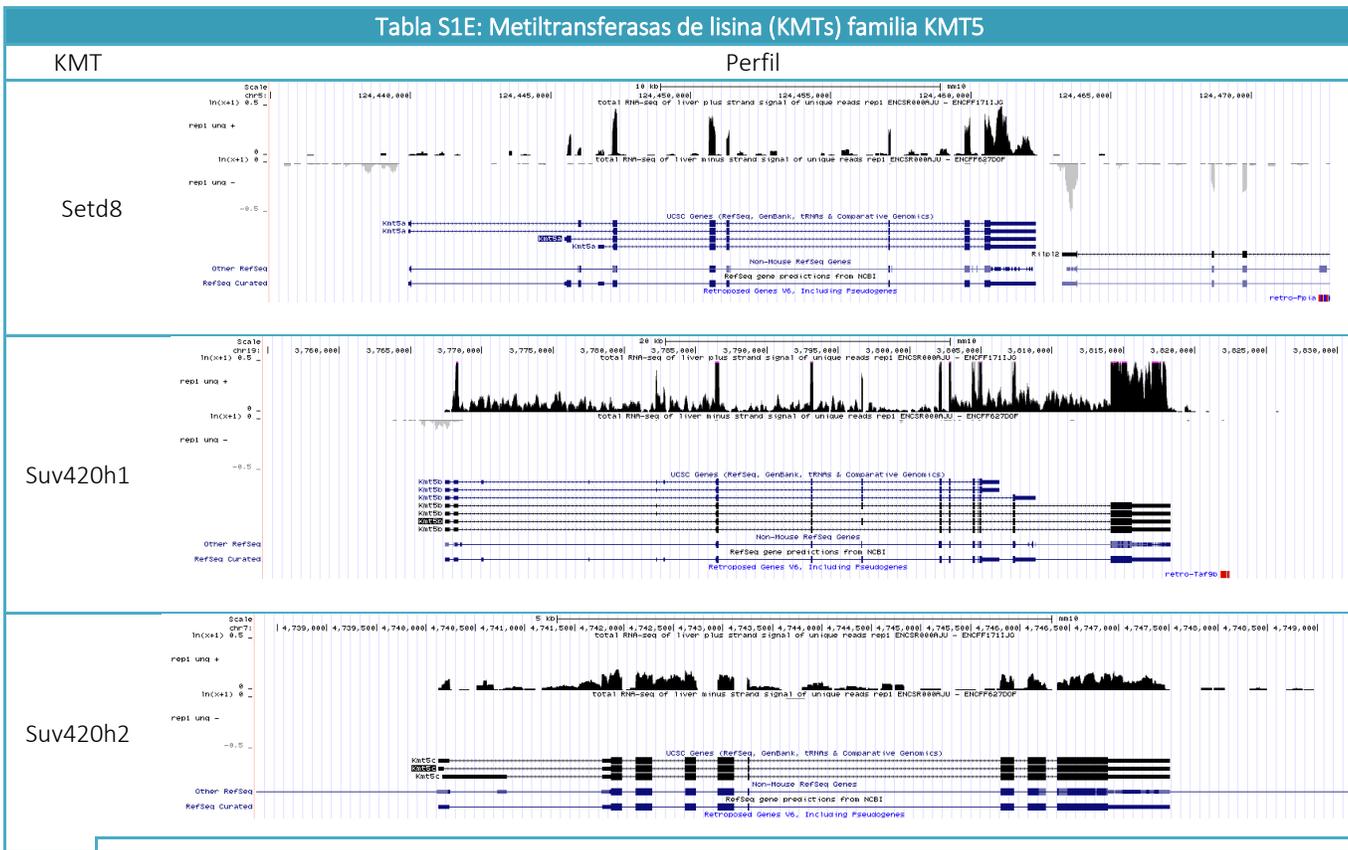
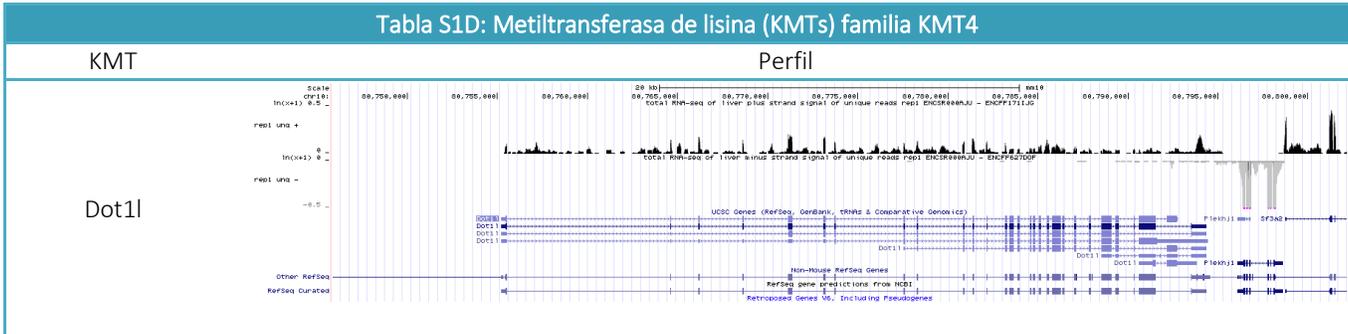
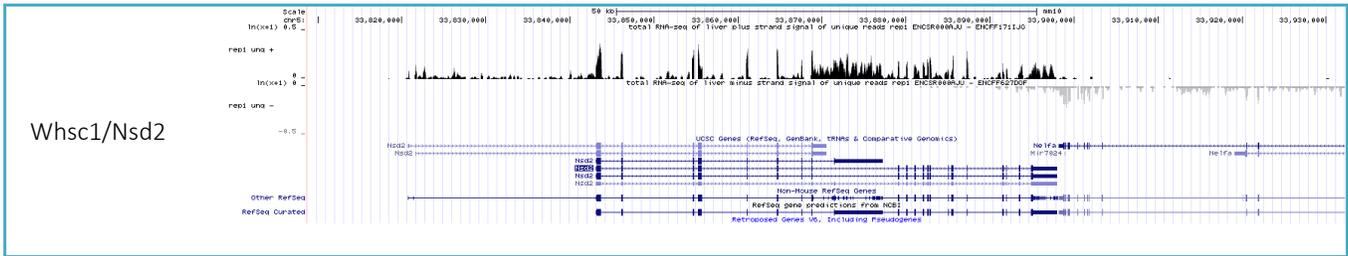


Tabla S1F: Metiltransferasas de lisina (KMTs) familia KMT6

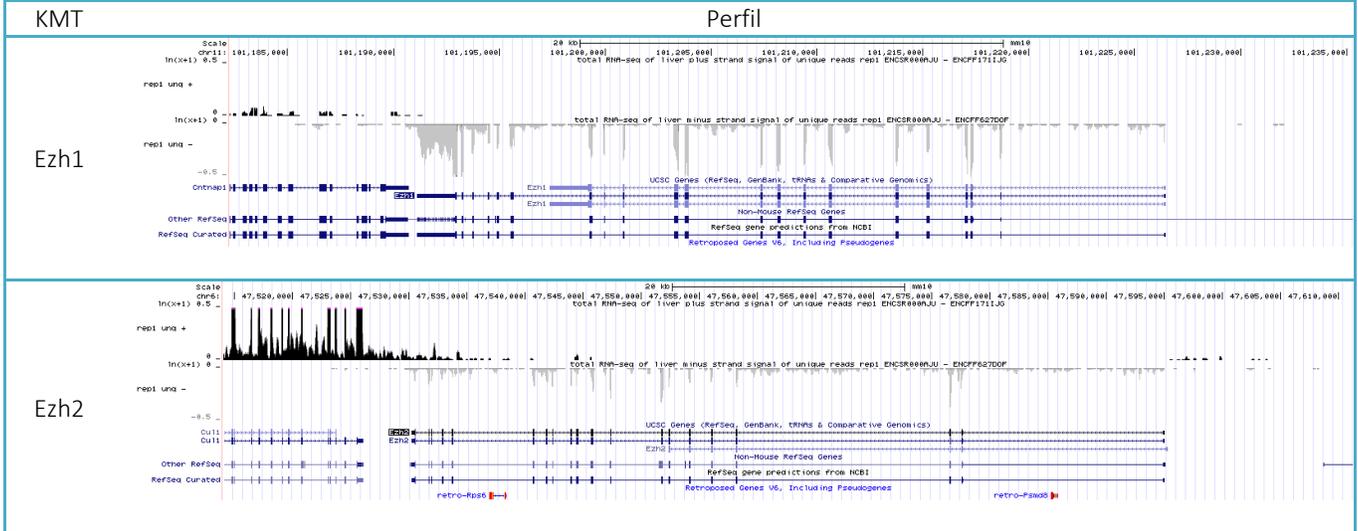


Tabla S1G: Metiltransferasas de lisina (KMTs) familia KMT7

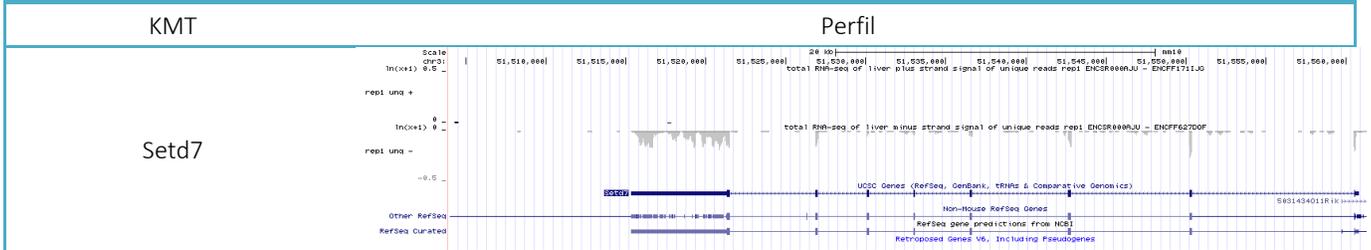


Tabla S1H:Metiltransferasas de lisina (KMTs) familia KMT8

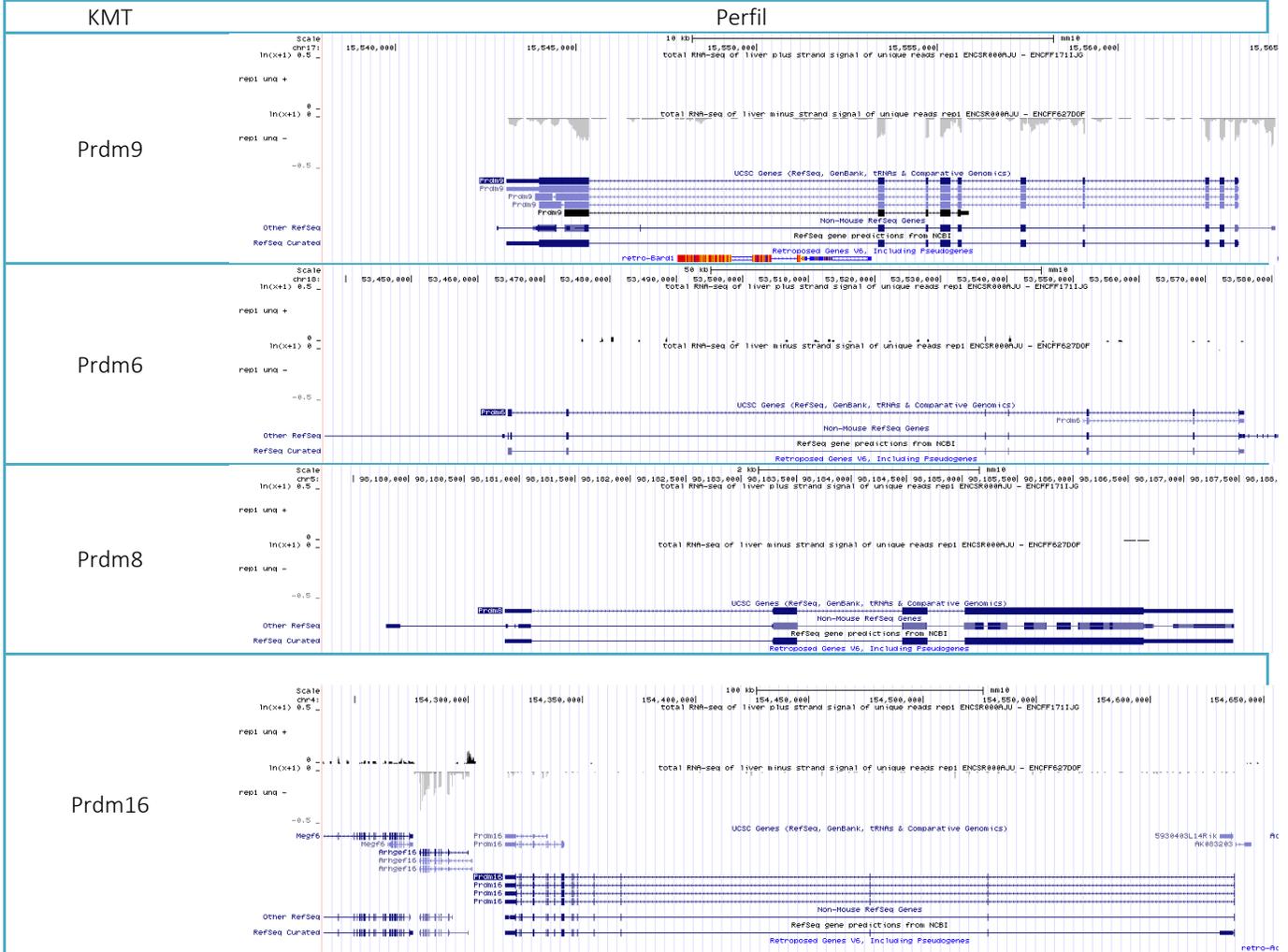


Tabla S1: Perfiles de expresión de RNAm de KMTs en hígado de ratón obtenidas a partir de información de RNA-seq

Se muestra la expresión de las KMTs separadas por familia y analizadas mediante el visualizador de la Universidad de California (UCSC Browser) a partir de datos previamente reportados (GSE78583) [1]. Los picos corresponden a la señal de RNA-seq en hígado de ratón normalizada para lecturas únicas de cada cadena.

Tabla S2A: Metiltransferasas de lisina (KMTs) familia KMT1

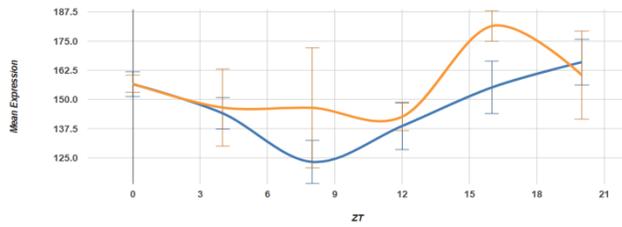
KMT	Perfil	P value	Q value	Periodo	Amplitud	Acrofase
Suv39h1		CD: 0.0623	0.3178	24	15.72	10
		HFD: 0.2108	0.9289	20	0	12
Suv39h2		CD: 1	1	22.1818	0.7054	nan
		HFD: 1	1	22.1818	0.214	nan
Ehmt2		CD: 0.2108	0.7059	24	117.4146	8
		HFD: 0.0146	0.183	20	38.3004	6
Ehmt1		CD: 0.9954	1	20	3.1448	12
		HFD: 0.4843	1	24	15.424	16
Setdb1		CD: 0.2108	0.7059	24	20.413	4
		HFD: 1	1	22.1818	30.0158	nan
Setdb2		CD: 0.0146	0.1222	24	25.3784	10
		HFD: 0.7035	1	2	25.6463	12

Tabla S2B: Metiltransferasas de lisina (KMTs) familia KMT2

KMTs	Perfil	P value	Q value	Periodo	Amplitud	Acrofase
MII1		CD: 1	1	22.1818	6.0885	nan
		HFD: 1	1	22.1818	2.9142	nan
MII2		CD: 1	1	22.1818	6.3578	nan
		HFD: 1	1	22.1818	2.2394	nan
MII3		CD: 1	1	22.1818	3.4413	nan
		HFD: 1	1	22.1818	5.027	nan
MII5		CD: 1	1	22.1818	6.5823	nan
		HFD: 1	1	22.1818	3.1192	nan
Setd1a		CD: 0.2624	0.8129	24	8.3913	2
		HFD: 0.0809	0.5286	24	1.84	22
Setd1b		CD: 0.0005	0.0132	24	51.553 9	8
		HFD: 0.0809	0.5286	24	6.6214	8
Ash1l		CD: 1	1	22.1818	3.0631	nan
		HFD: 1	1	22.1818	9.4157	nan

Tabla S2C: Metiltransferasas de lisina (KMTs) familia KMT3

KMT	Perfil	P value	Q value	Periodo	Amplitud	Acrofase
Nsd1		CD: 1	1	22.1818	6.0218	nan
		HFD: 0.7035	1	20	12.0777	0
Setd2		CD: 0.9954	1	20	22.0842	8
		HFD: 1	1	22.1818	17.6351	nan
Smyd1		CD: 1	1	22.1818	0.7502	nan
		HFD: 1	1	22.1818	0.2729	nan
Smyd2		CD: 0.3977	1	20	17.7144	16
		HFD: 1	1	22.1818	2.6701	nan
Smyd3		CD: 0.0809	0.3765	24	4.1825	8
		HFD: 0.0075	0.1185	24	12.1021	10
Setmar		CD: 0.168	0.6071	24	7.8696	14
		HFD: 0.168	0.8169	20	14.6638	14
Whsc1l1 /Nsd3Ns d3		CD: 1	1	22.1818	24.9627	nan
		HFD: 0.9954	1	24	43.632	16



CD:	0.2624	0.8129	20	16.3242	18
HFD:	0.0012	0.0343	24	18.6169	21

Tabla S2D: Metiltransferasas de lisina (KMTs) familia KMT4

KMT	Perfil	P value	Q value	Periodo	Amplitud	Acrofase
Dot1l		CD:	0.0297	24	9.7746	20
		HFD:	0.168	0.8169	24	12.3025

Tabla S2E: Metiltransferasas de lisina (KMTs) familia KMT5

KMT	Perfil	P value	Q value	Periodo	Amplitud	Acrofase	
Setd8		CD:	0.0623	0.3178	20	87.8218	18
		HFD:	0.7035	1	20	20.5253	16
Suv420h1		CD:	0.0002	0.0076	20	34.6592	6
		HFD:	0.8395	1	20	10.2893	18
Suv420h2		CD:	0.0359	0.2188	24	22.3668	2
		HFD:	0.1041	0.6165	24	13.0679	2

Tabla S2F: Metiltransferasas de lisina (KMTs) familia KMT6

KMT	Perfil	P value	Q value	Periodo	Amplitud	Acrofase
Ezh1		CD: 0.1041	0.4442	24	17.3494	4
		HFD: 0.168	0.8169	20	22.1421	6
Ezh2		CD: 0.0809	0.3765	24	16.4933	8
		HFD: 0.3977	1	20	21.4468	18

Tabla S2G: Metiltransferasas de lisina (KMTs) familia KMT7

KMT	Perfil	P value	Q value	Periodo	Amplitud	Acrofase
Setd7		CD: 0.168	0.6071	24	7.0322	16
		HFD: 1	1	22.1818	5.4708	nan

Tabla S2H: Metiltransferasas de lisina (KMTs) familia KMT8						
KMT	Perfil	P value	Q value	Periodo	Amplitud	Acrofase
Prdm9		CD: 1	1	22.1818	2.9656	nan
		HFD: 1	1	22.1818	1.8644	nan
Prdm6		CD: 1	1	22.1818	2.6323	nan
		HFD: 0.9954	1	20	0.7327	10
Prdm8		CD: 0.8395	1	24	1.1083	20
		HFD: 1	1	22.1818	2.3581	nan
Prdm16		CD: 0.4843	1	24	6.8329	17
		HFD: 1	1	22.1818	3.0485	nan

Tabla S2: Perfiles de expresión de RNAm de KMTs en hígado de ratón en condiciones de CD y HFD

La expresión de las KMTs se muestra separada por familias. Cada perfil tiene un periodo de 4 ZTs y la expresión corresponde a la fluorescencia emitida por las sondas con las que se evaluó cada gen; en azul se muestran los perfiles de los animales HFD y en anaranjado los perfiles de los ratones CD. La tabla señala el valor P, así como el valor Q, el periodo, la amplitud y la acrofase. nan= no analizado, En la columna P value, el naranja corresponde a $p < 0.05$, por lo tanto son KMTs que oscilan en alguna condición. Los datos fueron obtenidos a través de los microarreglos publicados por Eckel-Mahan [5].

Teklad Global 18% Protein Rodent Diet (Sterilizable)

Product Description- 2018S is a fixed formula, autoclavable diet manufactured with high quality ingredients and designed to support gestation, lactation, and growth of rodents. 2018S does not contain alfalfa, thus lowering the occurrence of natural phytoestrogens. Typical isoflavone concentrations (daidzein + genistein aglycone equivalents) range from 150 to 250 mg/kg. Exclusion of alfalfa reduces chlorophyll, improving optical imaging clarity. Absence of animal protein and fish meal minimizes the presence of nitrosamines. 2018S is supplemented with additional vitamins to ensure nutritional adequacy after autoclaving. Also available certified (2018SC), the diet most commonly fed in Envigo Rodent Colonies.

Ingredients (in descending order of inclusion)- Ground wheat, ground corn, wheat middlings, dehulled soybean meal, corn gluten meal, soybean oil, calcium carbonate, dicalcium phosphate, brewers dried yeast, iodized salt, L-lysine, DL-methionine, choline chloride, kaolin, menadione sodium bisulfite complex (source of vitamin K activity), magnesium oxide, vitamin E acetate, calcium pantothenate, thiamin mononitrate, manganese oxide, niacin, ferrous sulfate, zinc oxide, riboflavin, vitamin A acetate, pyridoxine hydrochloride, copper sulfate, vitamin B₁₂ supplement, folic acid, calcium iodate, biotin, vitamin D₃ supplement, cobalt carbonate.

Macronutrients		
Crude Protein	%	18.6
Fat (ether extract) ^a	%	6.2
Carbohydrate (available) ^b	%	44.2
Crude Fiber	%	3.5
Neutral Detergent Fiber ^c	%	14.7
Ash	%	5.3
Energy Density ^d	kcal/g (kJ/g)	3.1 (13.0)
Calories from Protein	%	24
Calories from Fat	%	18
Calories from Carbohydrate	%	58
Minerals		
Calcium	%	1.0
Phosphorus	%	0.7
Non-Phytate Phosphorus	%	0.4
Sodium	%	0.2
Potassium	%	0.6
Chloride	%	0.4
Magnesium	%	0.2
Zinc	mg/kg	70
Manganese	mg/kg	100
Copper	mg/kg	15
Iodine	mg/kg	6
Iron	mg/kg	200
Selenium	mg/kg	0.23
Amino Acids		
Aspartic Acid	%	1.4
Glutamic Acid	%	3.4
Alanine	%	1.1
Glycine	%	0.8
Threonine	%	0.7
Proline	%	1.6
Serine	%	1.1
Leucine	%	1.8
Isoleucine	%	0.8
Valine	%	0.9
Phenylalanine	%	1.0
Tyrosine	%	0.6
Methionine	%	0.6
Cystine	%	0.3
Lysine	%	1.1
Histidine	%	0.4
Arginine	%	1.0
Tryptophan	%	0.2

Teklad Diets are designed and manufactured for research purposes only.



© 2015 Envigo

Standard Product Form: Pellet

Vitamins		
Vitamin A ^{e,1}	IU/g	30.0
Vitamin D ₃ ^{e,9}	IU/g	2.0
Vitamin E	IU/kg	135
Vitamin K ₃ (menadione)	mg/kg	100
Vitamin B ₁ (thiamin)	mg/kg	117
Vitamin B ₂ (riboflavin)	mg/kg	27
Niacin (nicotinic acid)	mg/kg	115
Vitamin B ₆ (pyridoxine)	mg/kg	26
Pantothenic Acid	mg/kg	140
Vitamin B ₁₂ (cyanocobalamin)	mg/kg	0.15
Biotin	mg/kg	0.90
Folate	mg/kg	9
Choline	mg/kg	1200
Fatty Acids		
C16:0 Palmitic	%	0.7
C18:0 Stearic	%	0.2
C18:1ω9 Oleic	%	1.2
C18:2ω6 Linoleic	%	3.1
C18:3ω3 Linolenic	%	0.3
Total Saturated	%	0.9
Total Monounsaturated	%	1.3
Total Polyunsaturated	%	3.4
Other		
Cholesterol	mg/kg	--

^a Ether extract is used to measure fat in pelleted diets, while an acid hydrolysis method is required to recover fat in extruded diets. Compared to ether extract, the fat value for acid hydrolysis will be approximately 1% point higher.

^b Carbohydrate (available) is calculated by subtracting neutral detergent fiber from total carbohydrates.

^c Neutral detergent fiber is an estimate of insoluble fiber, including cellulose, hemicellulose, and lignin. Crude fiber methodology underestimates total fiber.

^d Energy density is a calculated estimate of *metabolizable energy* based on the Atwater factors assigning 4 kcal/g to protein, 9 kcal/g to fat, and 4 kcal/g to available carbohydrate.

^e Indicates added amount but does not account for contribution from other ingredients.

¹ 1 IU vitamin A = 0.3 µg retinol

⁹ 1 IU vitamin D = 25 ng cholecalciferol

For nutrients not listed, insufficient data is available to quantify.

Nutrient data represent the best information available, calculated from published values and direct analytical testing of raw materials and finished product. Nutrient values may vary due to the natural variations in the ingredients, analysis, and effects of processing.

Teklad Custom Diet

TD.160547

29% Fat Diet



Formula	g/Kg
Casein	216.0
DL-Methionine	2.5
Maltodextrin	300.7372
Sucrose	90.5
Vegetable Shortening, hydrogenated (Primex)	274.1
Corn Oil	16.0
Cellulose	53.12
Mineral Mix, AIN-76 (170915)	35.0
Calcium Carbonate	5.0
Vitamin B12 (0.1% in mannitol)	0.0396
Vitamin E, DL-alpha tocopheryl acetate (500 IU/g)	0.323
Vitamin A Palmitate (500,000 IU/g)	0.053
Niacin	0.07
Calcium Pantothenate	0.0881
Folic Acid	0.0026
Vitamin D3, cholecalciferol (500,000 IU/g)	0.0059
Riboflavin	0.029
Thiamin (81%)	0.029
Pyridoxine HCl	0.029
Vitamin C, ascorbic acid, coated (97.5%)	1.355
Biotin	0.0006
Choline Dihydrogen Citrate	4.66
Vitamin K3, menadione	0.066
Inositol	0.146
p-Aminobenzoic Acid	0.146

Footnote

A diet with 29% fat by weight. Approximate fatty acid profile (% total fat): 28% saturated, 30% trans, 28% monounsaturated (cis), 14% polyunsaturated (cis). Diet is formulated with 70 ppm supplemented niacin.

Key Features

- + Purified Diet
- + Diet Induced Obesity
- + Trans Fatty Acids
- + Niacin

Selected Nutrient Information¹

	% by weight	% kcal from
Protein	19.0	15.5
CHO	38.0	31.0
Fat	29.2	53.5
Kcal/g	4.9	

¹ Values are calculated from ingredient analysis or manufacturer data

Teklad Diets are designed & manufactured for research purposes only.

Key Planning Information

- + Products are made fresh to order
- + Store product at 4°C or lower
- + Use within 6 months (applicable to most diets)
- + Box labeled with product name, manufacturing date, and lot number
- + Replace diet at minimum once per week
More frequent replacement may be advised
- + Lead time:
 - 2 weeks non-irradiated
 - 4 weeks irradiated

Product Specific Information

- + 1/2" Pellet or Powder (crumbly)
- + Minimum order 3 Kg
- + Irradiation available upon request

Options (Fees Will Apply)

- + Rush order (pending availability)
- + Irradiation (see Product Specific Information)
- + Vacuum packaging (1 and 2 Kg)

Speak With A Nutritionist

- + (800) 483-5523
- + askanutritionist@envigo.com

Contact Us

Obtain Pricing · Check Order Status

- + teklad@envigo.com
- + (800) 483-5523

International Inquiry (Outside USA or Canada)

- + askanutritionist@envigo.com

Place Your Order (USA & Canada)

Please Choose One

- + www.envigo.com/teklad-orders
- + tekladorders@envigo.com
- + (800) 483-5523
- + (608) 277-2066 *facsimile*

© 2015 Envigo

06/08/16

Envigo Teklad Diets + Madison WI + envigo.com + tekladinfo@envigo.com + (800) 483-5523

Tabla S3: Composición de la dieta normocalórica e hipercalórica. La dieta Teklad 2019S contiene la composición de la dieta control. La dieta Teklad 160547 contiene los componentes de la dieta rica en grasas.

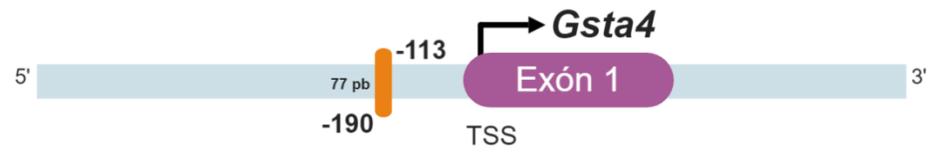
Tabla S4. Primers usados para qPCR y ChIP

Primers para qPCR		
Actina	5'- CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3'	5'- GGCTGTATTCCCCTCCATCG-3'
Gapdh	5'- GGCAAATTCAACGGCACAGT-3'	5'- CTCGTGGTTCACACCCATCA-3'
B2m	5'- GGTCTTTCTGGTGCTTGCTCA-3'	5'- GTTCGGCTTCCATTCTCC-3'
Bmal1	5'-CCAAGAAAGTATGGACACAGACAAAA-3'	5'- GCATTCTTGATCCTTCCTTGGT-3'
Nr1d1	5'- GGGCACAAGCAACATTACCA-3'	5'- CACGTCCCCACACACCTTAC-3'
Per1	5'- ACCAGCGTGCATGATGACATA-3'	5'- GTGCACAGCACCCAGTTCCC-3'
Per2	5'- GGCTTACCATGCCTGTTGT-3'	5'- GGAGTTATTTCCGAGGCAAGTGT-3'
Mll1	5'- AAGCCACCTCCAGTAAGTAA-3'	5'- ATCCCTAAGCCTCCCATC-3'
Suv39h1	5'- ATCCCTGCACAAGTTTGCC-3'	5'- TTTGCGGATCTTTTCCAGC-3'
G9a	5'- AGCCAAGAGGGGTCTCCAAT-3'	5'- CTCGCTGATGCGGTCAATCT-3'
Nsd2	5'- TGCCAAAAAGGAGTACGTGTG-3'	5'- CTTCGGGAAAGTCCAAGGCAG-3'
Smyd2	5'- AAGGATTGTCAAATGTGGACGG-3'	5'- ATGGAGGAGCATTCCAGCTTG-3'
Suv420h2	5'- GGATGGAGCTACAAGATGATGG-3'	5'- CCAGTGTTTGCCTGTTACTCAG-3'
Setdb2	5'- GGATGGAGCTACAAGATGATGG-3'	5'- CCAGTGTTTGCCTGTTACTCAG -3'
Ezh2	5'- CTGTTTCAGAGGGAGCAAAGCTTGC -3'	5'- TAGGTGGTGTCTTTATACGCTCAG -3'
Primers para ChIP		
Tbp	5'-CTTGATCGCCATTGCCACAT-3'	5'-GGCCCTTTCTAGCTGTCAAA-3'
Gsta2	5'-AGAGAAGACGGACACAGCTC-3'	5'-ACAGGCTGCACTGAGACCTA-3'

Gsta4

5'-GGGTTCCCCGTAGAGAATG-3'

5'-GTACACTCTTTGGGGGTGCT-3'



Pparg1

5'-GGATCTGACTGGCTAGGTGACT-3'

5'-GCAGCCCTGTCAGAATGTGA-3'



Pparg2

5'-AGGTCTCTGGAAGGCTTGA-3'

5'-TGTTCCCGTGAAGCAAATCTGA-3'



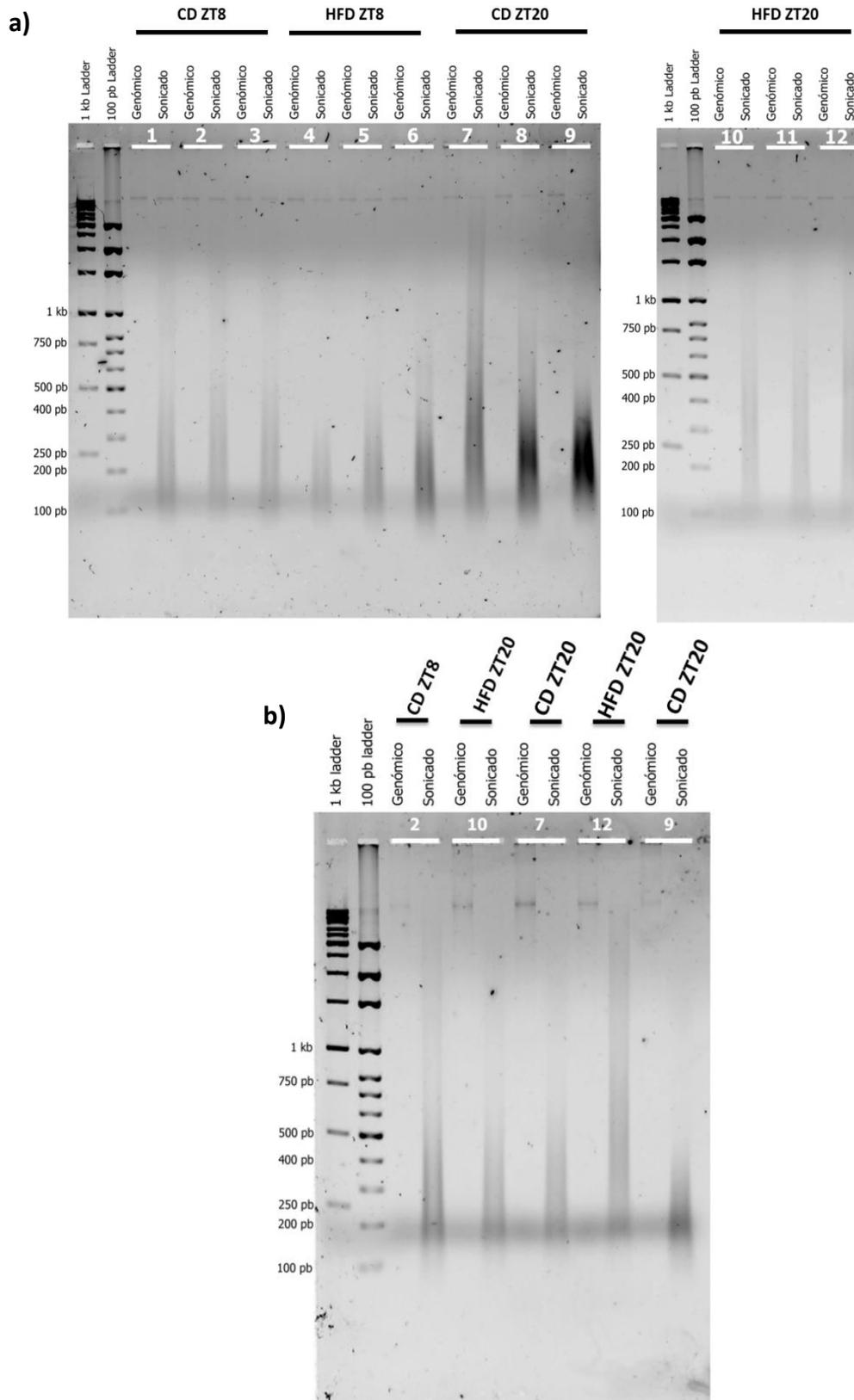


Figura S1: DNA sonicado para emplear en la técnica de ChIP

a) Gel de agarosa al 2% que muestra las muestras empleadas para cada ZT y condición. Se observa que las muestras 7,9 y 12 presentan un barrido diferente al esperado (que va de 100 a 500 pb) por lo que se repitieron, b) Gel de agarosa al 2% de la repetición de las muestras 7, 9 y 12, donde se observa que la muestra 12 presenta un barrido irregular. Por lo que esa muestra no se consideró en los análisis estadísticos de enriquecimiento de la marca H3K9me2.

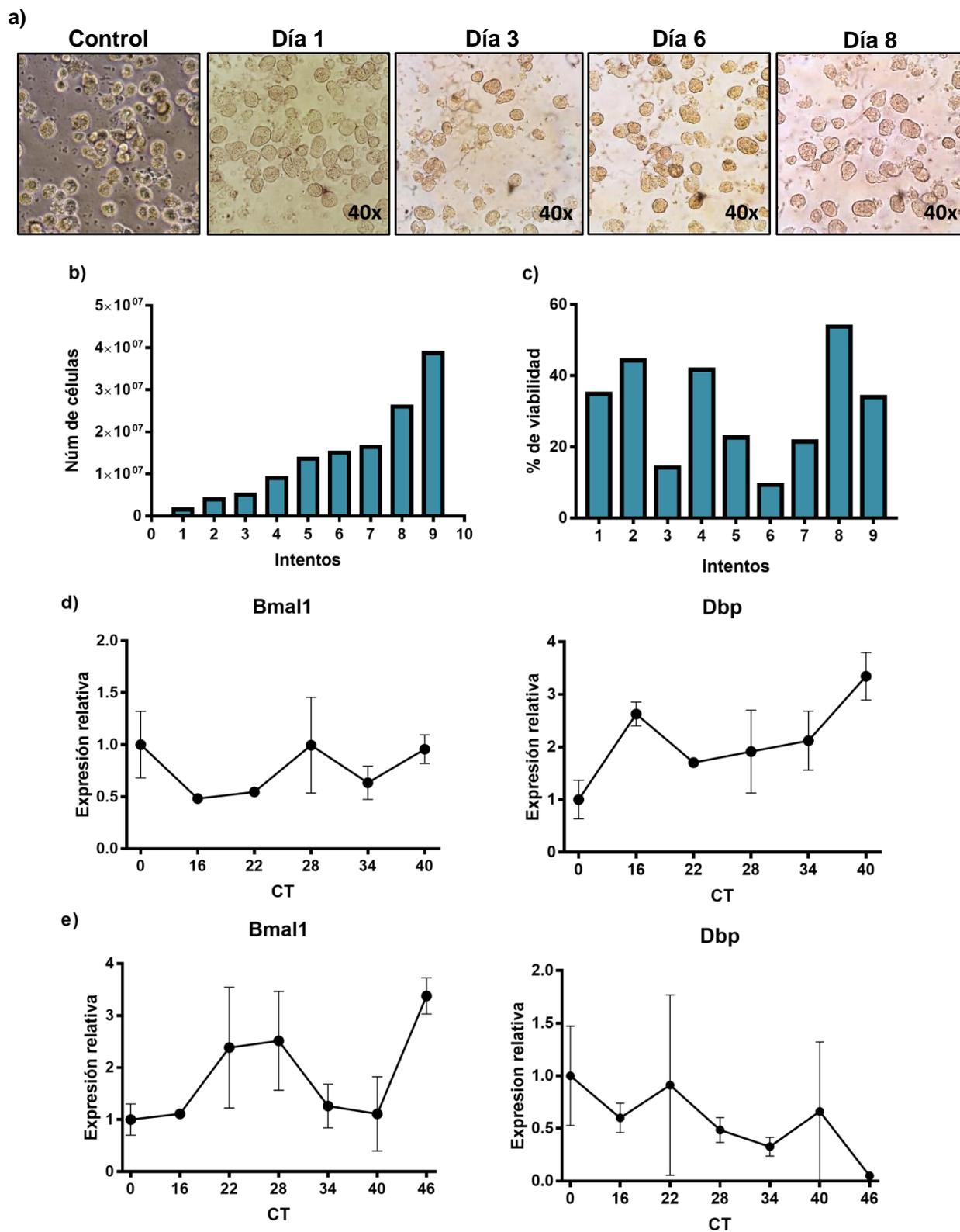


Figura S2: Estandarización de obtención de hepatocitos de ratones

a) Fotografías representativas de crecimiento de hepatocitos durante 8 días de seguimiento, b) Rendimiento de células obtenidas por perfusión practicada, c) Viabilidad de células obtenidas por perfusión practicada. d) Perfil de expresión de *Bmal1* y *Dbp* en hepatocitos sincronizados con dexametasona. los resultados son el promedio + SEM (n=2). e) Perfil de expresión de *Bmal1* y *Dbp* en hepatocitos sincronizados con dexametasona, los resultados son el promedio + SEM (n=3). CT = Circadian time. Todos los perfiles se normalizaron con la expresión de *B2m*.