



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**EL RELOJ CIRCADIANO DE LOS ASTROCITOS: RESPUESTAS DEL NÚCLEO
VENTROMEDIAL DEL HIPOTÁLAMO IMPLICADAS EN EL CONTROL DEL
BALANCE ENERGÉTICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. MARMOLEJO GUTIÉRREZ CLARISA ESTEFANIA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. DAVID RICARDO OROZCO SOLÍS
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA, SS

COMITÉ TUTOR:

DRA. VICTORIA EUGENIA CHAGOYA HAZAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM
DR. JEAN LOUIS CHARLI CASALONGA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

Ciudad Universitaria, CD. MX. 2021



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**EL RELOJ CIRCADIANO DE LOS ASTROCITOS: RESPUESTAS DEL NÚCLEO
VENTROMEDIAL DEL HIPOTÁLAMO IMPLICADAS EN EL CONTROL DEL
BALANCE ENERGÉTICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. MARMOLEJO GUTIÉRREZ CLARISA ESTEFANIA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. DAVID RICARDO OROZCO SOLÍS
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA, SS

COMITÉ TUTOR:

DRA. VICTORIA EUGENIA CHAGOYA HAZAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM
DR. JEAN LOUIS CHARLI CASALONGA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

CDMX, NOVIEMBRE, 2021



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/1058/2021

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 9 de agosto de 2021 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** de la estudiante **MARMOLEJO GUTIÉRREZ CLARISA ESTEFANIA** con número de cuenta 310151139 con la tesis titulada "EL RELOJ CIRCADIANO DE LOS ASTROCITOS: RESPUESTAS DEL NUCLEO VENTROMEDIAL DEL HIPOTALAMO IMPLICADAS EN EL CONTROL DEL BALANCE ENERGÉTICO", realizada bajo la dirección del DR. DAVID RICARDO OROZCO SOLÍS, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. CAROLINA ESCOBAR BRIONES
Vocal: DR. EDUARDO MARTÍNEZ MARTÍNEZ
Vocal: DRA. VERÓNICA HAYDÉE LUGO MARTÍNEZ
Vocal: DRA. ANDREA SACHI DÍAZ VILLASEÑOR
Secretario: DRA. VICTORIA EUGENIA CHAGOYA HAZAS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 04 de noviembre de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA

DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos institucionales

Agradezco al programa de Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante mis estudios de maestría con número 848017.

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. David Ricardo Orozco Solís, en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) en el laboratorio de Cronobiología y Metabolismo, a quien agradezco su guía y asesoramiento.

Agradezco a también a los miembros de mi comité tuto: el Dr. Jean Louis Charli Casalonga del Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología (IBT) y a la Dra. Victoria Eugenia Chagoya Hazas del Departamento de Biología Celular y del Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular (IFC).

Agradecimientos

Agradezco a los miembros de mi jurado evaluador: la Dra. Carolina Escobar Briones del Departamento de Anatomía de la Facultad de Medicina UNAM, la Dra. Andrea Sachi Díaz Villaseñor del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas, el Dr. Eduardo Martínez Martínez del Instituto Nacional de Medicina Genómica y la Dra. Verónica Haydée Lugo Martínez del Departamento de Embriología y Genética de la Facultad de Medicina UNAM.

A la Dra. Lucia Mendoza Viveros, Investigadora Posdoctoral del Instituto Nacional de Medicina Genómica y del Instituto de Investigaciones Biomédicas, quien me guio en todos los experimentos realizados en este proyecto.

A la unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, especialmente al responsable de la unidad, el Dr. Víctor Daniel Garzón Cortés, así como a los veterinarios a cargo de las salas 1 y 6, la MVZ Rubí Elizabeth Zavala Gaytán y el MVZ Filipo Paczka, por su apoyo en el cuidado y mantenimiento de los animales.

A la MVZ. Rocío Chávez Trejo, auxiliar de la Facultad de Medicina UNAM de la coordinación del Posgrado en Ciencias Biológicas, por su apoyo en el proceso administrativo.

A la Dra. Lilia Guadalupe Noriega López del Departamento de Fisiología de la Nutrición del INCMNSZ, por su asesoramiento para el uso del equipo de Calorimetría indirecta.

A la Dra. Lorena Aguilar Arnal del Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, por ser parte fundamental del proyecto y permitirme trabajar en su laboratorio.

A mis compañeros del laboratorio en el INMEGEN y en el IIB, y a la Maestra en ciencias Marcia Bustamante Zepeda por su apoyo técnico.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS

ABREVIATURAS

I. RESUMEN	1
II. ABSTRACT	2
III. INTRODUCCIÓN	3
3.1 Ritmos circadianos.....	3
3.1.1 Mecanismo molecular del reloj circadiano	5
3.1.2 Antecedentes en la eliminación de Bmal1	7
3.1.3 Control del metabolismo por el reloj circadiano	9
3.1.4 Consecuencias metabólicas de la disrupción del reloj circadiano.....	10
3.2 Hipotálamo	12
3.2.1 Regulación de la homeostasis energética por el hipotálamo	13
3.2.2 Regulación del comportamiento alimenticio.....	15
3.3 Astrocitos.....	19
3.3.1 Papel de los astrocitos en el balance energético	21
3.3.2 El reloj circadiano de los astrocitos.	22
IV. JUSTIFICACIÓN	24
V. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	24
VI. HIPÓTESIS	24
VII. OBJETIVOS	25
7.1 General	25
7.2 Particulares.....	25
VIII. METODOLOGÍA	26
8.1 Modelo de trabajo	26
8.2 Confirmación del modelo CKO Bmal1-GFAP.	28
8.3 Estrategia nutricional.....	29
8.4 Estrategia experimental	30
8.4.1 Parámetros metabólicos	32
8.4.2 Parámetros de comportamiento circadiano y alimenticio.....	34

8.4.3	Respuesta neuronal a la glucosa mediante expresión de <i>c-Fos</i>	37
8.4.4	Análisis estadístico	38
IX.	RESULTADOS	39
9.1	Confirmación del modelo knockout condicional de <i>Bmal1</i> en astrocitos.....	39
9.2	El modelo knockout del reloj circadiano de los astrocitos inhibe el aumento de peso generado por la dieta alta en grasa	41
9.3	Recuperación de comportamientos circadianos y metabólicos en ratones sin <i>Bmal1</i> en astrocitos.....	51
9.4	Aumento de la respuesta neuronal del VMH a la glucosa en ratones <i>Bmal1</i> cKO HFD	56
X.	DISCUSIÓN	58
XI.	CONCLUSIÓN	72
XII.	RESUMEN GRÁFICO	73
XIII.	PERSPECTIVAS	74
XIV.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
XV.	ANEXOS	81
	ANEXO 1. Composición de la dieta normocalórica e hipercalórica	81
	ANEXO 2. Arribo de saciedad en ratones WT CD, <i>Bmal1</i> cKO CD, WT HFD y <i>Bmal1</i> cKO HFD a dos horas diferentes del día.....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Organización circadiana de los mamíferos.

Figura 2: Organización molecular del reloj circadiano.

Figura 3: Vías homeostáticas del balance energético.

Figura 4: interacción neuronal en la regulación de la homeostasis energética.

Figura 5: Ratas con lesión en el VMH.

Figura 6: Localización y anatomía de los astrocitos.

Figura 7: Esquema de generación de ratones knockout condicionales.

Figura 8: Esquema de la caracterización del fenotipo de balance energético.

Figura 9: Diseño experimental de inmunofluorescencia contra *c-Fos*.

Figura 10: Fotografías representativas de la delección de *Bmal1* en cerebro de ratón.

Figura 11: Peso corporal y consumo de energía de los cuatro grupos de trabajo.

Figura 12: Composición corporal.

Figura 13: Temperatura rectal y temperatura tomada con iButton de los cuatro grupos.

Figura 14: Gasto energético y calorimetría indirecta.

Figura 15: Test de tolerancia a la glucosa.

Figura 16: Test de sensibilidad a la insulina.

Figura 17: Perfil de actividad.

Figura 18: Test de saciedad.

Figura 19: Test de palatabilidad.

Figura 20: Test de depresión.

Figura 21: Activación neuronal en VMH en respuesta a la glucosa.

Figura 22. Modelo knockout de *Bmal1* en astrocitos de todo el cerebro.

ABREVIATURAS

ARC- núcleo arqueado.

BBB- barrera hematoencefálica.

BAT- tejido adiposo pardo.

CCGs- genes controlados por el reloj.

CD- dieta control /dieta normo calórica.

CI- calorimetría indirecta.

DMH- núcleo dorsomedial del hipotálamo.

DIO- obesidad inducida por la dieta.

EE- gasto energético.

FST- prueba de nado forzado.

GE- neuronas excitadas por glucosa.

GFAP- proteína ácida fibrilar glial.

GI- neuronas inhibidas por glucosa.

HFD- dieta alta en grasa.

HHA- hipotálamo-hipofisis-adrenal.

i.p.- intraperitoneal.

LH- núcleo lateral del hipotálamo.

L/D- luz-oscuridad.

PVH- núcleo paraventricular del hipotálamo.

RER- relación de intercambio respiratorio.

RHT- tracto retino-hipotalámico.

SCN- núcleo supraquiasmático.

SF1- factor esteroideogénico 1.

SNS- sistema nervioso simpático.

UCP1- proteína desacoplante 1.

VMH- núcleo ventromedial del hipotálamo.

WAT- tejido adiposo blanco.

I. RESUMEN

La rápida industrialización ha impuesto cambios en los estilos de vida de las personas. Algunos de estos cambios en los hábitos alteran los ritmos circadianos, de los cuales incluyen la alteración de los ciclos sueño-vigilia, en los horarios de alimentación, el tipo de alimentación, etc. Con ello un aumento de los trastornos metabólicos incluidas la obesidad (surgida del desequilibrio entre la ingesta de alimentos, el metabolismo basal y el gasto energético), y las alteraciones en el metabolismo de la glucosa y los ácidos grasos.

Los ritmos circadianos son ciclos con duración aproximada de 24 horas, que gobiernan una amplia variedad de funciones conductuales, fisiológicas y metabólicas. Estos ritmos están controlados mediante un mecanismo de retrocontrol transcripcional-traducciona, en el cual los activadores transcripcionales BMAL1 y CLOCK, junto con los represores PER1-2 y CRY1-3, inducen la transcripción circadiana de cientos de genes.

Por otro lado, el núcleo supraquiasmático (SNC) del hipotálamo es considerado el reloj central, el cual es capaz de sincronizar distintos osciladores que se encuentran en otras regiones del cerebro y tejidos periféricos. El hipotálamo a través del núcleo ventromedial (VMH), el núcleo lateral (LH) y el núcleo arqueado (ARC) (entre otros), detecta hormonas nutricionales y hormonas de tejidos periféricos, generando respuestas metabólicas y de comportamiento, regulando la homeostasis energética. Importante el VMH ha sido considerado desde hace mucho tiempo como el “centro de saciedad” por su capacidad de inhibir la hiperfagia y por lo tanto la obesidad, cuando su funcionamiento es correcto.

Los astrocitos son un tipo de células gliales que además de conferir soporte metabólico a las neuronas son capaces de modular su activación mediante gliotransmisión. Dentro del hipotálamo, estas células juegan un papel muy importante en la regulación del metabolismo periférico, mediante detección de nutrientes y hormonas, modulando a las neuronas hipotalámicas y generando respuestas metabólicas y de comportamiento.

En este trabajo se exploró el papel que juega el reloj circadiano de los astrocitos en el control del metabolismo. Para ello utilizamos un modelo de ratón knockout que no contiene BMAL1 únicamente en los astrocitos (cKO). Con estos ratones, analizamos los efectos de la eliminación de BMAL1 tanto en aspectos fisiológicos como conductuales y en respuesta a un aporte nutricional alto en calorías. Los resultados muestran una notable mejora en respuesta a la dieta alta en grasa en los ratones cKO, los cuales mantuvieron un peso corporal inferior que los ratones controles. Este efecto fue debido a un aumento en el gasto energético, un aumento en la oxidación de lípidos, un aumento de la temperatura corporal, así como un mejor control en el metabolismo de glucosa. En cuanto al aspecto del comportamiento, los ratones cKO mostraron un aumento en el consumo de alimento después de un ayuno, indicando posiblemente un retraso en la saciedad; además este mismo grupo mostró una disminución en el consumo de alimentos altamente palatable ad-libitum, así como una reducción en el comportamiento depresivo, lo que se encuentra altamente relacionado con la disminución de la obesidad. Aunado a eso, logramos observar que las neuronas del área dorsomedial del VMH en el grupo cKO HFD se activan más en respuesta a la glucosa que en el grupo Wild Type (WT) HFD, lo cual se asocia con el mejoramiento en el metabolismo de glúcidos en dichos ratones.

Concluimos que, aparentemente la ausencia de BMAL1 en los astrocitos genera protección contra la inducción de problemas metabólicos por el consumo de dieta hipercalórica, mediante el aumento del gasto energético, la temperatura y un mejor control en el metabolismo de glúcidos y ácidos grasos.

II. ABSTRACT

Rapid industrialization has imposed changes in people's lifestyles. Some of these changes in habits alter the circadian rhythms, which include the alteration of the sleep-wake cycles, the feeding schedules, the type of feeding, etc. With this, an increase in metabolic disorders including obesity (arising from the imbalance between food intake, basal metabolism, and energy expenditure), and alterations in the metabolism of glucose and fatty acids.

Circadian rhythms are cycles lasting approximately 24 hours, governing a wide variety of behavioural, physiological, and metabolic functions. These rhythms are controlled by a transcriptional-translational recontrol mechanism, in which the transcriptional activators BMAL1 and CLOCK, together with the repressors PER1-2 and CRY1-3, induce the circadian transcription of hundreds of genes.

On the other hand, the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus is considered the central clock, which can synchronize different oscillators found in other regions of the brain and peripheral tissues. The hypothalamus through the ventromedial nucleus (VMH), the lateral nucleus (LH), and the arcuate nucleus (ARC) (among others) detects nutritional hormones and hormones of peripheral tissues, generating metabolic and behavioural responses, regulating energy homeostasis. Importantly, VMH has long been considered the "satiety centre" due to its ability to inhibit hyperphagia and therefore obesity when its function is correct.

Astrocytes are a type of glial cells that, in addition to conferring metabolic support to neurons, can modulate their activation through gliotransmission. Within the hypothalamus, these cells play a very important role in the regulation of peripheral metabolism, by detecting nutrients and hormones, modulating hypothalamic neurons, and generating metabolic, and behavioural responses.

In this work, the role that the circadian clock of astrocytes plays in controlling metabolism was explored. For this we used a knockout mouse model that does not contain BMAL1 only in astrocytes (cKO). With these mice, we analysed the effects of BMAL1 elimination both in physiological and behavioural aspects and in response to a high-calorie nutritional intake. The results show a marked improvement in response to the high-fat diet in the cKO mice, which maintained a lower body weight than the control mice. This effect was due to an increase in energy expenditure, an increase in lipid oxidation, an increase in body temperature, as well as better control of glucose metabolism. Regarding the behavioural aspect, the cKO mice showed an increase in food consumption after fast, possibly indicating a delay in satiety. Furthermore, this same group showed a decrease in the consumption of highly palatable food ad-libitum, as well as a reduction in depressive behaviour, which is highly related to decrease in obesity. In addition to this, we were able to observe that neurons in the dorsomedial area of VMH in the cKO HFD group area activated more in response to glucose than in the Wild Type (WT) HFD group, which is associated with an improvement in carbohydrate metabolism in these mice.

We conclude that apparently, the absence of BMAL1 in astrocytes generates protection against the induction of metabolic problems due to the consumption of a hypercaloric diet, by increasing energy expenditure, temperature, and better control of carbohydrate and fatty acid metabolism.

III. INTRODUCCIÓN

3.1 Ritmos circadianos

Los ritmos circadianos son procesos biológicos que muestran oscilaciones endógenas de aproximadamente 24 horas provocados por la rotación de la Tierra sobre su propio eje. Estos ritmos se encuentran regulados por tres componentes: el reloj circadiano, un mecanismo de entrada que permite que el reloj se reinicie mediante estímulos ambientales y un mecanismo de salida que transmite e impone la señal temporal a los procesos fisiológicos y conductuales [1, 2]. El comportamiento alimentario, los cambios de temperatura, el metabolismo de lípidos y carbohidratos, así como el control de la presión arterial son sólo algunos ejemplos de los procesos fisiológicos sujetos a variación diaria [3].

En los mamíferos, el marcapasos maestro o reloj central, se encuentra en el núcleo supraquiasmático (SCN) en el hipotálamo anterior, que está compuesto por aproximadamente 20,000 neuronas las cuales en conjunto forman al oscilador necesario para generar salidas circadianas que sincronizan los ritmos de los relojes periféricos con el ciclo día-noche garantizando una fisiología coordinada [4]. El SCN a pesar de oscilar de manera endógena por medio del reloj molecular, es sincronizado diariamente por el ciclo luz/oscuridad que es una señal ambiental denominada “*zeitgeber*”. Las neuronas retinianas reciben y traducen la información luminosa y la transfieren a través del tracto retino-hipotalámico (RHT) hasta el SCN, con la cual se sincronizará con el ciclo externo de luz/oscuridad [5, 6]. Esta información temporal será luego transmitida a los tejidos periféricos (hígado, páncreas, riñón, etc.), por medio de señales conductuales, autónomas y neuroendocrinas (por ejemplo corticoesteroides o melatonina) para generar una señal sincronizada que alinea las actividades metabólicas y de otro tipo con las condiciones ambientales (Figura 1) [7]. Además, los osciladores periféricos pueden estar conectados entre sí e incluso pueden comunicarse de vuelta al SCN [8].

anticipatorio gobernado por el reloj circadiano endógeno dentro del tejido metabólico y mecanismos de respuesta que reaccionan a factores neuronales, conductuales o endocrinos externos.

3. A nivel celular y molecular, están implicadas muchas vías de señalización intracelular. El mecanismo anticipatorio está controlado por la maquinaria del reloj molecular, que a través de varios factores de transcripción y correguladores, orquesta la expresión génica rítmica de muchas enzimas metabólicas [10].

3.1.1 Mecanismo molecular del reloj circadiano

El mecanismo molecular del reloj circadiano en los mamíferos se basa en un ciclo de retroalimentación transcripcional-traducciona. El ciclo del reloj molecular se inicia por los factores de transcripción CLOCK y BMAL1, que se heterodimerizan e inducen la expresión circadiana de una gran cantidad de genes controlados por el reloj (CCGs) al unirse a las cajas E; por lo tanto, el reloj molecular dirige la expresión de aproximadamente 10-30% de los genes de todos los órganos y tejidos. Entre los CCGs se encuentran los genes que codifican a los genes periodo represor (PER1-3) y el criptocromo (CRY1-2) cuyos productos se acumulan y se translocan al núcleo provocando la inhibición de la transcripción dirigida por CLOCK-BMAL1. Los represores PER y CRY se degradan posteriormente a través del proteosoma con una ritmicidad de 24 horas, lo que permite el inicio de un nuevo ciclo de transcripción (Figura 2) [11].

Además de este circuito central, los receptores nucleares huérfanos ROR y REV-ERB, contribuyen al mecanismo del reloj generando un bucle regulador adicional y hay también una variedad de vías de señalización que influyen en los reguladores del reloj central al inducir varias modificaciones postraduccionales que finalmente conducen a cambios en el control del reloj.

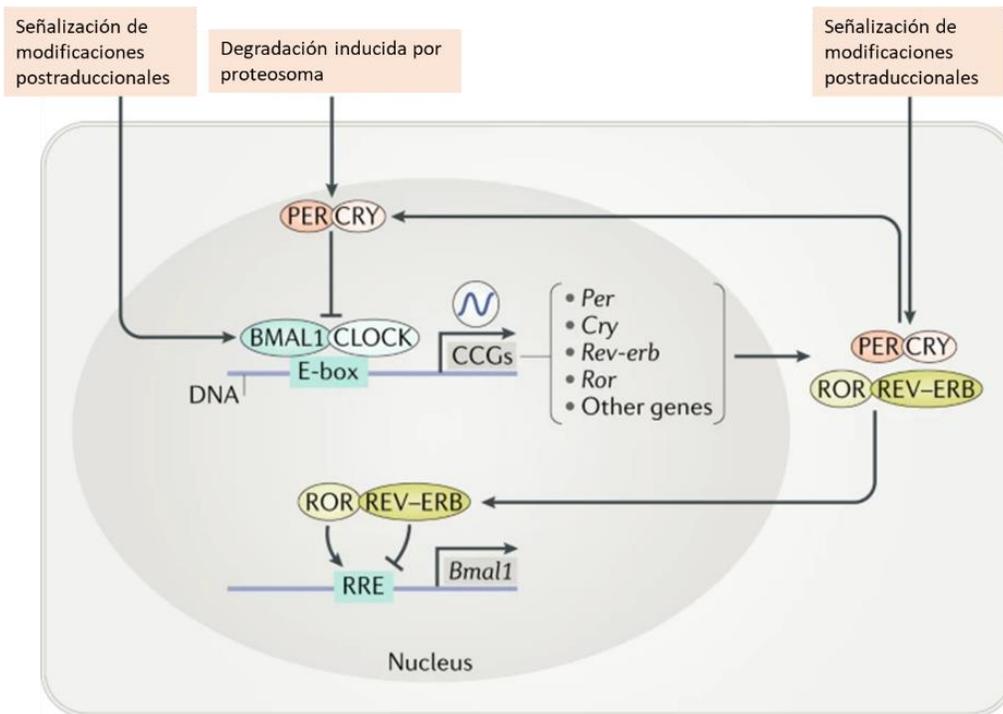


Fig. 2 Organización molecular del reloj circadiano de los mamíferos. El bucle central del reloj molecular está impulsado por los activadores transcripcionales CLOCK y BMAL1 e inhibido por las proteínas PER y CRY (Modificado de Greco & Sassone-Corsi, 2019) [11].

Para producir un sistema de reloj circadiano coherente, los diversos relojes de tejidos y órganos deben mantener una relación de fase constante entre sí para construir un sistema oscilatorio estable que permita una preparación óptima para los eventos recurrentes y predecibles diarios que desafían al organismo. Normalmente, los ritmos circadianos cambian con el envejecimiento, incluido un cambio de fase y una disminución de la amplitud. La alteración de la coordinación circadiana puede manifestarse por desequilibrio hormonal, trastornos psicológicos y del sueño, propensión al cáncer y reducción de la esperanza de vida. Por el contrario, el restablecimiento de los ritmos circadianos ha generado bienestar y una mayor longevidad [12, 13].

3.1.2 Antecedentes en la eliminación de Bmal1

La función del reloj circadiano es importante para la regulación de casi todos los procesos fisiológicos y para mantener el orden temporal. Se ha confirmado que la mutación en los genes canónicos BMAL1 y CLOCK provoca alteraciones de gran alcance en el metabolismo, jugando un papel crítico en los estados fisiopatológicos de la obesidad, diabetes y síndrome metabólico, además de la susceptibilidad al cáncer [14, 15]. Por ejemplo, en humanos, la corta duración del sueño y el tiempo de alimentación alterado están asociados con el desarrollo de desequilibrios metabólicos. En los roedores, la interrupción del reloj también desencadena alteraciones metabólicas [5]; estos resultados enfatizan que tan crítico es el cronometraje diurno normal, desde los niveles moleculares hasta los conductuales para la salud y el bienestar del organismo [15].

Los ratones con mutaciones o alteraciones dirigidas en genes del reloj central, (los cuales se han generado durante la última década) muestran un comportamiento circadiano alterado, así como una desregulación de los patrones circadianos en la expresión génica, que desencadenan a otros defectos patológicos asociados con la disrupción circadiana [16].

Como BMAL1 es un componente central del reloj circadiano, es de esperar que en su ausencia se presenten grandes alteraciones en los procesos fisiológicos, conductuales y metabólicos que coordinan los ritmos circadianos. En múltiples estudios se ha observado entre otras cosas, que la ausencia de BMAL1 en ratones da como resultado una pérdida de los ritmos circadianos, alteración del equilibrio energético, aceleración del envejecimiento y una vida útil más corta; por lo tanto, los modelos mutantes de BMAL1 proporcionan un ejemplo único para conocer el funcionamiento del reloj circadiano (Tabla 1) [17].

Tabla 1. Antecedentes experimentales en ausencia de Bmal1

Modelo	Observaciones	Referencia
Bmal1 ^{-/-} en todo el cuerpo.	Perdida completa del ritmo circadiano en oscuridad constante, actividad total reducida.	Bunger et al., 2000. [2].
Bmal1 ^{-/-} en todo el cuerpo.	Síntomas de envejecimiento prematuro (sarcopenia, cataratas, encogimiento de órganos, etc.).	Kondratov, R. V., et al., 2006 [16].
Bmal1 ^{-/-} en hígado.	Perdida de la expresión rítmica de los genes reguladores de la glucosa hepática; hipoglucemia.	Lamia et al., 2008 [18]
Bmal1 ^{-/-} en páncreas.	Reducción de la secreción de insulina, tolerancia a la glucosa alterada y defectos en el tamaño y proliferación de los islotes pancreáticos.	Marcheva et al., 2010. [19].
Bmal1 ^{-/-} en todo el cuerpo.	Desarrollo de síndrome metabólico.	Shimba et al., 2011 [20].
Bmal1 ^{-/-} en todo el cuerpo.	Aumento de adipogénesis, hipertrofia de adipocitos y obesidad.	Guo B. et al., 2012 [21].
Bmal1 ^{-/-} en tejido adiposo.	Obesidad y cambio en el ritmo de consumo de alimentos.	Paschos et al., 2012 [22].
Bmal1 ^{-/-} en astrocitos (GLAST).	Reducción del tiempo de vida, aumento de peso y tejido adiposo, astrogliosis.	Barca-Mayo, O., et al., 2019 [17].

3.1.3 Control del metabolismo por el reloj circadiano

La importancia adaptativa de los relojes circadianos probablemente radica en su capacidad para permitir respuestas a las variaciones diarias predecibles en el medio ambiente. Los ritmos circadianos normalmente se activan mediante señales ambientales periódicas, siendo el ciclo diario de luz y oscuridad el estímulo más potente en los mamíferos. Se sabe también que las células en los tejidos periféricos contienen osciladores circadianos sensibles a una variedad de señales químicas, a ciclos de temperatura, al ciclo de alimentación y así como al tipo de nutrientes, los cuales son *zeitgebers* dominantes para los osciladores en varios tejidos periféricos. A pesar de eso, se sabe que la alimentación no es un *zeitgeber* que influya en la fase del reloj maestro del SCN [4, 23].

A nivel molecular, muchos de los genes que codifican enzimas metabólicamente importantes están regulados directa o indirectamente por componentes del mecanismo del reloj circadiano. Se ha propuesto que esta sincronización circadiana se logra a través de una cascada transcripcional con el complejo BMAL1-CLOCK que se une a los elementos E-box en los promotores de un gen, induciendo directamente la expresión de otros factores de transcripción que posteriormente son responsables de la mayoría de la expresión rítmica específica de tejido. Los estudios transcripcionales de alto rendimiento revelaron que aproximadamente una décima parte de los genes de mamíferos en varios tipos de células y tejidos exhiben variaciones de 24h en los niveles de RNAm. Estas transcripciones codifican proteínas que controlan procesos como la fosforilación oxidativa mitocondrial, el metabolismo y transporte de carbohidratos, la biogénesis de lípidos y la síntesis y degradación del colesterol [12]. Esto ha sido respaldado por la observación de que muchos factores de transcripción son rítmicos y son blancos directos del complejo BMAL1-CLOCK [14].

Se sabe que la homeostasis de la glucosa y lípidos exhibe variaciones circadianas, además de que las células beta pancreáticas contienen un reloj circadiano que controla la secreción de insulina, lo que probablemente sea importante para preparar al

organismo para la ingesta diaria predecible de alimentos y un aumento de la glucosa en sangre. Por lo tanto, parece que la respuesta de un organismo a la glucosa está orquestada por el reloj circadiano al proporcionar una ventana de tiempo específica durante la cual la secreción de insulina es óptima y por lo tanto, más eficiente, reduciendo los efectos contraproducentes que se puedan crear por el exceso de glucosa [12, 24]. Los principales componentes de la homeostasis energética, incluido el ciclo sueño-vigilia, la termogénesis, la alimentación, el metabolismo de la glucosa y los lípidos, están sujetos a una regulación circadiana que sincroniza la ingesta y el gasto energético con los cambios en el entorno exterior impuestos por la salida y la puesta del sol. El descubrimiento de que los genes del reloj pueden regular la ritmicidad circadiana en otros tejidos centrales y periféricos, incluidos los implicados en la homeostasis de nutrientes (por ejemplo, hipotálamo, hígado, músculo, páncreas), indica que los procesos circadianos y metabólicos están vinculados a nivel sistémico, celular y molecular [15].

3.1.4 Consecuencias metabólicas de la disrupción del reloj circadiano

Los cambios en la disponibilidad y tipo de alimentos, así como en el periodo de luz, son ciclos naturales que cambian todos los días y definen los periodos de sueño y vigilia en los mamíferos, pues durante su fase de actividad, los mamíferos comen, mientras que durante la fase de sueño ayunan [12].

En la actualidad, el número de personas con sobrepeso y obesas en todo el mundo ha aumentado a gran escala. Según la organización mundial de la salud (OMS) en 2016, más de 1,900 millones de adultos tenían sobrepeso, de los cuales más de 650 millones estaban clasificados como clínicamente obesos (WHO, 2020). Dentro de esas estadísticas, México tiene una de las mayores prevalencias de obesidad y sobrepeso infantil en el mundo y más del 70% de los adultos tienen sobrepeso (PAHO. 2020). De

acuerdo con estas estadísticas, la obesidad es uno de los principales problemas de salud pública y es por lo tanto un importante contribuyente a la carga global de las enfermedades crónicas, incluidas las enfermedades cardiovasculares, la enfermedad del hígado graso no alcohólico, la diabetes tipo 2 y ciertos tipos de cáncer [25].

El incremento en la morbilidad en estas enfermedades se ha asociado a cambios en los hábitos sociales, pues la aceleración en la industrialización y urbanización han impuesto cambios en el estilo de vida. En la sociedad moderna, los individuos a menudo ignoran el ciclo de luz/oscuridad y deciden alimentarse tanto en el día como en la noche; en muchos casos, incluso se invierte la naturaleza diurna, estando sólo activos y alimentándose durante la noche [26]. Estas alteraciones de conducta aunadas al contenido de la dieta, la disponibilidad de la comida rápida, la inactividad y los factores socioculturales, se han implicado en la aparición de trastornos metabólicos que alteran los ritmos de comportamiento y la expresión circadiana de los genes que controlan la utilización de combustible en el hipotálamo, el hígado, el tejido adiposo, etc., colocándolos como un desafío importante para la salud pública [24, 27].

Como se mencionó, los trastornos metabólicos, incluida la obesidad y la diabetes tipo 2, han alcanzado niveles pandémicos en las sociedades modernas. Se ha asumido que la etiología subyacente a las enfermedades metabólicas es un desequilibrio entre la ingesta total de calorías y el gasto energético total. Sin embargo, estudios recientes han sugerido que el patrón temporal de la ingesta de calorías juega un papel fundamental en la patogenia de los trastornos metabólicos. Por ejemplo, se ha observado en roedores nocturnos, como en ratas y ratones, que restringir la alimentación exclusivamente a la fase activa, elimina casi por completo la alteración metabólica inducida por una dieta alta en grasas sin cambiar la ingesta total de calorías; por el contrario, restringir la alimentación exclusivamente a la fase de sueño normal, alteró el metabolismo de los animales y se observó una inversión completa de la fase de la expresión génica en tejidos como hígado, riñón, corazón y páncreas [8, 10]. Esto demuestra la importancia de los alimentos como una señal para el control circadiano. Por lo tanto, es de esperar

que la composición de la dieta, el tamaño y el momento de un alimento, interactúen de manera diferencial con una regulación circadiana del metabolismo [24].

Se ha descubierto también que la alteración de los ritmos circadianos en los roedores puede conducir a síntomas depresivos, ansiedad y anhedonia, expresados por una ingesta reducida de sacarosa, patrones alterados de ingesta de alimentos y altos niveles plasmáticos de corticosterona, lo que indica que la sincronización de los ritmos circadianos es necesaria para una integridad fisiológica y conductual [28]. En los seres humanos, uno de los aspectos rítmicos más pronunciados de la fisiología implica la variación diaria de la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina durante las 24 horas del día; por lo tanto, un sistema circadiano disfuncional es un factor de riesgo equivalente a una mala alimentación para provocar aumento de peso y obesidad. Por esta razón es tan importante el estudio de las vías metabólicas reguladas por los ritmos circadianos [12, 15, 19].

3.2 Hipotálamo

El hipotálamo es un conjunto de núcleos heterogéneos interconectados, que, aunque sólo representa ~3% del tejido cerebral, tiene control directo sobre las funciones homeostáticas esenciales y los estados conductuales primitivos. Esta área del cerebro se puede dividir fácilmente a partir de la expresión génica, la función, o los límites anatómicos clásicos [29]. Los núcleos relacionados con las funciones metabólicas, del hambre y saciedad, que incluyen al núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH), el núcleo dorsomedial del hipotálamo (DMH), el núcleo arqueado (ARC), el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVH) y el núcleo lateral del hipotálamo (LH), controlan numerosos procesos fisiológicos que exhiben ritmicidad diurna, incluyendo ciclos de sueño-vigilia, gasto energético, termorregulación, metabolismo de glucosa y lípidos y comportamiento alimentario. Dicho control se logra mediante el ajuste de la ingesta de

nutrientes, donde diferentes hormonas metabólicas y mensajeros forman un complejo sistema de retroalimentación reguladora que informa a los circuitos hipotalámicos sobre el estado de energía periférico [30, 31]. Las señales de salida central se transmiten a los tejidos periféricos a través del sistema nervioso simpático (SNS), así como a través de factores humorales, regulando así el metabolismo periférico y la homeostasis energética [11].

3.2.1 Regulación de la homeostasis energética por el hipotálamo

El control de la homeostasis del metabolismo se establece mediante un equilibrio en la secreción de péptidos orexigénicos (estimuladores de la ingesta de alimentos e inhibidores del gasto de energía corporal) y péptidos anorexigénicos (inhibidores de la ingesta de alimentos y estimuladores del gasto de energía corporal). Estas señales metabólicas acceden al cerebro a través del suministro de sangre, modulando la respuesta neuronal de acuerdo con el estado nutricional y la demanda de energía corporal [32].

Este control neuroendocrino del equilibrio energético orquestado por el hipotálamo comprende tres ramas principales:

La primera rama, consta de señales aferentes del SNC. El VMH y ARC contienen neuronas de primer orden con receptores hormonales que reciben señales periféricas relacionadas con la adiposidad (leptina), el metabolismo (insulina), el hambre (ghrelina) y la saciedad (péptido YY₃₋₃₆). La segunda rama consta de neuronas de segundo orden, que transducen estas señales hormonales al PVH y al área hipotalámica lateral. Estas señales son anorexigénicas (hormona estimulante de los melanocitos α (MSH α) y transcripto regulado por cocaína y anfetamina (CART)) u orexigénicas (neuropéptido Y (NPY) y proteína relacionada con Agoutí (AGRP)). El PVH y el LH integran estas señales a través del receptor de melanocortina 4 (MC4-R) para regular la ingesta calórica y el gasto energético. La tercera rama consta de señales eferentes a

través del sistema nervioso autónomo y del sistema neuroendocrino. El SNS promueve el gasto de energía, mientras que el nervio vago promueve el almacenamiento de energía (Figura 3) [33].

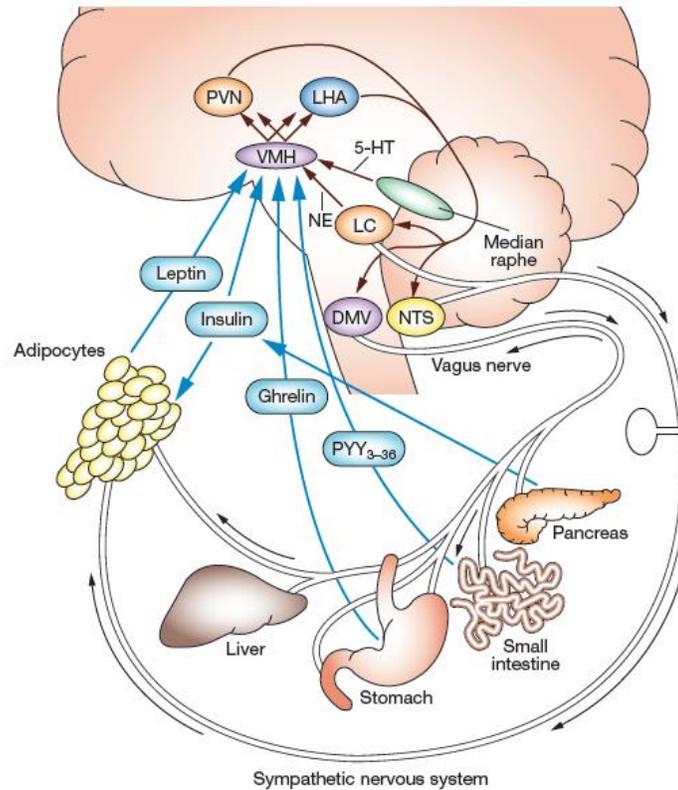


Fig. 3 Vías homeostáticas del balance energético. Las hormonas insulina, leptina, ghrelina y péptido YY3-36 proporcionan información aferente (azul) al hipotálamo ventromedial (VMH), relacionada con el metabolismo y la suficiencia energética. A partir de ahí, el VMH provoca señales orexigénicas y anorexigénicas (café) en el LH y PVN. Estas señales conducen a una salida eferente (blanco) que activa el SNS y hace que los adipocitos se sometan a lipólisis, o a través de la activación del nervio vago que provoca el almacenamiento de energía, aumentando la secreción de insulina pancreática y la sensibilidad del tejido adiposo a la insulina (Tomado de Lusting, R.H., 2006) [33].

3.2.2 Regulación del comportamiento alimenticio.

La orquestación óptima de estados de comportamiento complejos como la búsqueda y el consumo de alimentos es fundamental para la supervivencia de un organismo y, por lo tanto, está sujeta a una intensa regulación por parte de los sistemas homeostáticos del cerebro. Se sabe que la leptina, la insulina y la ghrelina actúan sobre los sistemas cerebrales que utilizan el neuropéptido Y (NPY), el péptido relacionado con Agoutí (AgRP) en las neuronas orexigénicas y propiomelanocortina (POMC)/ transcripto regulado por anfetamina y cocaína (CART) de las neuronas anorexigénicas [34, 35].

En los mamíferos, mantener una alta tasa metabólica requiere una disponibilidad constante de grandes cantidades de reservas energéticas, para asegurar que esta actividad tenga una alta prioridad en la función cerebral. Los cerebros de mamíferos han desarrollado varios sistemas neuronales potentes e interrelacionados que impulsan el comportamiento de alimentación, siendo la naturaleza gratificante o valor hedónico uno de los impulsos más potentes en los cuales participan otros circuitos extra-hipotalámicos del sistema mesolímbico dopaminérgico [35, 36]. Estos circuitos interactúan con los circuitos hipotalámicos encargados de recibir señales hormonales y nutricionales para generar una respuesta homeostática de acuerdo a las necesidades energéticas del organismo [35].

Sistema de melanocortina

El ARC está compuesto por dos poblaciones neuronales funcionalmente antagonistas, a saber, las orexigénicas AgRP/NPY y las anorexigénicas POMC/CART. De acuerdo con el estado nutricional del cuerpo, la leptina y la insulina se secretan del tejido adiposo y del páncreas respectivamente. Estas hormonas secretadas fluyen a través del torrente sanguíneo y atraviesan la barrera hematoencefálica (BBB) y se unen a los receptores de leptina e insulina presentes en las neuronas AgRP/NPY y POMC/CART [30].

En respuesta a las señales de alimentación, es decir detección de insulina o leptina, las respuestas de los circuitos hipotalámicos son los siguientes:

- Insulina: al unirse la insulina al receptor de insulina (IR), activa la vía de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), inhibiendo al factor de transcripción FoxO1, el cual activa al promotor de AgRP y reprime al promotor de POMC induciendo una respuesta anorexigénica.
- Leptina: la unión de leptina al receptor de leptina (ObR/LepR) activa la vía de transductores de señal y activadores de transcripción de Janus quinasa (JAK-STAT), lo que lleva a la activación del factor de transcripción STAT3 y a la posterior expresión del gen POMC. El procesamiento del POMC lleva a la producción y liberación de su forma activa, la hormona estimulante de los melanocitos α (MSH α), la cual al igual que la insulina, induce una respuesta anorexigénica.

En el VMH, las neuronas del factor esteroideogénico-1 (SF-1) están también involucradas en la regulación de la homeostasis energética; estas neuronas glutamatérgicas proyectan hacia las neuronas POMC/CART del ARC y consecuentemente aumentan su actividad, mejorando así la acción anorexigénica de dichas neuronas.

Tras la liberación de MSH α de las neuronas POMC/CART en respuesta a la ingesta de alimentos, se activan los receptores de melanocortina 3 y 4 (MC3/4R) en las neuronas del PVH y se activan hormonas anorexigénica y termogénicas como la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) y la hormona liberadora de corticotropina (CRH), cuya secreción inhibe la ingesta de alimentos y aumenta el gasto energético. Por el contrario, durante el ayuno, las neuronas del LH son estimuladas predominantemente por las neuronas AgRP/NPY, secretan orexina y la hormona concentradora de melanina (MCH) [30], promoviendo la búsqueda de alimento y una disminución del gasto energético.

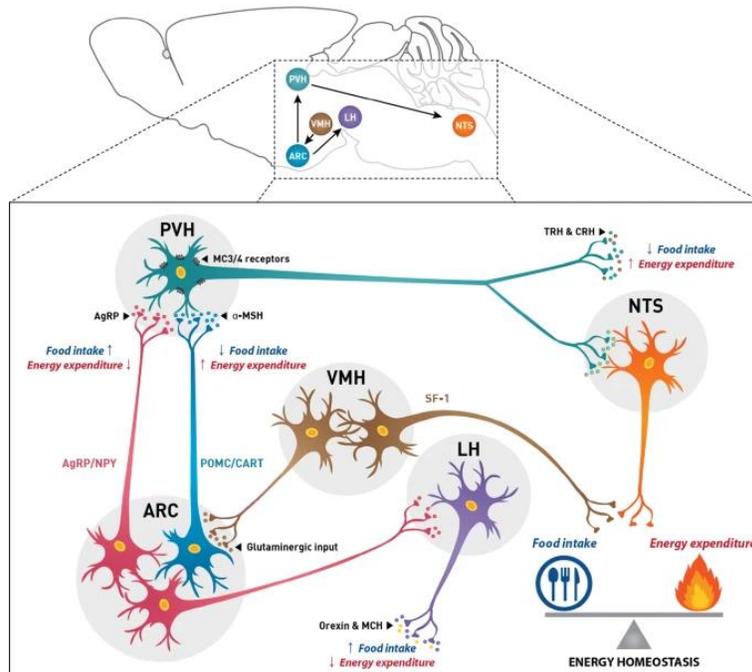


Fig. 4 Interacción neuronal hipotalámica en la regulación de la homeostasis energética y el comportamiento alimenticio. De acuerdo con el estado nutricional del cuerpo, actuarán las diferentes neuronas ubicadas en los distintos núcleos hipotalámicos. (Tomado de Seong, J., et al., 2019) [30].

La destrucción del VMH, PVH o DMH produce obesidad, mientras que la ablación del LH produce anorexia. A nivel molecular, el sistema de melanocortina juega un papel importante en el control neuronal de la homeostasis energética [13].

VMH

Dentro de los núcleos hipotalámicos, el núcleo ventromedial ha sido considerado como un “centro de saciedad” ya que desde los años 40’s, investigadores encontraron que las lesiones en esta área del hipotálamo resultaban en hiperfagia y obesidad en gran variedad de especies incluidos los humanos. Las ratas con lesiones en el VMH fueron descritas como “voraces” y hambrientas” durante los primeros días de la cirugía, ya que comían de dos a tres veces más alimento de lo normal, comiendo incluso por varias horas después de la lesión (Figura 5). Sin embargo, se observó también que las ratas

con daño en el VMH tienen alteraciones en su ciclo de alimentación; en condiciones normales una rata consume la mayor parte de su ingesta diaria de alimentos por la noche, pero en las ratas lesionadas, hay un gran aumento de la ingesta de alimentos durante el día [37, 38].



Fig. 5 Ratas con lesiones en el VMH. Las ratas con lesiones en el VMH llegan a duplicar su peso en 30 días, aumentando 10g al día en promedio.

El VMH, es también un sitio efector de la acción de la leptina y la insulina en el control de la homeostasis energética. Se ha detectado que los ratones con delección del receptor de insulina en las neuronas SF-1 (que son neuronas ubicadas específicamente en el VMH), están protegidos de la obesidad inducida por la dieta y del deterioro del metabolismo de la glucosa; además, también con HFD muestran mayor actividad de las neuronas POMC. Estos datos indican que una condición de altos niveles de insulina bajo dieta hipercalórica reduce la actividad de las proyecciones glutamatérgicas hacia las neuronas POMC. Por otro lado, la señalización mejorada del receptor de leptina en las neuronas SF-1 da como resultado una mejor homeostasis de la glucosa y el peso corporal no se ve afectado [39].

Es por eso, que el VMH es un lugar obvio para comenzar a examinar los circuitos hipotalámicos que controlan el metabolismo general, debido al importante papel de esta región en la detección de los niveles de leptina, insulina y glucosa y en los aspectos de la respuesta contrarreguladora a la hipoglicemia [40].

3.3 Astrocitos

Las células gliales son esenciales para las funciones cerebrales, ya que trabajan de forma muy acoplada y sincronizada con las neuronas para asegurar la adquisición, procesamiento y almacenamiento de información permitiendo el mantenimiento de procesos sinápticos eficientes, rápidos y precisos [41, 42].

Durante casi un siglo, la opinión principal fue que las neuronas eran las únicas células responsables de casi todas las funciones complejas del sistema nervioso, mientras que la glía era simplemente células de apoyo relativamente pasivas. Sin embargo, en las últimas décadas se ha visto un cambio importante en la comprensión de las funciones de las células gliales [43].

La glía se divide en tres tipos principales de células: oligodendrocitos, astrocitos y microglía. De estos, los astrocitos son el subtipo más abundante de las células gliales y el más versátil del SNC [42]. Mucha evidencia filogenética y experimental reciente corrobora la idea de que la glía en general y los astrocitos en particular, pueden haber jugado un papel directo en el establecimiento de una función cognitiva superior, mostrando un aumento en la densidad celular de una especie a otra según la etapa evolutiva [41]. Por estas razones, los astrocitos, son ahora considerados participantes de los circuitos y procesamientos del cerebro, mostrando un amplio espectro de funciones a nivel celular, como la formación, maduración y eliminación de sinapsis, homeostasis iónica, eliminación de neurotransmisores, regulación del volumen de espacio extracelular y modulación de la actividad sináptica y la plasticidad [44].

Morfológica y anatómicamente, los astrocitos son células en forma de estrella con múltiples procesos finos que irradian desde el cuerpo celular hasta de los vasos sanguíneos que los pone en contacto directo con otros astrocitos o como envoltura de somas o sinapsis neuronales (Figura 6). Contienen una proteína exclusiva llamada proteína acida fibrilar glial (GFAP) que actúa como un filamento intermedio y se regula

al alza en los astrocitos reactivos, proteína que, además es considerada como el marcador molecular de estas células [45, 46].

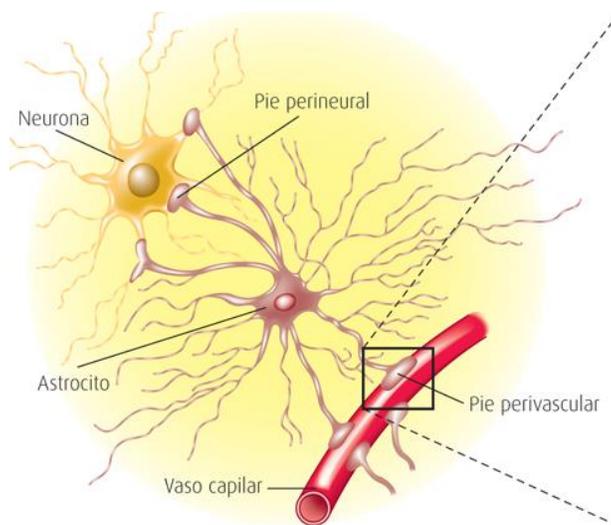


Fig. 6 Localización y anatomía de los astrocitos. Su localización entre los vasos capilares y neuronas los hacen ser receptores y moduladores de los nutrientes que entran al SNC.

Aunque el papel de las células gliales se ha estudiado ampliamente en las enfermedades neurodegenerativas, su función en el desarrollo de enfermedades metabólicas como la obesidad ha pasado a primer plano. Por ejemplo, la inflamación hipotalámica es un proceso importante tanto en el desarrollo como en la perpetuación de la obesidad y los astrocitos son actores fundamentales en estos procesos de inflamación, pues la proximidad de los astrocitos a la BBB, los coloca en la ubicación óptima para monitorear la información metabólica circulante, además de aumentar el control eficiente del estado energético periférico [45, 47].

De hecho, los astrocitos son capaces de responder a niveles locales de nutrientes, actuando como sensores metabólicos, pues expresan una amplia gama de receptores y transportadores específicos, por lo que cualquier signo de disminución del suministro de energía da como resultado el inicio de medidas de producción de energía, incluida la ingesta de alimentos y la movilización de las reservas de energía periférica [45, 47].

3.3.1 Papel de los astrocitos en el balance energético

Las células de la glía representan un objetivo potencial para el tratamiento de la obesidad y los trastornos relacionados con la obesidad, ya que los astrocitos hipotalámicos son capaces de detectar y transportar nutrientes y responder a una serie de neuropéptidos y hormonas metabólicas como la leptina, insulina, glucosa, etc. [48]; además, la producción, entrega y almacenamiento de energía cerebral dependen en gran medida del repertorio astrocítico de receptores, canales, transportadores y enzimas [41, 49].

La glucosa es la principal fuente de energía del cerebro de los mamíferos; su disponibilidad en el SNC es fundamental para la función neuronal y sus niveles en el cerebro regulan la actividad neuronal local y el metabolismo energético en todo el cuerpo. Los astrocitos coordinan activamente su absorción, metabolización y almacenamiento; específicamente los astrocitos hipotalámicos cooperan activamente con neuronas especializadas sensibles a la glucosa en la detección de los niveles de glucosa circulante y la generación de la respuesta metabólica sistémica adecuada. Esto se ha evidenciado experimentalmente al demostrar que la expresión de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT2 en los astrocitos es crítica para la detección de glucosa en el cerebro [41, 50].

También se ha demostrado que la inhibición de la expresión del receptor de leptina en astrocitos reduce la cobertura sináptica de los astrocitos y la posterior alteración de la transmisión sináptica en las neuronas de control de la alimentación que expresan AgRP y POMC. En consecuencia, se conduce a un fenotipo de resistencia a la leptina y a un aumento de la hiperfagia por ayuno o por ghrelina [51]. Otro elegante estudio, demostró que la señalización de insulina en los astrocitos hipotalámicos es necesaria para la detección de glucosa cerebral y la homeostasis sistémica de la glucosa. Los ratones que carecen de señalización de insulina en los astrocitos muestran un aumento de la hiperfagia inducida por el ayuno y una regulación alterada de los niveles de glucosa sistémica en respuesta a la hiperglucemia; además se alteró la activación

inducida por glucosa de las neuronas que expresan POMC [50]. Estos estudios proporcionan evidencias de que los astrocitos llevan a cabo funciones en la homeostasis fisiológica normal y que son importantes reguladores de los circuitos de control metabólico en el hipotálamo [52].

3.3.2 El reloj circadiano de los astrocitos.

Durante mucho tiempo se pensó que las neuronas del SCN eran las únicas células en el cuerpo humano con un reloj intrínseco, pero estudios posteriores demostraron que las neuronas en diferentes regiones del cerebro, la glía y diversos tejidos periféricos también expresan relojes moleculares funcionales. Estos relojes pueden mantener la ritmicidad incluso en ausencia del SCN, aunque las fases de los diferentes tejidos están coordinadas por señales que se originan en el reloj central [53].

Así mismo, un creciente número de evidencias han desafiado la visión neurocéntrica del control del comportamiento en los mamíferos, al mostrar que los astrocitos pueden modular procesos neuronales complejos, incluyendo cognición, miedo, sueño, placer y ritmos circadianos. Por lo tanto, se ha demostrado que los astrocitos del SCN pueden codificar de manera autónoma la información circadiana e instruir a sus parejas neuronales que carezcan de un reloj molecular competente, para iniciar y mantener indefinidamente patrones circadianos de actividad y comportamiento neuronal [54].

Los astrocitos tienen características muy importantes que son cruciales para comprender sus contribuciones funcionales en el sistema de cronometraje para los sistemas metabólicos:

1. Un astrocito puede coordinar la actividad de múltiples conjuntos de sinapsis contiguas mediante la regulación de los niveles de neurotransmisores en la hendidura sináptica, a través del control del espacio extracelular, o mediante la

liberación de señales químicas que modulan activamente la transmisión sináptica (gliotransmisores).

2. Los astrocitos experimentan cambios estructurales y morfológicos para influir en las entradas sinápticas dentro del sistema de melanocortina hipotalámico en respuesta a señales metabólicas (comportamiento de alimentación).
3. El acoplamiento de astrocitos en el SCN es prescindible para la generación del ritmo circadiano (visto en modelos de ratón con delección de conexinas específicas de astrocitos).
4. El intercambio de metabolitos y hormonas a través de la BBB depende de los astrocitos, del estado sueño/vigilia y del reloj circadiano.

IV. JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que los circuitos hipotalámicos juegan un papel central en el control del metabolismo y diversas evidencias también han demostrado la importancia del reloj circadiano en este control metabólico. Sin embargo, aunque se ha demostrado que los astrocitos hipotalámicos son importantes para el control metabólico, se desconoce cuál podría ser el papel del reloj molecular de los astrocitos en el control del metabolismo. Por ello se generó un modelo de ratón con una interrupción del reloj circadiano por ablación de BMAL1 en células que expresan GFAP.

Para determinar los efectos de la ausencia de BMAL1 en los astrocitos en el control del metabolismo, se analizaron distintos aspectos fisiológicos, metabólicos y de comportamiento alimenticio, comportamiento hedónico y comportamiento tipo depresivo bajo dieta normo o hipercalórica a diferentes horas del día para evaluar el efecto circadiano.

V. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el papel de Bmal1 de los astrocitos hipotalámicos en el control del balance energético?

VI. HIPÓTESIS

La ausencia de BMAL1 en los astrocitos desincroniza el reloj molecular de los astrocitos y consecuentemente provoca cambios en las respuestas de la activación neuronal del núcleo ventromedial (entre otros) del hipotálamo, así como cambios en el control del metabolismo energético.

VII. OBJETIVOS

7.1 General

Analizar los efectos de la ausencia de BMAL1 en los astrocitos, en el control del metabolismo energético, así como las respuestas fisiológicas y conductuales en un modelo murino.

7.2 Particulares

- Inducir obesidad mediante la alimentación con dieta hipercalórica en animales WT y Bmal1 cKO en astrocitos.
- Analizar parámetros fisiológicos para identificar el fenotipo de balance energético a diferentes horas del día (ZT4 y ZT16).
- Analizar parámetros metabólicos para identificar el fenotipo de balance energético a diferentes horas del día (ZT4 y ZT16).
- Analizar parámetros de comportamiento para identificar el fenotipo de balance energético a diferentes horas del día (ZT4 y ZT16).
- Aislar el cerebro de ratones a ZT4.
- Observar la respuesta neuronal a la glucosa en el núcleo ventromedial del hipotálamo.

VIII. METODOLOGÍA

8.1 Modelo de trabajo

La cepa de ratón C57BL/6 es utilizada en el laboratorio como modelo para el estudio del metabolismo por ser fácil de examinar fisiológicamente. Además, diferentes estudios han demostrado que la cepa C57BL/6 es susceptible a la obesidad, diabetes tipo 2 y aterosclerosis inducida por la dieta [55, 56]. Se ha probado también el uso de esta cepa en estudios de comportamiento, demostrando ser la mejor opción comparada con otras cepas [57]. Es además una de las cepas más utilizadas para la tecnología de ratones knockout (cKO), debido a que su fondo genético es permisivo para la expresión máxima de la mayoría de las mutaciones [55].

Para este proyecto, se utilizaron ratones macho cKO condicionales, utilizando el sistema de recombinación “*Cre-loxP*” derivado de bacteriófago. La enzima *Cre* es una recombinasa de DNA específica del sitio que reconoce y media la recombinación entre secuencias de 34 pb denominadas sitios *loxP*. Si un segmento de DNA esta flanqueado por dos sitios *loxP* en la misma orientación, *Cre* elimina este segmento de DNA [58] (Figura 7).

Como *Cre* no requiere cofactores o proteínas accesorias para mediar la recombinación de DNA específica de *loxP* y exhibe una actividad optima a 37°C, el sistema *Cre/loxP* es la herramienta de recombinación más utilizada en células y ratones.

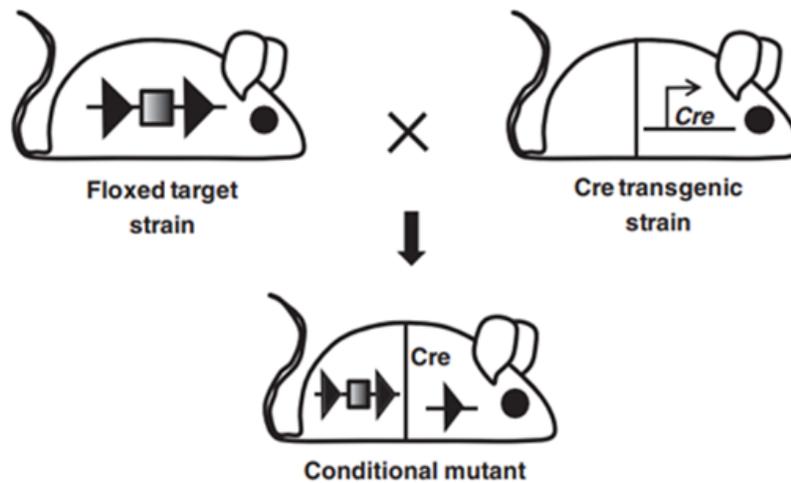


Fig. 7 Esquema de generación de ratones knockout condicionales. Para generar mutantes condicionales, una cepa que alberga un segmento génico flanqueado por *loxP* (alelo floxeado) (arriba a la izquierda) se cruza con ratones que expresan *Cre* recombinasa en un tipo de célula específico (arriba a la derecha). En la descendencia transgénica doble, la inactivación génica ocurre a través de la escisión mediada por *Cre* del segmento génico floxeado dentro del dominio de expresión de *Cre* [59].

Usando el sistema *Cre-loxP*, cruzamos ratones homocigotos para el alelo condicional *Bmal1 loxP/loxP* con ratones que expresan *Cre* recombinasa bajo el control del promotor de la proteína Ácida Fibrilar Glial (gen GFAP), cuya expresión está restringida a células astrogliales. Este gen es usado como marcador para distinguir astrocitos de entre otras células gliales durante el desarrollo (ID GEN NCBI: 2670) (ID HGNC 4235) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2670#>.

Todos los ratones fueron sometidos a un ciclo de luz/oscuridad (12/12h) (exceptuando experimentos donde se indique D/D u oscuridad constante), a temperatura constante de 24°C, con humedad al 44%. El ZT0 está establecido a la hora del encendido de las luces (7am) y el ZT12 a la hora de apagado de las luces (7pm).

8.2 Confirmación del modelo CKO Bmal1-GFAP.

Se llevó a cabo la tinción con inmunofluorescencia:

Los ratones fueron perfundidos con PBS a temperatura ambiente, y subsecuentemente se perfundieron con PFA 4% en PBS frío. Una vez perfundidos completamente, se extrajeron los cerebros y se post-fijaron en PFA por 24h. Transcurridas las 24h, se cambiaron a sacarosa al 30% en PBS (crioprotección) y después se hicieron cortes de 30µm en criostato. Se guardaron a -20°C.

Una vez realizado este proceso, se comenzó con la co-tinción de Bmal1 y GFAP y núcleos. Se realizaron los siguientes pasos:

Tres lavados por cinco minutos con PBST al 0.05%; una hora de bloqueo con 10% suero de caballo en PBST; se mantuvo toda la noche a 4°C en agitación con anticuerpos primarios en solución de bloqueo: (Conejo anti-Bmal1 1:200, Ratón anti GFAP 1:500).

Tres lavados por cinco minutos con PBST, Cinco minutos en DAPI 1:10,000 en PBST (contratinción), Tres lavados por cinco minutos con PBST, Montaje con Dako Fluorescent Mounting médium.

Se procedió a tomar las fotografías en un microscopio de Fluorescencia Olympus BX51, equipado con una lámpara de mercurio y una cámara para captura de imágenes. Se utilizó el programa DP manager para observar las fotografías.

Los criterios de confirmación del modelo cKO fueron: no observar la colocalización de Bmal1 en los núcleos de los astrocitos.

8.3 Estrategia nutricional

Cuatro grupos de 10 ratones macho cada uno (Tabla 2), fueron alimentados con dieta control o dieta obesogénica *ad libitum* a partir de la semana 8 de nacidos; durante las 16 semanas de experimento se monitoreó la ganancia de peso y el consumo de alimento semanal.

Tabla 2. Características nutricionales de los grupos de trabajo

Grupo	Característica
WT CD	Ratones wildtype con dieta control durante 16 semanas.
Bmal1 cKO CD	Ratones Knockout con dieta control durante 16 semanas.
WT HFD	Ratones wildtype con dieta hipercalórica durante 16 semanas.
Bmal1 cKO HFD	Ratones knockout con dieta hipercalórica durante 16 semanas.

Dieta control

ENVIGO Teklad Global 18% Protein Rodent Diet (sterilizable). Es una dieta de fórmula fija, diseñada para mantener gestación, lactancia y crecimiento de roedores. La dieta 2018S es complementada con vitaminas adicionales para garantizar la adecuación nutricional después de su esterilización en autoclave. Es la dieta más comúnmente utilizada para alimentar las colonias de roedores (Anexo 1).

Dieta alta en grasa

DIO Rodent Purified Diet w/60% Energy From Fat- Blue. Es una dieta de Purina TestDiet® utilizada para la investigación en obesidad, diabetes, síndrome metabólico y enfermedades relacionadas. La dieta 58Y1-60% kcal, ha sido utilizada en múltiples estudios para desarrollar fenotipos de ratón obeso (Anexo 1).

Tabla 3. Energía metabolizable calculada en porcentaje de dieta control y dieta alta en grasa.

Densidad energética %kcal/g*	Dieta control	Dieta alta en grasa
Proteínas	24%	18.1%
Grasas	18%	61.6%
Carbohidratos	58%	20.3%

*La densidad energética se refiere a la energía metabolizable, o energía alimentaria disponible para la producción de calor (gasto de energía) y las ganancias corporales [60].

8.4 Estrategia experimental

Tomando en cuenta el papel del hipotálamo y del núcleo ventromedial en la regulación de la homeostasis energética, a partir de la semana 10 se comenzó a caracterizar el fenotipo del balance energético de los cuatro grupos de trabajo mediante parámetros metabólicos y parámetros de comportamiento (Figura 8).

Tabla 4. Semanas de realización de los experimentos para la caracterización del fenotipo de balance energético.

Experimento	Semana que se realizó
Peso corporal	Una vez a la semana durante 16 semanas.
Composición corporal	Semana 10 de experimento.
Ritmo circadiano de temperatura	Semana 15 de experimento.
Gasto energético	Semana 11 de experimento.
Tolerancia a la glucosa	Semana 11 y 14 de experimento.
Sensibilidad a la insulina	Semana 12 y 15 de experimento.
Consumo de alimento circadiano y actimetría	Semana 10 de experimento.
Test de saciedad	Semana 14 de experimento.
Test de palatabilidad	Semana 15 de experimento.
Test de nado forzado	Semana 16 de experimento.
Expresión de <i>c-Fos</i>	Semana 16 de experimento.

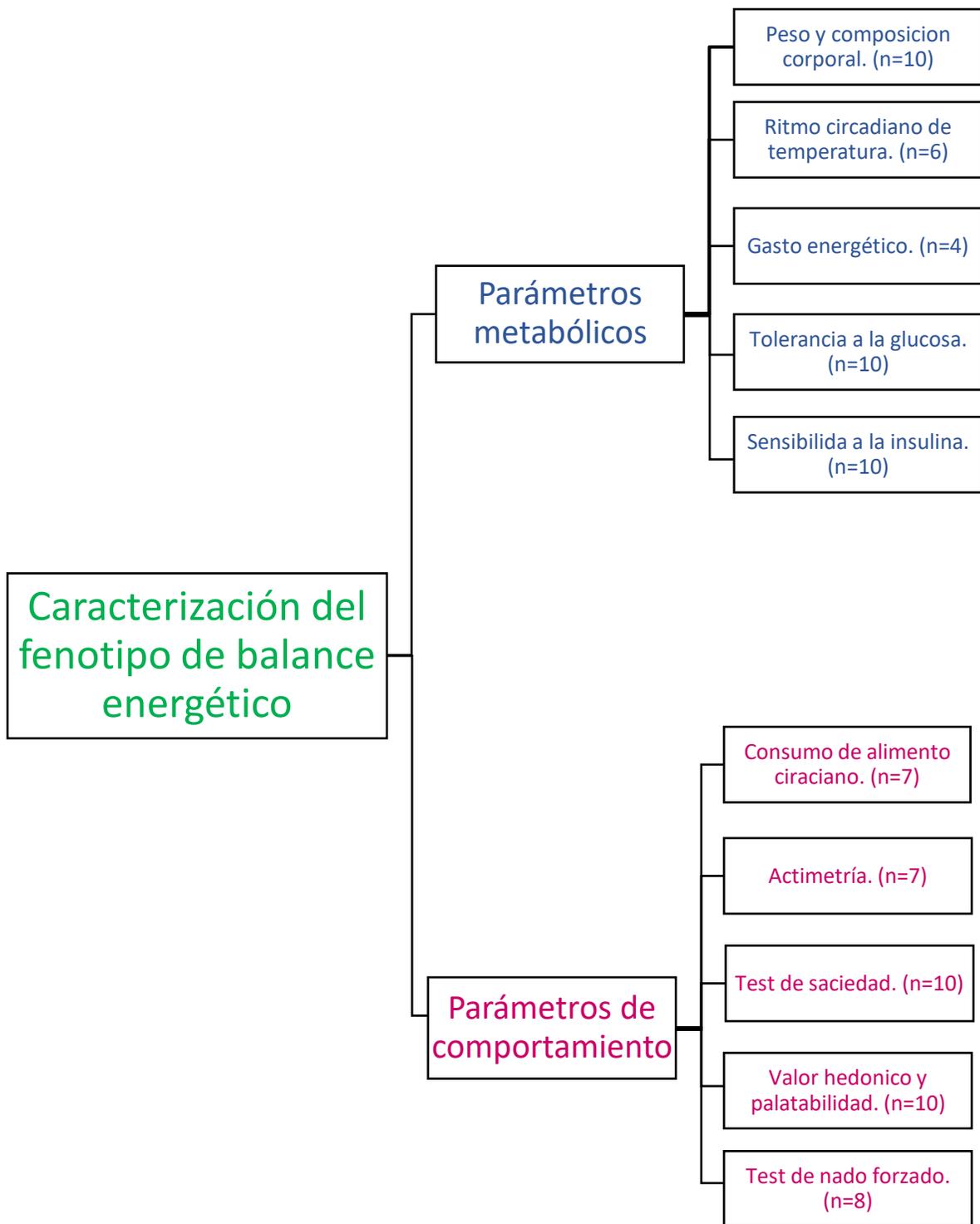


Fig. 8 Esquema de la caracterización del fenotipo de balance energético. Dividiendo experimentos de parámetros metabólicos y experimentos de parámetros de comportamiento.

8.4.1 Parámetros metabólicos

1. Medición de peso corporal y consumo de alimento

A partir de la semana ocho de nacidos, los ratones fueron integrados al experimento; se calculó semanalmente el aumento en el peso corporal y su consumo de alimento.

2. Composición corporal

Para el análisis de composición corporal en ratones se utilizó el equipo EchoMRI™, el cual mide la grasa corporal total y la grasa magra. EchoMRI™ se basa en un instrumento Cuantitativo de Resonancia Magnética Nuclear (QMR), que utiliza un campo magnético de baja intensidad para controlar los átomos de hidrógeno, y por lo tanto es capaz de medir la masa de agua y grasa con notable precisión en animales pequeños. Al detectar diferencias en las características de rotación entre los átomos de hidrogeno en los lípidos y el agua, EchoMRI™ cuantifica la masa de grasa, agua y tejido magro dentro de un sujeto [61], haciendo un Análisis de Composición Corporal (BCA) preciso.

3. Medición de temperatura circadiana

Se hizo la medición de temperatura a través de dos métodos. Primero se determinó la temperatura rectal con un termómetro OAKTON WD-35626-10, con el cual se determinó la temperatura cada 4h, a ZT0, ZT4, ZT8, ZT12, ZT16 y ZT20. Subsecuentemente en la semana 15 de experimento, se midió la temperatura a través de un registrador de temperatura iButton®, el cual registra la temperatura de forma constante almacenando los resultados en su memoria interna. El iButton fue introducido en los ratones en la cavidad peritoneal, dejándoles 5 días de recuperación después la operación. Se tomaron datos de temperatura de 5 días a partir del quinto día de adecuación al dispositivo.

Todos los datos se analizaron mediante el método de cosinor para calcular los parámetros circadianos de periodo, amplitud y acrofase.

4. Gasto energético

Se midió el gasto energético mediante calorimetría indirecta (CI). La calorimetría indirecta es un método mediante el cual el tipo y la tasa de utilización del sustrato, así como el metabolismo energético se estiman in vivo a partir de las mediciones de intercambio de gases. Esta técnica proporciona información única, no es invasiva y se puede combinar con otros métodos experimentales para investigar numerosos aspectos de la asimilación de nutriente, la termogénesis y la patogénesis de enfermedades metabólicas [62].

Esta técnica se basa en medir los intercambios respiratorios en condiciones de alimentación libre en varias jaulas simultáneamente. Se utilizó un Sistema de Monitoreo de Animales de Laboratorio Oxymax (CLAMS. Columbus Instruments). El sistema monitorea la concentración de volumen de gas de oxígeno (O_2) y dióxido de carbono (CO_2) en los puertos de entrada y salida de una cámara parcialmente sellada a través de la cual se ventila a la fuerza un flujo conocido de aire ambiental. Las diferencias de concentración medidas entre los puertos junto con la información de flujo, se utilizan para calcular el consumo de oxígeno (VO_2) y la producción de dióxido de carbono (VCO_2). La relación de intercambio respiratorio (RER) se calcula como VO_2/VCO_2 [63].

El RER es un indicador muy útil del tipo de sustrato que se metaboliza preferentemente en tiempo real. Por ejemplo, durante el metabolismo de carbohidratos, la producción de CO_2 y el consumo de oxígeno del organismo son prácticamente iguales, con $RER=1$. Sin embargo, si el sustrato metabolizado es grasa, el consumo de oxígeno supera la producción de CO_2 generando un RER menor a 1. Este cociente respiratorio puede variar siendo aproximadamente 0.69 para lípidos y 0.82 para proteínas.

5. Prueba de tolerancia a la glucosa

Los ratones fueron restringidos de alimento durante 12 horas previas a la prueba. Pasadas las 12h, se tomó sangre de la punta de la cola para medir la glucosa al tiempo cero (glucómetro Accu-check Active, 06658008001), e inmediatamente se inyectaron 2g/Kg de glucosa de manera intraperitoneal (i.p.). A partir del momento de la inyección, se volvió a tomar sangre a los 15, 30, 60 y 120 minutos post-inyección para medir los niveles de glucosa. Este procedimiento fue realizado a ZT4 y ZT16.

6. Prueba de sensibilidad a la insulina

Los ratones fueron restringidos de alimento durante 4 horas previas a la prueba. Pasadas las 4hrs, se tomó sangre de la cola para medir la glucosa al tiempo cero, e inmediatamente se inyectaron 0.6U/Kg de insulina (Humulin) i.p. A partir del momento de la inyección, se volvió a tomar sangre a los 15, 30, 60 y 120 minutos para medir los niveles de glucosa. Este procedimiento fue realizado a ZT4 y ZT16.

8.4.2 Parámetros de comportamiento circadiano y alimenticio

1. Consumo de alimento circadiano y altimetría

Se alojaron a los ratones en jaulas individuales colocadas en un gabinete aislado OASPAD que puede alojar hasta 12 jaulas. El gabinete esta insonorizado, con suministro de aire, temperatura y luz controlados. Los animales tuvieron acceso *ad libitum* a alimento y agua. Al inicio del experimento se colocaron a los ratones bajo un ciclo de luz: oscuridad (L/D) 12:12, con las luces encendidas a las 7:00 h y las luces apagadas a

las 19:00 h durante 15 días; seguido de esta fase, los ratones fueron puestos en un ciclo de oscuridad constante (D/D) por 15 días más.

El equipo OASPAD contiene sensores para la ingesta de alimento y del movimiento. Los sensores detectaron los movimientos de los animales durante las 24 horas todos los días de duración del experimento. Los eventos de comportamiento se recopilieron con un sistema digitalizado y se almacenaron automáticamente cada minuto en una PC para su posterior análisis. El sistema para el monitoreo y la recopilación de datos fue desarrollado por la empresa biomédica mexicana Omnia SA de CV. El análisis se realizó con un programa basado en Matlab [28] y se utilizó la paquetería Rhythmically de R.

Con los datos se construyeron actogramas con doble trazado para cada animal que representa el número de recuentos de actividad cada 6 minutos durante las dos fases del experimento L/D y D/D.

2. Prueba de saciedad

Para la prueba de saciedad, los ratones fueron restringidos de alimento durante 12hrs previas a la prueba. Al terminar este periodo, se colocaron en cajas individuales y se les colocó alimento mientras se monitoreo el comportamiento de manera continua durante 60 minutos, tomando en cuenta los siguientes parámetros: alimentación, toma de líquido, exploración, acicalado y descanso; ya que los roedores al alimentarse muestran un patrón de comportamiento estereotipado, es decir que al inicio, la mayor parte del tiempo se encuentran consumiendo alimento, y conforme la saciedad arriba, otras actividades como la exploración o acicalamiento toman lugar de manera gradual [64]. Los 60 minutos fueron divididos en periodos de 5 minutos para un mejor análisis. Al final de la prueba se midió el consumo de alimento en gramos y se cuantificaron los minutos que se mantuvieron realizando cada actividad. La prueba se realizó a ZT4 y ZT16.

3. Valor hedónico y palatabilidad

Para probar la palatabilidad los ratones tuvieron acceso a crema de cacahuete en cajas individuales durante un periodo de 60 minutos. Durante ese tiempo se monitoreo el comportamiento de manera continua, tomando en cuenta los siguientes parámetros: alimentación, toma de líquido, exploración, acicalado y descanso. Al final de la prueba se midió el consumo de alimento en gramos y se cuantificaron los minutos que se mantuvieron realizando cada actividad. La prueba se realizó a ZT4 y ZT16.

Para evitar que los efectos del apetito se pudieran confundir con el valor hedónico del alimento, los ratones no fueron sometidos a ayuno, ya que se debe asegurar que los participantes no se encuentren en un estado de déficit energético [65]. Además, se realizó la habituación al alimento durante los tres días previos a la prueba, la cual consistió en colocar durante 60 minutos a los ratones únicamente con crema de cacahuete y agua a ZT4 (es decir, las mismas condiciones que las del experimento).

4. Test de nado forzado

Para medir la depresión en los ratones, se realizó la prueba de nado forzado (FST), que es una de las pruebas más utilizadas para evaluar el comportamiento depresivo en modelos animales. Para la prueba se colocó a los ratones en un cilindro que contiene agua a 25°C del cual no pueden escapar, se mantuvieron durante 8 minutos en el cilindro y fue monitoreado el tiempo de inmovilidad, que típicamente se caracteriza por flotar en el agua con solo los movimientos necesarios para mantener la nariz sobre la superficie, y el tiempo de movimiento activo, que son: escalada (movimientos verticales contra la pared) y natación (movimientos horizontales a través de la superficie del agua) [66]. Para el análisis se tomaron en cuenta únicamente los últimos cinco minutos de la prueba. La prueba se realizó a ZT4 y ZT16.

8.4.3 Respuesta neuronal a la glucosa mediante expresión de *c-Fos*

Para observar la activación neuronal en el VMH, se procedió a realizar inmunofluorescencia contra *c-Fos* en rebanadas de cerebro, para lo cual previamente se realizaron los siguientes experimentos esquematizados en la figura 9: se hizo privación de alimento al ZT0, transcurridas cuatro horas (ZT4), se procedió a inyectar glucosa (2mg/Kg) (cada ratón espaciado por 10min).

Pasadas dos horas después de la inyección (ZT6), se realizó la eutanasia de los animales con 200µL de pentobarbital y se perfundieron con 10mL de PBS a temperatura ambiente y 10mL de PFA al 4%. Posteriormente, se post-fijaron los cerebros en PFA 4% a 4°C por 24h, pasadas las 24h, se cambiaron a sacarosa al 30%.

Una vez obtenidos los cerebros de todos los grupos se realizaron cortes de 30µm en criostato y después se llevó a cabo la tinción con inmunofluorescencia para *c-Fos*.

Se realizaron los siguientes pasos:

Se procesaron secciones de cerebro que contenían el hipotálamo en placas de cultivo celular de 24 pocillos en condiciones de flotación libre.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-GFAP de ratón (2E1) (1:300, Santa Cruz Biotechnology sc-33673), anti-BMAL1 de conejo (1:2000, Novus NB100-2288) y anti-cFos de conejo (1:10000, Merck Millipore ABE457).

Para la tinción GFAP/BMAL1, se lavaron en PBS-Triton 0.05% (PBS-T), se bloquearon durante una hora a temperatura ambiente con BSA al 3% en PBS-T y se incubaron durante la noche con ambos anticuerpos primarios diluidos en tampón de bloqueo a 4°C con suave agitación. A continuación, se lavaron con PBS-T y se incubaron con Alexa Fluor 488 cabra anti-ratón (1:1000, Invitrogen) y Alexa Fluor 594 cabra anti-conejo (1:1000, Invitrogen), durante 2 horas a temperatura ambiente, protegidas de la luz. Después de lavar con PBS-T, los núcleos se contratiñeron con DAPI (0.1µg/mL de BPS, Thermo Fisher Scientific) durante 5 minutos, se lavaron con PBS y se montaron en

portaobjetos de microscopio utilizando medio de montaje anti-desvanecimiento Vectashield (Vector Laboratories, H-1000).

Para la tinción de *c-Fos*, las secciones se lavaron con PBS-T, se bloquearon durante una hora y se incubaron durante 48 horas con anticuerpo primario a 4°C. Posteriormente se lavaron con PBS-T, se incubaron con Alexa Fluor 594 cabra anti-conejo (1:1000) durante dos horas a temperatura ambiente, se lavaron con PBS-T, se contratiñeron con DAPI durante 5 minutos, se aclararon con PBS y se montaron en portaobjetos de microscopio.

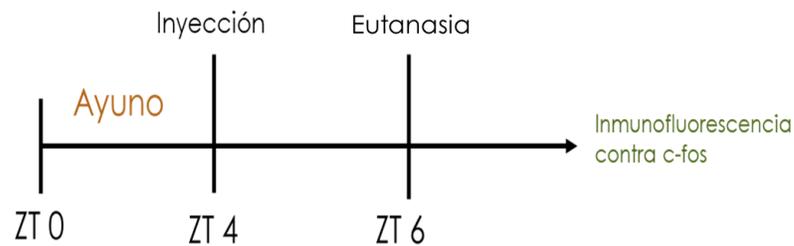


Fig. 9 Diseño del experimento de inmunofluorescencia contra *c-Fos*. Se inicio al ZT0 un ayuno que se extendió por 4 horas hasta el ZT4 cuando se inyectó glucosa i.p., dos horas después se realizó la eutanasia de los animales, se perfundieron para extraer cerebro y posteriormente se realizó inmunofluorescencia contra *c-Fos* en rebanadas de cerebro donde se ubica en VMH.

8.4.4 Análisis estadístico

Los parámetros estadísticos que incluyen las medias (media \pm SEM) y la significancia estadística se informan en las figuras y leyendas de las figuras. Se realizaron pruebas ANOVA de dos vías y test de Tukey para la comparación múltiple.

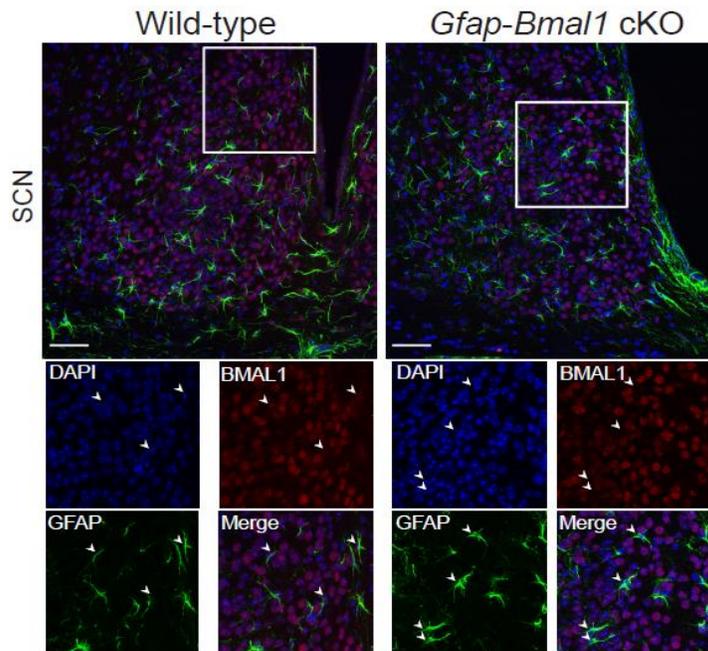
La significancia estadística de la expresión rítmica se determinó mediante el análisis de Cosinor. El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad PRISM 7.

IX. RESULTADOS

9.1 Confirmación del modelo knockout condicional de Bmal1 en astrocitos.

Después de llevar a cabo la tinción por inmunofluorescencia en donde se tiñó GFAP (marcador de astrocitos), Bmal1 (proteína del reloj circadiano deletada en cKO) y núcleos (DAPI-marcador del núcleo celular). Pudimos observar que, en el núcleo de los astrocitos (GFAP) de los ratones Bmal1 cKO no se expresa Bmal1, mientras que, en el núcleo de los astrocitos de los ratones WT si se observa la presencia de Bmal1. Es importante recalcar que Bmal1 no se eliminó en neuronas, por lo que se seguirá observando la señal roja de Bmal1 con DAPI de los núcleos de las neuronas, pero no con el verde GFAP de los astrocitos.

Además de esto, en la cuantificación de astrocitos que expresan GFAP y Bmal1 al mismo tiempo, logramos observar que la proporción disminuye en los ratones Bmal1 cKO en el núcleo arqueado, el núcleo ventromedial y el núcleo supraquiasmático del hipotálamo.



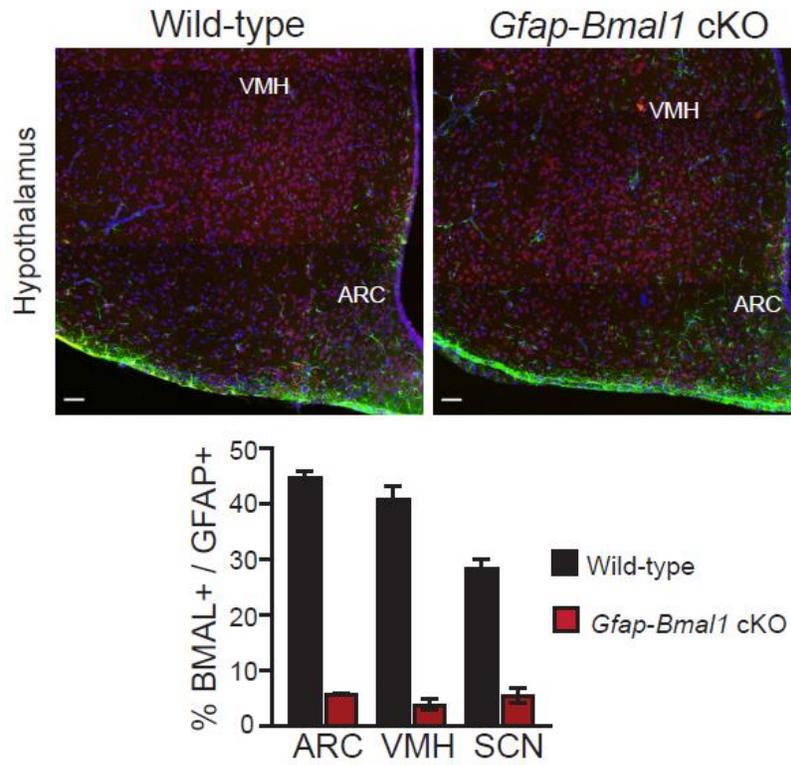


Fig. 10 Fotografías representativas de cerebro de ratón para observar la delección de Bmal1. Tinción con inmunofluorescencia de la proteína Bmal1, GFAP y núcleos (DAPI) en el SCN, así como en los núcleos ARC y VMH. En las merge se señala con flechas el núcleo de los astrocitos, se observa en el grupo WT sobreposición de GFAP, Bmal1 y DAPI, mientras que en el grupo knockout únicamente se observa la sobreposición de GFAP y DAPI. ROJO-Bmal1, VERDE- GFAP, AZUL-DAPI.

9.2 El modelo knockout del reloj circadiano de los astrocitos inhibe el aumento de peso generado por la dieta alta en grasa.

1. Medición de peso corporal y consumo de alimento

Con el fin de obtener un modelo de obesidad para los estudios planteados, se ocuparon ratones WT y Bmal1 cKO de la cepa C57BL/6, para ser alimentados con dieta alta en grasa o dieta control (Tabla 2).

El monitoreo de peso corporal muestra que los dos grupos de ratones alimentados con dieta alta en grasa ganaron mucho más peso que los ratones alimentados con dieta normo-calórica. A pesar de esto, los ratones Bmal1 cKO alimentados con HFD, ganaron significativamente menos peso que el grupo WT HFD, siendo a partir de la semana 8 del experimento que se comenzaron a notar las diferencias significativas entre estos dos grupos (Figura 11A). En contraste, en los grupos alimentados con dieta control, no se observan diferencias de peso a lo largo de todo el experimento.

Para determinar si la ganancia de peso era debido a cambios en la cantidad del consumo de alimento, se determinó el consumo de alimento semanalmente. Como se pudo observar, los ratones alimentados con HFD, consumieron menos cantidad de alimento que los ratones alimentados con dieta control (Figura 11B). Sin embargo, al calcular el total de Kcal consumidas, los ratones alimentados con HFD consumen más Kcal al compararlos con los alimentados con dieta control (Figura 11C). Cuando observamos específicamente el consumo de alimento en los dos grupos con HFD, podemos ver que ambos grupos consumen la misma cantidad en gramos y Kcal de alimento todas las semanas, por lo que la diferencia en el peso de los ratones de estos dos grupos, no se debe a un aumento en el consumo de alimento por parte del grupo WT HFD.

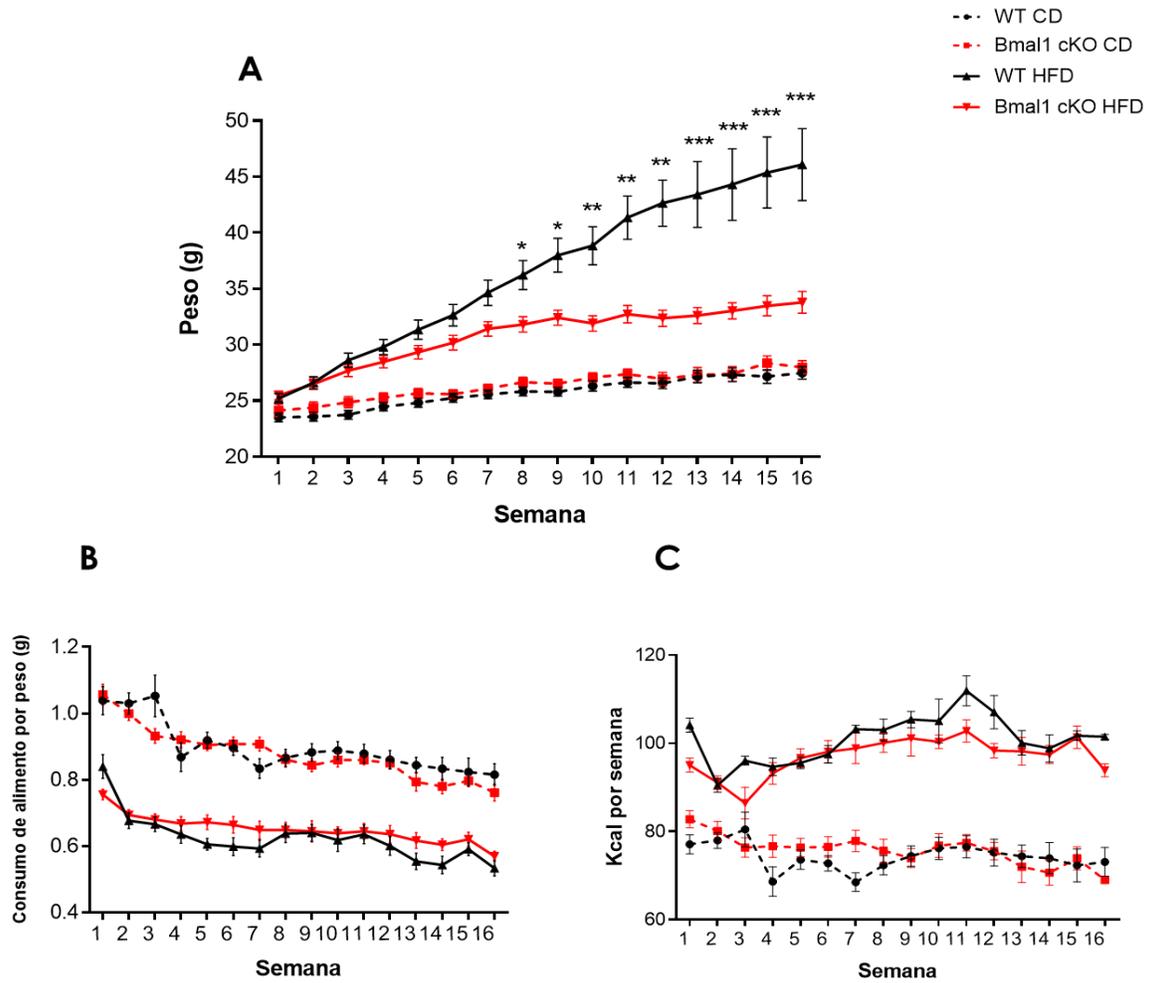


Fig. 11 Peso corporal y consumo de energía en gramos y Kcal de los cuatro grupos durante las 16 semanas con dieta control (CD) y dieta alta en grasa (HFD). El peso corporal (A), la ingesta de alimento (B) y el consumo calórico (C) fueron monitoreados semanalmente. Graficas de promedio + SEM, (n=10 por grupo), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, (WT HFD vs Bmal1 cKO HFD), ANOVA de dos vías, prueba de Tukey.

2. Composición corporal

Como se observó en el seguimiento del aumento de peso corporal semanal, los animales alimentados con HFD mostraron un aumento de peso corporal mayor al de los animales alimentados con CD además de la interesante diferencia vista en el peso de ambos grupos alimentados con HFD (Figura 11A), por lo que se decidió realizar un análisis de composición corporal.

Mediante el análisis de composición corporal realizado en los cuatro grupos de trabajo durante la semana 10 de experimento, pudimos observar que hay una pequeña diferencia significativa en el peso corporal entre los grupos con HFD (Figura 12A), pero no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos en el contenido de masa magra, interesantemente se encontró una diferencia notablemente significativa en el contenido de grasa de los grupos WT HFD y Bmal1 cKO HFD en la que se observa que el grupo Bmal1 cKO HFD contiene menor cantidad de grasa que el WT HFD (Figura 12C).

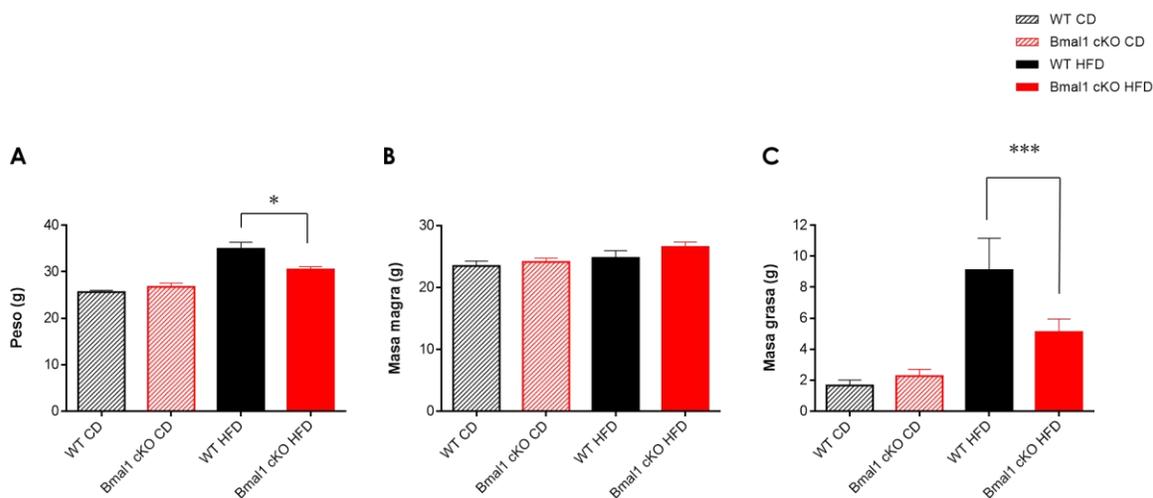


Fig. 12 Composición corporal. **A** peso corporal al momento de la prueba. **B** masa magra. **C** masa grasa. Graficas de promedio + SEM, (n=4 por grupo), *p<0.05, ***p<0.001, (WT HFD vs Bmal1 cKO HFD), ANOVA de dos vías, prueba de Tukey.

3. Medición de temperatura circadiana

Debido a que no se encontraron diferencias en el consumo de alimento, se decidió explorar la causa de las diferencias en el peso de los grupos alimentados con HFD. Comenzamos con la medición de temperatura, que es un parámetro de gasto de energía.

Los datos obtenidos de la toma de temperatura rectal y los obtenidos del iButton nos mostraron que, efectivamente los ratones del grupo Bmal1 cKO HFD muestran una mayor temperatura corporal a lo largo del día (Figuras 13A y 13B), viéndose resaltada esta diferencia de manera significativa durante el periodo nocturno, en el que a partir del ZT12, el grupo Bmal1 cKO HFD aumenta su temperatura al mismo nivel que los grupos alimentados con CD, pero el grupo WT HFD no es capaz de realizar este cambio de temperatura dependiente de la hora del día (Figura 13B). Debido a que los datos obtenidos mediante iButton son mucho más precisos, se calculó con estos datos los parámetros circadianos. Con estos resultados, observamos que ambos grupos alimentados con HFD muestran una reducción en la amplitud de la oscilación de la temperatura, sin embargo, al comparar entre estos dos grupos, el grupo Bmal1 cKO HFD logra mantener mayor amplitud en la oscilación de la temperatura en comparación con el grupo WT HFD (Figura 13C).

En el parámetro mesor o línea media del ritmo, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los grupos (Figura 13D). Interesantemente en la acrofase, que es la hora a la cual se encuentra el punto máximo en la oscilación, se observa que los grupos alimentados con HFD muestran un desfase de aproximadamente dos horas con respecto a los grupos alimentados con dieta control, viéndose menos acentuado este desfase en el grupo Bmal1 cKO HFD (Figura 13E).

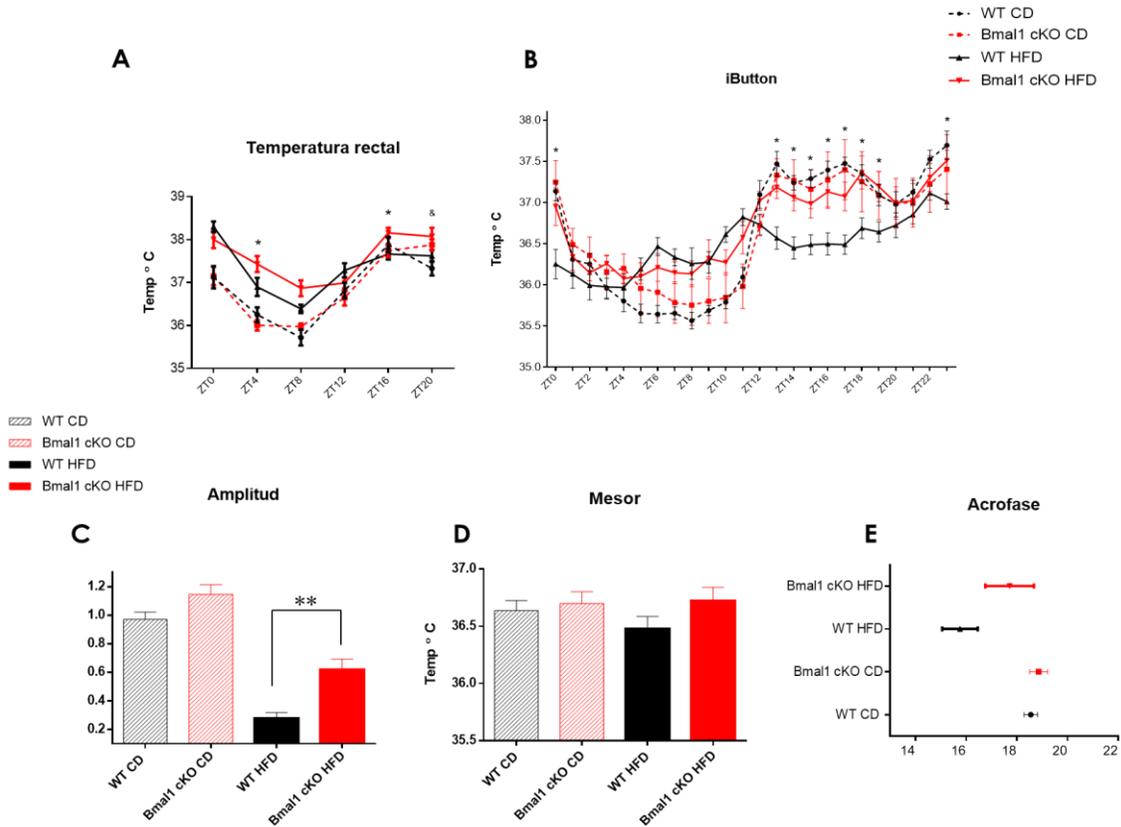


Fig. 13 Temperatura rectal y temperatura tomada con iButton de los cuatro grupos. A temperatura rectal monitoreada cada 4 horas a lo largo del ciclo de 24 hrs. **B** temperatura tomada con iButton, oscilación a lo largo de 24 horas, Graficas de promedio + SEM, (n=6 por grupo), * $p < 0.05$ (WT HFD vs Bmal1 cKO HFD), & $p < 0.05$ (WT CD vs Bmal1 CD). **C** amplitud, extensión de la oscilación, **D** mesor, línea media del ritmo. **E** acrofase, extensión de la oscilación. Grafica de promedio + SEM, (n=6 por grupo), ** $p < 0.01$ (WT HFD vs Bmal1 cKO HFD). ANOVA de dos vías, prueba de Tukey.

4. Gasto energético

Comparado con el grupo WT HFD, las diferencias en el peso corporal y el aumento en la temperatura corporal de los ratones Bmal1 cKO HFD sugieren cambios en la regulación de la homeostasis energética. Por ello, para obtener más información, se determinó el gasto energético mediante calorimetría indirecta con el cual obtuvimos el RER (relación de intercambio respiratorio) y el EE (gasto energético).

Los resultados del RER demuestran notablemente que la dieta tiene un efecto sobre el producto metabolizado, pues los grupos de CD se encuentran metabolizando preferentemente carbohidratos y los dos grupos alimentados con HFD se encuentran metabolizando mayoritariamente lípidos (Figura 14A).

Observando las diferencias del RER entre genotipos con la misma dieta vemos que, entre los grupos alimentados con dieta control, existe una diferencia significativa en el RER en ZT21, 22 y 23 (periodo activo). Indicando que los animales Bmal1 cKO CD, muestran menor RER y, por ende, metabolizan preferentemente lípidos en este momento del día (Figura 14A). Esto podría ser un indicador de la mejora en la respuesta de la glucosa durante este periodo para este grupo (Figura 15C).

En el RER para los grupos de HFD también se observan diferencias significativas, sobre todo también en el periodo de actividad, en donde el grupo WT HFD disminuye su RER en algunos puntos, pero en general su RER es muy parecido a Bmal1 cKO HFD durante todo el día (Figura 14A).

Para los resultados del gasto energético, se observó que durante el periodo nocturno el grupo Bmal1 cKO HFD aumenta significativamente este parámetro, este resultado es observable independientemente de la dieta, pues el grupo WT HFD mantiene bajos niveles en su gasto energético durante todo el día y no es capaz de aumentarlo cuando inician su periodo activo. Los grupos alimentados con CD mantienen niveles normales para su tipo de dieta y cambiantes dependiendo de la hora del día. Ambos grupos mantiene un comportamiento circadiano del gasto energético muy parecido, sin diferencias significativas durante todo el día (Figura 14B).

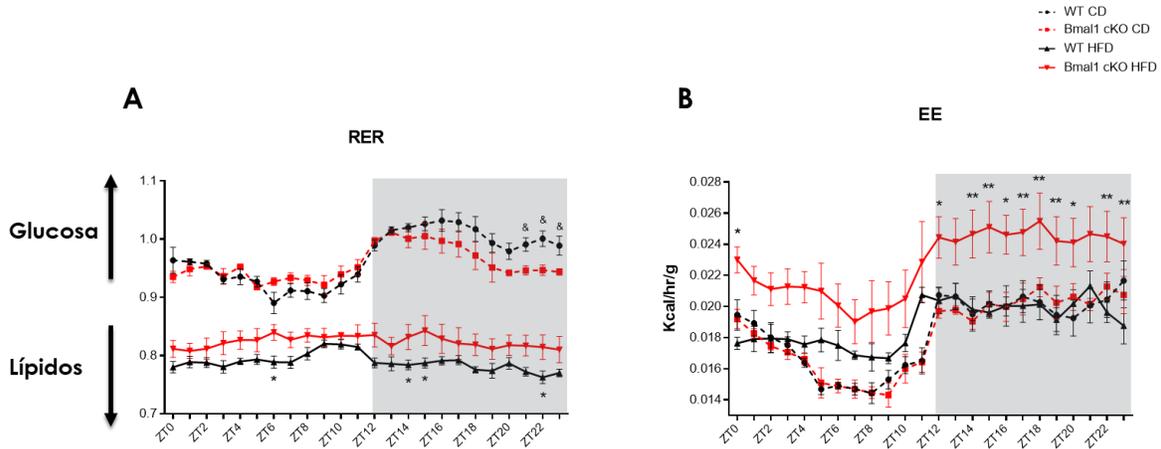


Fig. 14 Medición de gasto energético por Calorimetría Indirecta. A RER (relación de intercambio respiratorio), B EE (gasto energético). Graficas de promedio + SEM, (n=4 por grupo), *p<0.05, **p<0.01, (WT HFD vs Bmal1 cKO HFD), &p< 0.05 (WT CD vs Bmal1 CD). ANOVA de dos vías, prueba de Tukey.

5. Prueba de tolerancia a la glucosa

Para analizar si existían diferencias del metabolismo de glucosa, realizamos la prueba de tolerancia a la glucosa y la prueba de sensibilidad a la insulina. En la prueba de tolerancia a la glucosa, se observó que los ratones con dieta alta en grasa son más intolerantes a la glucosa, es decir tienen una menor capacidad de captar glucosa. Sorprendentemente, el grupo Bmal1 cKO HFD, presentó una tolerancia a la glucosa muy parecida a la de los grupos alimentados con dieta control y, por lo tanto, mejor capacidad de captar glucosa, con una disminución significativa en la concentración de glucosa después de 30 minutos de la inyección de glucosa en comparación con el grupo WT HFD (Figura 15A).

Estos resultados se ven acentuadas a ZT4 (Figura 15A), debido a que es el momento de ayuno de los ratones, lo que concuerda con Hatori & Panda, donde mencionan que el metabolismo de la glucosa se encuentra estrechamente controlado por múltiples mecanismos de señalización que muestran patrones rítmicos [67], por lo que a ZT16, cuando los ratones se encuentran en su periodo activo, el organismo estará listo para la

captación de glucosa y, por lo tanto habrá una mejor respuesta general de los cuatro grupos a la glucosa durante la noche, contrario a lo que sucede a ZT4 en donde no se tiene esta predisposición y los niveles de glucosa se elevan en el grupo WT HFD, situación que logra inhibir el grupo Bmal1 cKO HFD.

Además de eso, al analizar el área bajo la curva, observamos que el grupo Bmal1 cKO HFD es capaz de responder adecuadamente a la glucosa en ambos ZTs, pues existen diferencias significativas entre los grupos WT HFD y Bmal1 cKO HFD a ZT4 y ZT16 de la prueba de tolerancia a la glucosa (Figura 15C).

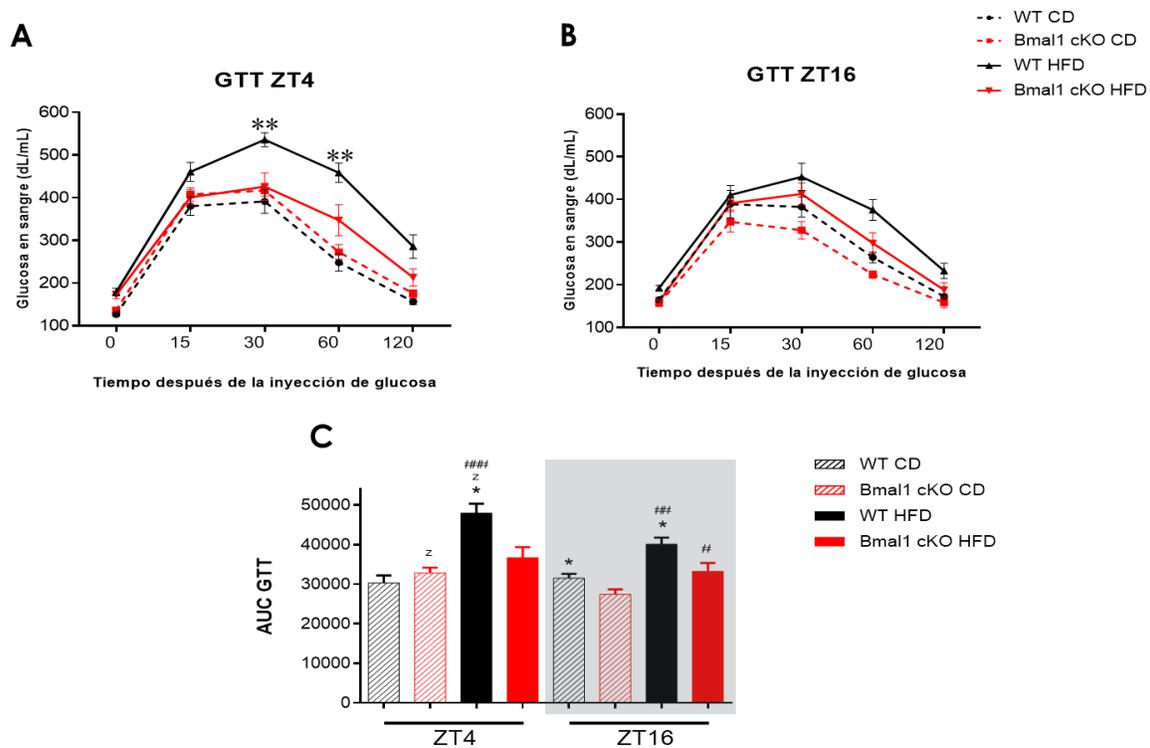


Fig. 15 Test de tolerancia a la glucosa. **A** concentraciones de glucosa en plasma después de la inyección intraperitoneal de glucosa en ZT4 y **B** ZT16, Graficas de promedio + SEM, (n=10 por grupo), **p<0.01, (WT HFD vs Bmal1 cKO HFD), **C** área bajo la curva de los cuatro grupos ZT4 y ZT16. Grafica de promedio + SEM, (n=10 por grupo), *p<0.05 - WT HFD vs Bmal1 cKO HFD (ZT4 y ZT16), WT CD vs Bmal1 cKO CD (ZT16), #p< 0.05 - Bmal1 cKO CD vs Bmal1 cKO HFD (ZT16), ##p< 0.01 - WT CD vs WT HFD (ZT4), ###p< 0.001 - WT CD vs WT HFD (ZT4), z p< 0.05 - WT HFD ZT4 vs WT HFD ZT16, Bmal1 cKO CD ZT4 vs Bmal1 cKO CD ZT16. ANOVA de dos vías, prueba de Tukey.

6. Prueba de sensibilidad a la insulina

Durante la prueba de sensibilidad a la insulina las diferencias significativas encontradas fueron menos evidentes entre genotipos, pero no así entre dietas. El análisis estadístico del área bajo la curva demostró que a ZT16 el grupo Bmal1 cKO HFD disminuye significativamente su sensibilidad a la insulina en comparación con el grupo WT HFD, a pesar de esa mejoría, esto no se observa a ZT4 (Figura 16C) y la estadística tampoco muestra diferencias significativas entre estos dos grupos durante las curvas de sensibilidad (Figuras 16A y 16B).

Con estos mismos resultados se logró observar que existe una clara distinción en la sensibilidad a la insulina dependiendo del tipo de dieta, siendo los grupos con CD los que tienen una mejor respuesta general a la insulina durante todo el día y sin diferencias significativas entre genotipos, es decir entre grupo WT CD y Bmal1 cKO CD.

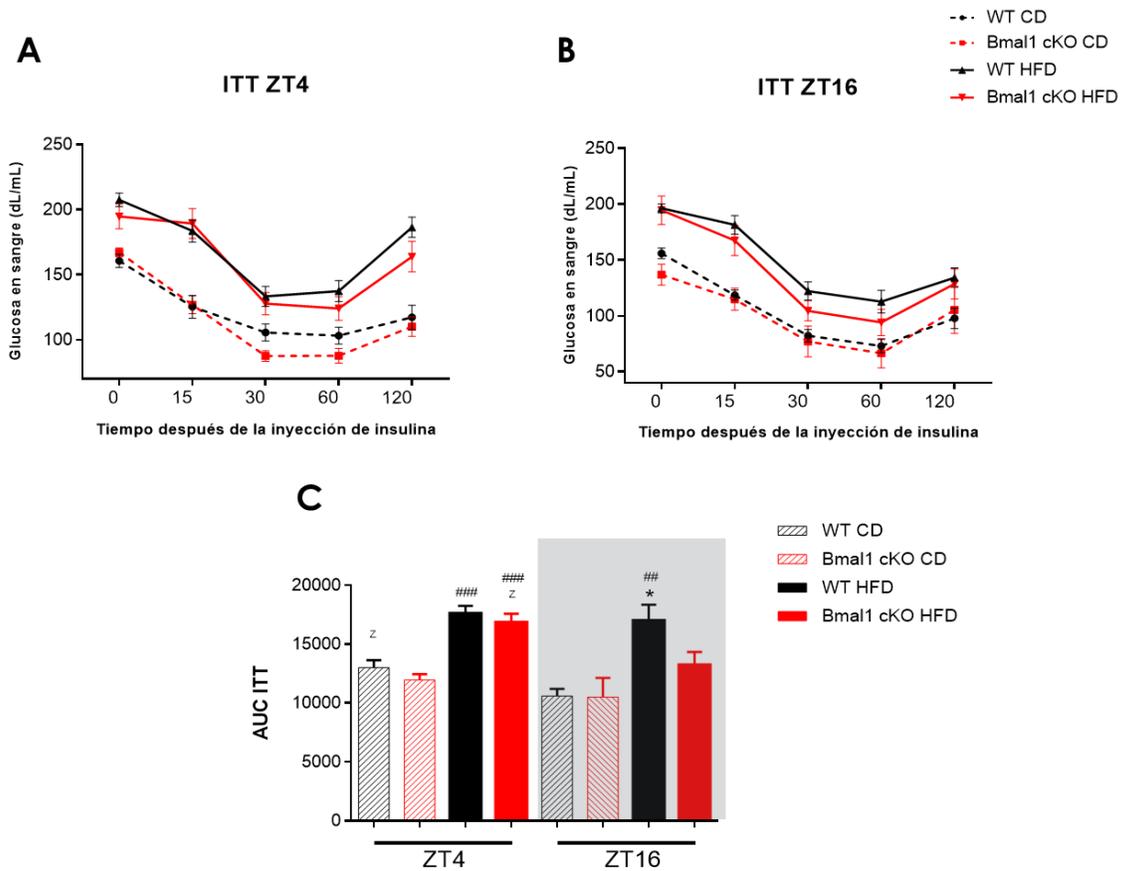


Fig. 16 Test de sensibilidad a la insulina. **A** concentraciones de glucosa en plasma después de la inyección intraperitoneal de insulina en ZT4 y **B** ZT16, Graficas de promedio + SEM, (n=10 por grupo), sin diferencias significativas, **C** área bajo la curva de los cuatro grupos ZT4 y ZT16. Grafica de promedio + SEM, (n=10 por grupo), *p<0.05 - WT HFD vs Bmal1 cKO HFD (ZT16), ##p< 0.01 - WT CD vs WT HFD (ZT16), ###p< 0.001 - WT CD vs WT HFD (ZT4), Bmal1 cKO CD vs Bmal1 cKO HFD (ZT4), ^zp< 0.05 - WT CD ZT4 vs WT CD ZT16, Bmal1 cKO HFD ZT4 vs Bmal1 cKO HFD ZT16. ANOVA de dos vías, prueba de Tukey.

9.3 Recuperación de comportamientos circadianos y metabólicos en ratones sin Bmal1 en astrocitos.

1. Consumo de alimento y actividad circadianos

Durante los experimentos para determinar los patrones diarios de consumo de alimento, se observaron diferencias estadísticamente significativas en la actividad de alimentación ad-libitum, al comparar a los grupos alimentados con las diferentes dietas, es decir WT CD vs WT HFD y Bmal1 cKO CD vs Bmal1 cKO HFD, en donde ambos grupos alimentados con CD aumentan significativamente su ritmo de alimentación durante el periodo nocturno, más específicamente de ZT15 a ZT19; en contraste, los dos grupos alimentados con HFD no aumentan la ingesta de alimentos durante la noche, manteniéndola casi a los mismos niveles que durante el periodo diurno (Figura 17A).

Para la actividad de movimiento, fueron también los grupos de dieta control los que mostraron un ritmo circadiano con mayor actividad durante la noche; sorprendentemente, de los grupos alimentados con dieta control, fue el grupo Bmal1 cKO el que tuvo mayor actividad de movimiento con diferencias significativas durante la noche en comparación con los WT CD, pues durante ZT17, ZT18 y ZT19 se logra ver un aumento estadísticamente significativo en el ritmo del movimiento del grupo Bmal1 cKO CD (Figura 17B).

Durante este mismo análisis no se lograron ver diferencias significativas en el ritmo de alimentación o en el ritmo de movimiento entre los grupos WT HFD y Bmal1 cKO HFD.

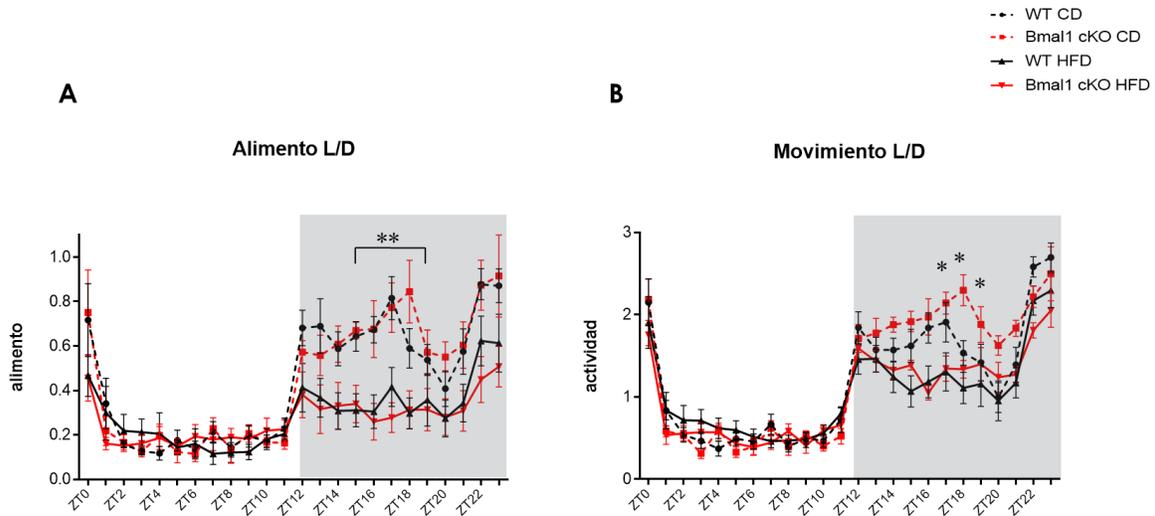
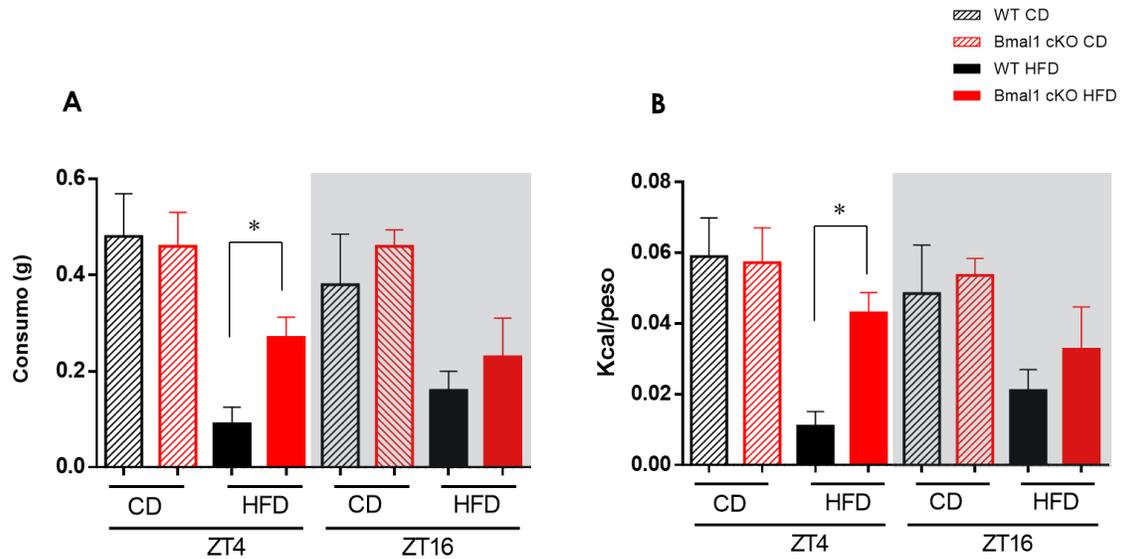


Fig. 17 Perfil de actividad durante el periodo de 24hrs de los cuatro grupos de trabajo. Promedio de 5 días en periodo de luz/oscuridad (12h/12h). **A** actividad de alimentación Grafica de promedio + SEM, (n=7 por grupo), **p<0.01 (Bmal1 cKO CD vs Bmal1 cKO HFD y WT CD vs WT HFD). **B** actividad de movimiento. Grafica de promedio + SEM, (n=7 por grupo), *p<0.05 - WT CD vs Bmal1 cKO CD. ANOVA de dos vías, prueba de Tukey.

2. Respuesta de saciedad

Estudiando los comportamientos alimenticios y de saciedad de los ratones, se pudo observar que después de un ayuno de 12 horas, no hay diferencias entre genotipos en el consumo de alimento con dieta control a ZT4 ni a ZT16, manteniendo un elevado consumo de alimento después de un fuerte ayuno (Figuras 18A y 18B).

Diferencialmente, al observar el comportamiento de saciedad que muestran los ratones alimentados con HFD, logramos observar que el grupo Bmal1 cKO HFD aumenta leve pero significativamente su consumo en gramos y kilocalorías de alimento después del ayuno de 12 horas, comportamiento que no se observa en el grupo WT HFD, ya que durante ZT4 este grupo no aumenta su consumo de aliento a pesar de un ayuno prolongado. Sorpresivamente este mismo efecto no se observó a ZT16, pues no hay diferencias significativas entre grupos (Figuras 18A y 18B).



Durante las observaciones del consumo de alimento durante 60 minutos después del ayuno de 12 horas, observamos que al inicio de la prueba los ratones de los grupos alimentados con dieta control pasan más del 50% del tiempo alimentándose y conforme van pasando los minutos, los ratones comienzan a saciarse y realizan otras actividades como explorar o acicalarse. Contrario a lo que sucedió con los grupos alimentados con CD, ambos grupos alimentados con HFD no presentaron este mismo comportamiento de arribo de saciedad, es decir que, a pesar de haber sido restringidos de alimento durante un largo periodo, cuando se les da acceso a su comida, los ratones no se alimentan de inmediato ni de manera constante, en vez de esto, prefieren pasar tiempo acicalándose o explorando antes que alimentarse (Anexo 2).

3. Valor hedónico y palatabilidad

Continuando con el análisis del comportamiento alimenticio de los grupos de estudio, observamos durante la prueba de palatabilidad, que en condiciones ad-libitum, los ratones Bmal1 cKO HFD disminuyen significativamente el consumo de alimento altamente palatable durante ZT4, esta diferencia sólo se observa en este grupo, ya que el grupo WT HFD mantiene los niveles de consumo de alimento palatable al mismo nivel que los grupos con CD a ZT4 y A ZT6.

Sorprendentemente, el grupo WT HFD muestra una disminución significativa al compararlo consigo mismo peor a diferente ZT, es decir que a ZT16 estos ratones disminuyen considerablemente su consumo de alimento palatable, y es el único grupo donde se observa este efecto con diferencias significativas.

Entre los grupos alimentados con CD no se observaron diferencias significativas a ningún ZT (Figuras 19A y 19B).

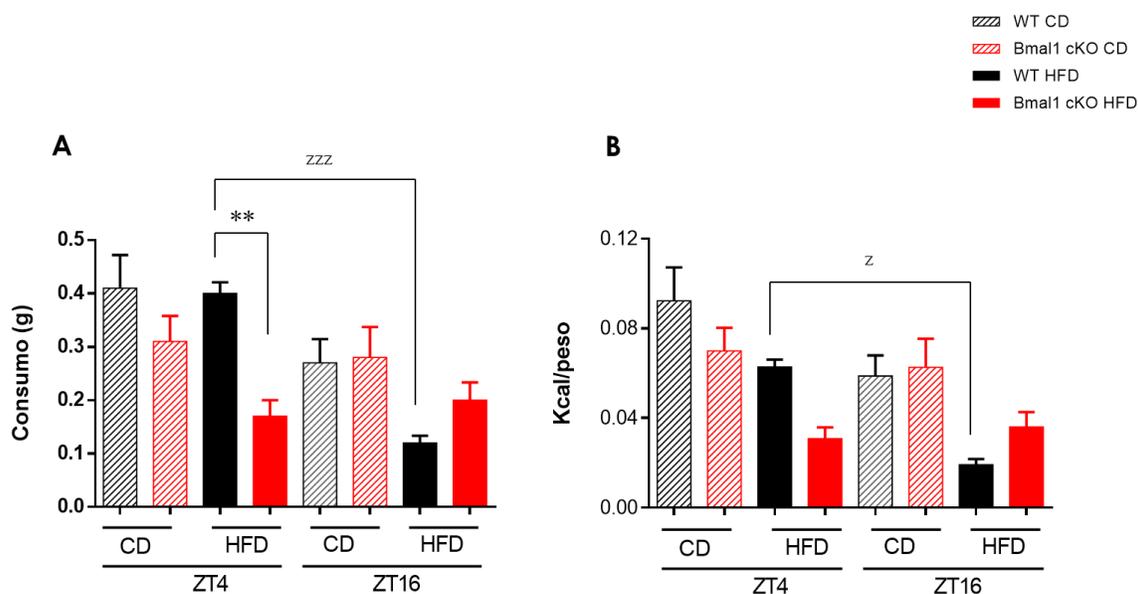


Fig. 19 Consumo de crema de cacahuete en gramos y kilocalorías durante 60 min., en ratones alimentados ad libitum. A consumo en gramos durante 60 minutos y B consumo en kilocalorías por peso durante 60 min. Gráficas de promedio + SEM, (n=10 por grupo), $^z p < 0.05$ - WT HFD ZT4 vs WT HFD ZT16, $^{**} p < 0.01$ - WT HFD vs Bmal1 cKO HFD, $^{***} p < 0.001$ - WT HFD ZT4 vs WT HFD ZT16. ANOVA de dos vías, prueba de Tukey.

4. Test de nado forzado.

Durante esta prueba, se lograron observar varias diferencias significativas, destacando que los grupos Bmal1 cKO CD y HFD mantienen un porcentaje de inmovilidad significativamente menor, lo que se traduce en un comportamiento tipo depresivo reducido.

Específicamente, a ZT4 el grupo Bmal1 cKO CD se muestra significativamente menos inmóvil que el grupo WT CD, algo muy parecido a lo que sucede con los grupos con HFD, pues el grupo Bmal1 cKO HFD, a pesar de mantenerse con una dieta alta en grasa, se mantiene menos inmóvil que el grupo WT HFD. A diferencia de esto, a ZT16 los grupos alimentados con HFD no muestran diferencias significativas y su comportamiento es muy parecido, pasando aproximadamente el 50% del tiempo evaluado inmóviles; en cambio, los grupos con CD a ZT16 si muestran diferencias significativas, siendo el grupo Bmal1 cKO CD el grupo que se mantiene menos tiempo inmóvil y por lo tanto menor comportamiento tipo depresivo (Figura 20).

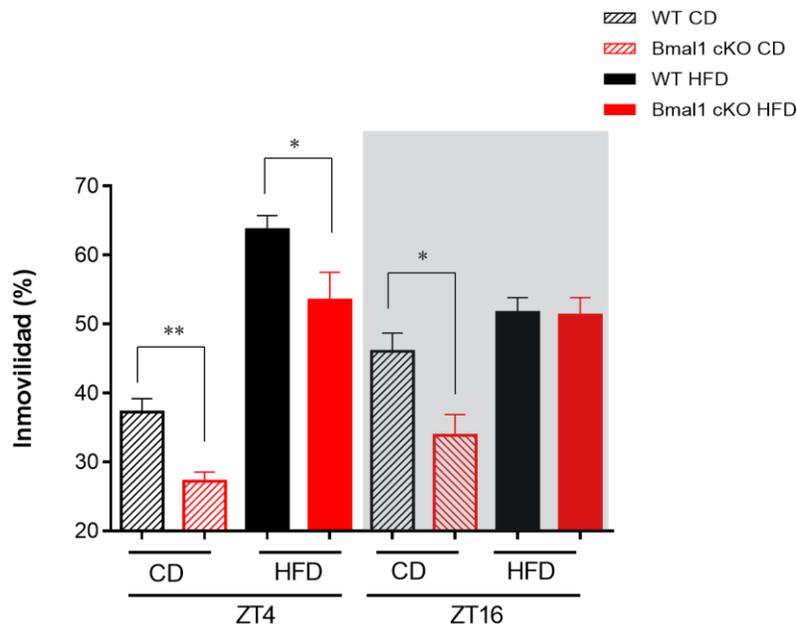


Fig. 20 Porcentaje de tiempo en inmovilidad de los cuatro grupos de trabajo, a ZT4 y ZT16. Grafica de promedio + SEM, (n=8 por grupo), *p<0.05 - WT HFD vs Bmal1 cKO HFD ZT4 y WT CD vs Bmal1 cKO CD ZT16, **p<0.01 - WT CD vs Bmal1 cKO CD ZT4. ANOVA de dos vías, prueba de Tukey.

9.4 Aumento de la respuesta neuronal del VMH a la glucosa en ratones Bmal1 cKO HFD

Como se mencionó anteriormente y de acuerdo con el objetivo de este estudio, se consideró importante observar cómo se da la activación de neuronas en el VMH con un estímulo de glucosa.

Lo que se observó primeramente con este experimento, fue que las neuronas del VMH, específicamente las que se encuentran en el área dorsomedial del VMH se activan en mayor proporción que las que se encuentran en el área ventrolateral del VMH después de un estímulo de glucosa.

Seguidamente, y observando únicamente al área dorsomedial del VMH de los diferentes grupos, observamos que se muestran diferencias significativas en la activación neuronal entre los grupos alimentados con HFD, pues el grupo Bmal1 cKO HFD eleva significativamente la activación neuronal en comparación con el WT HFD. Además de esto, también se observaron diferencias significativas entre los grupos alimentados con CD, siendo el grupo WT CD el que eleva significativamente su activación neuronal en respuesta a glucosa en comparación con el grupo Bmal1 cKO HFD (Figura 21).

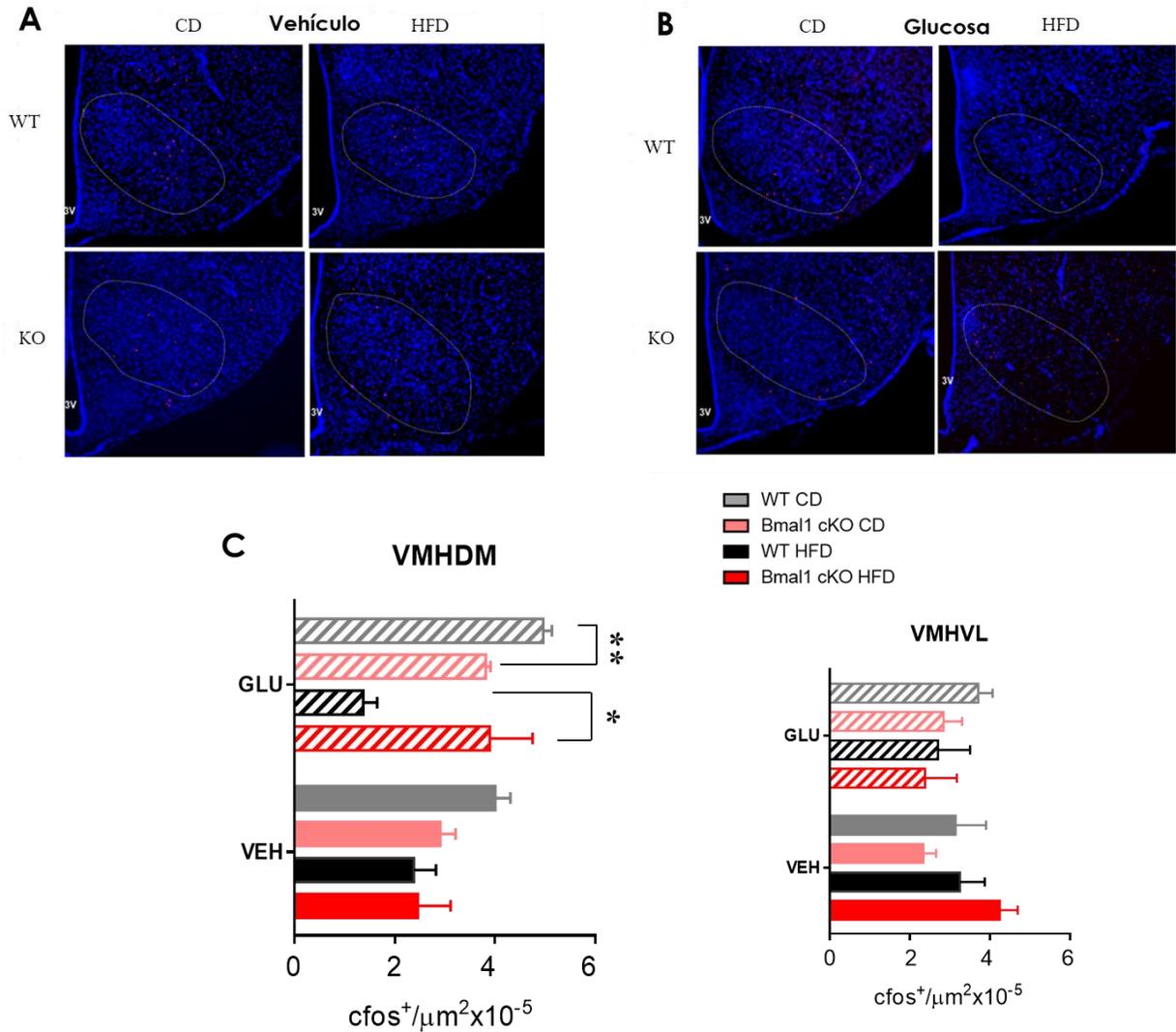


Fig. 21 Activación del VMH por estímulo de glucosa. **A** fotografías tomadas del hipotálamo de cerebro de ratones WT y Bmal1 cKO con CD y HFD inyectados con vehículo. **B** fotografías tomadas del hipotálamo de cerebro de ratones WT y Bmal1 cKO con CD y HFD inyectados con glucosa. **C** cantidad de neuronas activadas por el estímulo de glucosa en el área dorso medial (VMHDM) y ventrolateral (VMHVL) del VMH. Grafica de promedio + SEM, (n=4 por grupo), *p<0.05 - WT HFD vs Bmal1 cKO HFD, **p<0.01 - WT CD vs Bmal1 cKO CD. ANOVA de dos vías, prueba de Tukey.

X. DISCUSIÓN

La obesidad, definida medicamente como un estado de aumento del peso corporal, más específicamente del tejido adiposo, ha aumentado de forma alarmante en la población, proporcionando consecuencias adversas para la salud de los individuos, ya que representa un factor de riesgo importante de comorbilidades asociadas a enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, cáncer y trastornos musculoesqueléticos, además de estar asociada con un aumento de la mortalidad general en relación con los individuos no obesos [39, 68]. El hipotálamo a través de sus distintos núcleos neuronales (VMH, ARC, DMH, PVN y LH), juega un papel crítico en el control de la homeostasis metabólica. Aunado a eso, el descubrimiento de que distintas hormonas metabólicas circulantes como la insulina, la leptina y la ghrelina actúan en dichos núcleos, promovió la profundización en su estudio con la subsecuente identificación de poblaciones específicas de células hipotalámicas sensibles a hormonas, que a su vez generan respuestas metabólicas, fisiológicas y de comportamiento implicadas en el control del balance energético [30].

Aunque la mayoría de las investigaciones se han enfocado al estudio del papel de las neuronas de los núcleos hipotalámicos en el control del balance energético, estudios recientes han demostrado que los astrocitos (otro grupo de células cerebrales), han surgido como socios importantes de las neuronas en el procesamiento de la información, tanto con neuronas hipotalámicas como en otras regiones del cerebro, destacando de forma importante en su papel dentro del control metabólico [69, 70].

Un creciente número de evidencias epidemiológicas y experimentales han demostrado que el reloj circadiano es capaz de controlar el metabolismo mediante la expresión circadiana de diversos genes que participan en el metabolismo, es decir, el reloj circadiano está íntimamente ligado al metabolismo [11]. Por ello, en este trabajo, abordamos la pregunta de ¿Cuál es el papel de Bmal1 de los astrocitos hipotalámicos

en el control del balance energético? Para ello utilizamos un modelo de ratones cKO condicionales a los cuales se les eliminó el gen *Bmal1* en células que expresan GFAP.

Como BMAL1 es un componente central del reloj circadiano, cuya eliminación provoca una alteración en cientos de genes que se expresan de manera circadiana (Figura 2) [11], buscamos obtener evidencia acerca del efecto de la ablación dirigida de BMAL1 en los astrocitos en el control del metabolismo energético. Para abordar nuestra hipótesis, en la que sostenemos que la ausencia de BMAL1 en los astrocitos desincroniza el reloj molecular de los astrocitos y consecuentemente provoca cambios en las respuestas de la activación neuronal del núcleo ventromedial (entre otros) del hipotálamo, así como cambios en el control del metabolismo energético, utilizamos dos paradigmas nutricionales: bajo condiciones de dieta normo-calórica y en condiciones de un reto nutricional con dieta hipercalórica [71].

Como ya se mencionó, existe un importante papel del hipotálamo en el control del balance energético mediante la generación de respuestas metabólicas y de comportamiento, por lo que realizamos pruebas fisiológicas y metabólicas, así como pruebas de comportamiento para obtener pistas acerca de los efectos que se pudieran generar.

En primero lugar es importante mencionar los resultados obtenidos cuando los grupos WT y *Bmal1* cKO fueron alimentados con una dieta normo calórica, pues en la mayoría de los experimentos no se observaron diferencias significativas entre estos dos grupos, pero si al compararlos con los alimentados con HFD. Comenzando con el aumento de peso de WT CD y *Bmal1* cKO CD, se observó claramente que el aumento fue el mismo durante las 16 semanas del experimento, al igual que el consumo en gramos y en kilocalorías (Figura 11). Seguido de esto, la medición del ritmo circadiano de la temperatura fue también muy parecido en ambos grupos, pues no se encontraron diferencias significativas a ninguna hora del día ni en el análisis de cosinor (Figura 13).

Sorprendentemente, uno de los pocos resultados con diferencias significativas entre estos dos grupos, fue en el RER, pues durante el periodo nocturno se observó una leve

diferencia en la utilización del sustrato energético, cambiando hacia lípidos el de los Bmal1 cKO CD (Figura 14A). Además, es importante mencionar que estas diferencias en los resultados del RER coinciden con las diferencias en la tolerancia a la glucosa también durante el periodo oscuro, donde los Bmal1 cKO CD responden mejor a los altos niveles de glucosa (Figura 15C) y con los resultados del ritmo circadiano del movimiento en los que el grupo Bmal1 cKO CD aumentan significativamente su ritmo de movimiento durante el periodo nocturno (Figura 17B). Por lo tanto, con este conjunto de resultados se puede especular que el cambio en el sustrato metabolizado se da debido a un aumento en el ritmo de movimiento total durante la noche.

Por otro lado, continuando con lo observado en los grupos alimentados con CD, observamos en sus pruebas de comportamiento que mantienen un ritmo de hambre normal después de un ayuno prolongado, alimentándose inmediatamente que se les da acceso al alimento y comiendo en cantidades adecuadas a su estado metabólico, además de esto, también observamos que estos grupos si consumen altas cantidades de alimentos palatables *add-libitum*, es decir que lo consumen únicamente por que les gusta el sabor y no porque tengan hambre. En cuanto al test de nado forzado logramos observar, y como era de esperar que estos grupos no se mantiene mucho tiempo inmóviles, es decir que no presentaran un comportamiento tipo depresivo como lo es en los grupos alimentados con HFD.

Ahora, comenzando a hablar de los grupos alimentados con HFD, los primeros resultados observados en cuanto al aumento de peso concuerdan con reportes previos en ratones WT, en los cuales se ha demostrado que la cepa de ratones C57BL/6 es susceptible a la obesidad inducida por la dieta (Figura 11A) [72]. Sorprendentemente, cuando observamos el aumento de peso en los animales del grupo Bmal1 cKO alimentados con dieta alta en grasa, observamos que no aumentan de peso al mismo grado que sus compañeros WT.

Este resultado llamo nuestra atención, ya que el alimento consumido en gramos y kilocalorías de los grupos con HFD fue el mismo en todo momento, indicándonos que la

diferencia de peso entre los ratones WT HFD y Bmal1 cKO HFD, no se debe a una disminución en el consumo de alimento, por lo que pueden existir diferencias en el control del balance energético entre genotipos cuando se alimentan con dieta alta en grasa.

Además, las diferencias de peso corporal entre los grupos HFD, se acompañaron de cambios en la adiposidad, como se observa en el análisis de composición corporal por Resonancia Magnética Nuclear (Figura 12). Estos resultados nos indicaron que la eliminación de BMAL1 en los astrocitos provoca algún cambio en la homeostasis energética dependiente de alguna vía controlada por el reloj circadiano de los astrocitos, confiriéndoles protección contra la obesidad inducida por la dieta.

La resistencia a la ganancia de peso provocada por dieta hipercalórica en los ratones cKO de BMAL1 contrasta notablemente con la predisposición a la obesidad observada en mutantes de Bmal1 en múltiples estudios (Tabla 1). Por ejemplo, Guo, B. et al., 2012 utilizaron ratones BMAL1^{-/-} nulos en todo el cuerpo, alimentados con HFD y observaron en estos ratones un aumento de ~2 veces del contenido de grasa corporal total [21]. Pensamos que este contraste de resultados se debe principalmente a que en un modelo cKO BMAL1 es eliminado de manera ubicua mientras que en nuestro caso sólo en los astrocitos, lo cual apoya la noción de que Bmal1 presenta funciones célula/tejido específicas.

En este sentido, es importante destacar que también existen otros estudios de ratones cKO de BMAL1 en áreas específicas del cuerpo, en los que no se han encontrado alteraciones en el peso de los animales. Por ejemplo, los ratones BMAL1^{-/-} pancreático mostraron una actividad circadiana, ritmos de alimentación, peso corporal y composición normales [19]. Así mismo, otros estudios han mostrado que, la afectación del ritmo circadiano trae consigo consecuencias directas sobre el metabolismo, provocando la obesidad, diabetes, resistencia a la glucosa, insulina, leptina, etc. [18, 21, 22], lo cual parecería contrastar con nuestros resultados.

Teniendo claro que, en nuestros resultados, la eliminación de BMAL1 “favorece” la respuesta metabólica cuando se expone a HFD, nos interesó describir de manera más amplia como este modelo knockout de Bmal1 en astrocitos afecta o interfiere en los procesos metabólicos, homeostáticos y conductuales para que se de esta mejoría aparente en comparación con los WT.

Eso nos hizo poner mayor atención a los resultados con notables diferencias entre los dos grupos con HFD. Entre estos, los cambios de temperatura en los diferentes grupos demuestran que, los dos grupos alimentados con HFD, disminuyeron su amplitud de temperatura a lo largo del día, pero observamos que los ratones Bmal1 cKO HFD, logran mantener de manera significativa la amplitud en la temperatura a lo largo del día (Figura 13C), de tal forma que aumenta durante el periodo activo, tal y como sucede en los grupos de CD.

Los aspectos corporales como el peso corporal pueden ser el resultado o estar asociados con anomalías en el metabolismo de la glucosa o lípidos. Los factores críticos que contribuyen al mantenimiento del peso corporal incluyen la ingesta calórica y el gasto energético. La alteración de cualquiera de estos factores pueden alterar el equilibrio de la ecuación y provocar cambios en el peso corporal [63].

Tomando en cuenta los resultados de temperatura, sugieren que los ratones Bmal1 cKO HFD, presentan una mayor capacidad para responder al exceso del consumo de calorías y son más termogénicos, lo cual índice un aumento en el gasto energético sobre todo durante su periodo activo y por lo tanto menor ganancia de peso, en contraste con los ratones del grupo WT HFD que no son capaces de aumentar el gasto energético a pesar de consumir la misma cantidad de calorías (Figura 14B).

Estos resultados podrían estar indicando algún cambio en el control homeostático, el cual se logra a través de una variedad de mecanismos altamente sofisticados que controlan el equilibrio entre la ingesta y el gasto de energía. Este control homeostático mantiene una naturaleza cíclica, que es controlada en gran parte por los ritmos

circadianos [5]. Esta interacción entre nutrición, metabolismo, ejercicio y fisiología circadiana podría estar reflejada en estos resultados.

En los años 70's se describió que la obesidad se encontraba asociada con la disminución de la capacidad y actividad del tejido adiposo pardo (BAT) [73] y años después se observó que en ausencia de la proteína desacoplante 1 (UCP1) los ratones eran propensos a la obesidad [74]. UCP1 es una proteína capaz de cortar el circuito de gradiente de electrones en la cadena respiratoria que impulsa la síntesis de ATP, transportando protones de forma pasiva hacia el espacio intermembrana, permitiendo que la energía se disipe en forma de calor y aumente el gasto energético [75]. En este contexto, como bien mencioné, nuestros ratones Bmal1 cKO HFD, muestran un aumento de la temperatura y del gasto energético principalmente durante el periodo de oscuridad, así como una disminución de la obesidad, por lo que, a futuro podríamos interesarnos en BAT, ya que es un tejido termogénico que tiene un gran número de mitocondrias y que además contienen la UCP1.

En los adipocitos marrones, el alto contenido de mitocondrias y su suministro vascular facilita la termogénesis activada por el Sistema Nervioso Simpático (SNS). Tanto el BAT como el WAT, están inervados por el SNS con una amplia presencia de terminales nerviosas y receptores adrenérgicos (β 3-AR). La inducción de la termogénesis se desencadena por la llegada de la señal sináptica que consiste en la liberación de norepinefrina y epinefrina, que se unen a los receptores β 3-AR activando la lipólisis en WAT y la termogénesis en BAT [76, 77]. Así que, el metabolismo de nuestros ratones cKO puede estar cambiado por el incremento de termogénesis adaptativa, por un mayor número de mitocondrias o mayor activación de UCP1, ya que también se ha descubierto en estudios anteriores, que la ingesta calórica excesiva estimula la activación de BAT y con ello el aumento de la termogénesis, para mantener el peso corporal normal en respuesta al reto calórico impuesto [78].

A su vez, es reconocido que la activación de la termogénesis no sólo induce la pérdida de peso, sino que también tiene un impacto positivo al contrarrestar diversas

alteraciones metabólicas como la resistencia a la insulina, hiperglucemia, hiperlipidemia, etc., probablemente debido a la capacidad de los adipocitos de absorber lípidos y glucosa de la circulación [77]. Dichas adaptaciones metabólicas coinciden con nuestras observaciones que muestran un aumento de la temperatura que se correlaciona inversamente con el aumento del peso corporal (Figuras 11A y 13B). Además, en estudios con ratones expuestos al frío (inducción de termogénesis), se ha observado una mayor expresión de genes involucrados con la captación de glucosa y la glucólisis promoviendo la utilización de glucosa por BAT con estímulo por frío y aumento de termogénesis [79]. En este sentido, nuestros datos muestran que los ratones *Bmal1* cKO HFD, tuvieron respuestas mejoradas al estímulo de glucosa e insulina en dichas pruebas (Figuras 15 y 16), sobre todo la mejora en la tolerancia a la glucosa mostrada por este grupo a ZT4.

Los cambios de temperatura y los resultados en calorimetría indirecta están relacionados, ya que la termogénesis depende del consumo de oxígeno y de la capacidad de las células para oxidar sustratos en sus mitocondrias. Por lo tanto, cuando se requiere calor, la noradrenalina liberada por los nervios simpáticos, activa rápidamente los adipocitos marrones, resultando en la oxidación de ácidos grasos y la producción de calor [80]. A pesar de que nosotros no observamos diferencias significativas entre genotipos en el RER, si logramos ver un aumento muy notorio en el gasto energético de los ratones *Bmal1* cKO HFD, que concuerda muy bien con el aumento de temperatura observado en este mismo grupo.

Además de esto, varios estudios han sugerido que el VMH juega un papel importante en la regulación de la termogénesis inducida por la dieta, ya que en ausencia del factor esteroideogénico 1 (*SF-1*) (expresado exclusivamente en el VMH y que es necesario para su desarrollo), no se da el aumento en el gasto energético ni en el consumo de O₂ esperado tras la exposición a HFD; es decir, hay respuestas termogénicas deterioradas [81], ya que VMH es capaz de ejercer un aumento de la señalización adrenérgica en el SNS, controlando así la función de BAT y por ende el gasto energético y la termogénesis

[5]. Ahora, adentrándonos más en el papel del VMH, este núcleo se ha considerado durante mucho tiempo como un área importante para regular la ingesta de alimentos y el peso corporal; algunos estudios han sugerido que las neuronas del VMH tienen este papel regulador, al modular al SNS [82], además de que la carencia de SF-1 también lleva al desarrollo de obesidad masiva como resultado de la hiperfagia y la reducción del gasto energético [83], apoyando el modelo de que las neuronas en el VMH son reguladores clave del equilibrio energético.

Debido a que el VMH juega un papel muy importante en la homeostasis energética y en particular en el control del BAT y del metabolismo de la glucosa, además de las mediciones coincidentes de temperatura y gasto energético en nuestros ratones, decidimos realizar un experimento que nos permitió ver la activación neuronal en el VMH a partir de la estimulación con glucosa. Esto lo realizamos por el conocimiento de la existencia de neuronas de “detección metabólica”, que son aquellas neuronas encargadas de la regulación de la ingesta de alimentos, así como de la homeostasis energética. Estas neuronas son sensibles a glucosa, ácidos grasos, lactato, cuerpos cetónicos, así como a hormonas periféricas como la leptina, insulina y ghrelina. Se sabe que se encuentran ubicadas en el VMH y el ARC, así como en muchos otros sitios del cerebro que, en conjunto, forman una red distribuida que monitorea y regula el estado metabólico del cuerpo [84, 85]. Además, en este experimento nosotros decidimos realizar el conteo de neuronas activadas por glucosa subdividiendo al VMH en el área dorsomedial y el área ventromedial, ya que se ha observado que en el área dorsomedial se encuentran mayoritariamente las neuronas que responden a glucosa, además de que en esta subárea también se han localizado neuronas SF-1 activadas por leptina [86].

En el VMH se ha demostrado que un subconjunto de neuronas detectan cambios en la concentración de glucosa ambiental e incluyen neuronas excitadas por glucosa (GE) e inhibidas por glucosa (GI), cuya frecuencia de potencial de acción aumenta o disminuye respectivamente, a medida que aumentan los niveles de glucosa [87]. De hecho, algunos estudios han sugerido que las señales metabólicas en las neuronas SF-1 están

relacionadas con la termogénesis inducida por la dieta [81], por lo que, la activación de SF-1 especialmente con HFD es necesaria para la homeostasis del peso corporal normal. Con respecto a esto, y siguiendo acorde con nuestros resultados anteriores, pudimos observar que la estimulación con glucosa efectivamente activa a las neuronas del VMH de ratones *Bmal1* cKO HFD (específicamente en el área dorsomedial), muy parecidamente a la activación neuronal de los grupos con CD y muy por encima de la activación que se observan en las neuronas del grupo WT HFD (Figura 21).

Estos resultados están de acuerdo con los antecedentes, ya que la activación neuronal en el VMH puede estar indicando un aumento en la señalización para inducir la termogénesis y la actividad en general de BAT, cuya actividad aumentada mantendría un equilibrio más neutro del balance energético que los ratones WT en respuesta a HFD. Como es de esperarse, al no haber una respuesta a glucosa apropiada en los WT HFD, no se dará la señalización requerida a nivel central para aumentar el gasto energético y la termogénesis y por lo tanto este grupo no logrará mantener una homeostasis energética y aumentará de peso de acuerdo con la cantidad de calorías consumidas, que fue lo que en realidad sucedió. Varios estudios sugieren que un aumento en el nivel de glucosa en sangre, va a desencadenar la activación de neuronas GE en el VMH, lo que dará como resultado la activación del SNS y el consiguiente aumento de la sensibilidad a la insulina y la captación de glucosa en BAT [87].

Estos estudios neuronales también fueron importantes para nosotros sobre todo por la fuerte influencia que ejercen los astrocitos sobre la modulación sináptica. Un astrocito puede coordinar la actividad de múltiples conjuntos de sinapsis contiguas, mediante la regulación de los niveles de neurotransmisores en la hendidura sináptica, a través del control del espacio extracelular o mediante la liberación de señales químicas que modulan activamente la transmisión sináptica, denominados gliotransmisores [46].

A nivel hipotalámico, en los circuitos neuronales que regulan el balance energético, en respuesta a señales metabólicas y hormonales, los astrocitos experimentan cambios estructurales y morfológicos que influyen funcionalmente a las sinapsis dentro del

sistema hipotalámico de la melanocortina, lo que en última instancia afecta la conducta alimentaria. Además el intercambio de metabolitos y hormonas a través de la BBB depende de los astrocitos y depende tanto del estado de sueño/vigilia como del reloj circadiano [46]. Por lo que, es de esperar que algún cambio funcional en los astrocitos influirá directamente en el comportamiento de las neuronas implicadas en el control del balance energético. Nuestros resultados sugieren que la alteración del reloj molecular de los astrocitos trae consigo una fuerte influencia sobre las neuronas hipotalámicas dedicadas a la regulación de la homeostasis energética, ya que los ratones *Bmal1* cKO HFD, presentan mayor activación neuronal en VMH que coincide con mejor control glicémico y aumento de la sensibilidad a la insulina en respuesta a la glucosa. Así mismo, en condiciones basales, estos animales muestran mayor termogénesis y gasto energético, lo cual en conjunto se ve reflejado en su composición y peso corporal disminuido a pesar de estar consumiendo alimentos altos en calorías.

Otro punto importante que conocemos es que la coordinación entre la ingesta y el gasto energético son procesos complejos que están influenciados por señales tanto periféricas como centrales, y a pesar de la compresión de los circuitos neuronales que controlan el equilibrio energético, sólo recientemente se ha reconocido que la activación de las células gliales, como los astrocitos en respuesta a la ganancia de peso inducida por una dieta alta en grasa, se acompaña de un aumento de la producción glial de citocinas y la activación de vías de señalización inflamatorias en el hipotálamo [49].

Evidencias experimentales muestran que la obesidad y el consumo excesivo de calorías desencadenan una respuesta inflamatoria en los tejidos metabólicos periféricos impulsados por la entrada y la activación de células inmunes [88]. En particular se han identificado procesos inflamatorios hipotalámicos que han sido relacionados con un desbalance en el control metabólico y con la patogénesis de la obesidad. En este sentido, se sabe que la astrogliosis reactiva en el hipotálamo puede ser una respuesta primaria o secundaria al exceso dietético, ya que la alimentación con HFD ha dado como

resultado la acumulación y activación de astrocitos en el hipotálamo, aludiendo a la posibilidad de que la astrogliosis hipotalámica altere el equilibrio energético [89].

Con respecto a esto, se han encontrado en algunos estudios que la reducción de la señalización inflamatoria de los astrocitos mediante la delección específica de IKK β protege a los ratones de la inflamación hipotalámica inducida por HFD y reduce las anomalías metabólicas producidas por los malos hábitos alimenticios [90]. Estos datos apoyan la noción de que la inflamación de los astrocitos interrumpe la regulación hipotalámica del equilibrio energético y promueve la DIO.

En los experimentos realizados por Douglass J. D. et al., 2017, en los cuales se evaluó el modelo IKK β -KO con HFD, se observó que dichos ratones redujeron el aumento de peso asociado a HFD; además, se realizaron experimentos de calorimetría indirecta, donde se observó un aumento en el gasto energético y adicional a eso, se evaluó la homeostasis de la glucosa, mostrando que los ratones IKK β -KO con HFD mejoran la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina después de la divergencia de peso corporal [90]. Indudablemente, estos resultados nos recuerdan al fenotipo metabólico encontrado en los ratones Bmal1 cKO HFD, pues al igual que estos, observamos una disminución en el aumento de peso (Figuras 11 y 12), aumento en el gasto energético (Figura 14), mejoramiento de la tolerancia a la glucosa (Figura 15) y de la sensibilidad a la insulina (Figura 16). Estas semejanzas en las respuestas metabólicas a la dieta alta en grasa podrían estarnos indicando que, con la ablación del reloj circadiano de los astrocitos, se afecta también a las vías inflamatorias que producen los fenotipos de obesidad como en el modelo IKK β -KO con HFD, confirmando una conexión entre la capacidad inflamatoria de los astrocitos y el reloj circadiano de los astrocitos. Indudablemente no podemos asegurar esta suposición, ya que harían falta más estudios y experimentos para saber si realmente hay una afectación de las vías inflamatorias en nuestro modelo de ratones cKO.

Por otro lado, hablando de los resultados en el comportamiento de nuestros ratones, nosotros pudimos observar en los resultados del test de depresión, que existe una

disminución significativa y mayormente notable durante ZT4 del comportamiento tipo depresivo en ambos grupos cKO (dieta CD y HFD), ya que los dos grupos cKO mostraron menor tiempo de inmovilidad durante la prueba de nado forzado (Figura 20), indicándonos que estos ratones muestran una disminución del comportamiento tipo depresivo en comparación con sus compañeros WT.

Mirando las diferencias del comportamiento tipo depresivo entre los grupos de HFD podemos relacionar los resultados con la composición de masa grasa corporal en estos dos grupos, pues como hemos visto (Figura 12), los ratones cKO disminuyen su adiposidad y eso puede estar directamente relacionado con su estado depresivo, ya que existe un gran número de estudios epidemiológicos y de metaanálisis que han confirmado la asociación entre la depresión y la obesidad como condiciones médicas comúnmente coexistentes [91].

Se sabe que los mecanismos que vinculan a estas dos condiciones incluyen la desregulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), inflamación, estrés oxidativo y disfunción endocrina. Por ejemplo, la adiposidad central en la obesidad es una fuente de citocinas inflamatorias que promueven la neuro inflamación, al igual que el establecimiento de la depresión en la cual hay inflamación crónica [91]. Por otro lado, las alteraciones metabólicas a consecuencia de la obesidad conducen a aumentos en los niveles de cortisol, leptina e insulina, colaborando con la desregulación del HHA y la resistencia a insulina, induciendo mayor inflamación y empeorando la depresión. Por lo que podemos decir que existe una asociación recíproca entre la obesidad y la depresión, de modo que un organismo deprimido, tiene más probabilidad de aumentar de peso en exceso, debido a su mala elección de alimentos y a la reducción de la actividad física, y un individuo obeso aumentara sus probabilidades de sentir depresión [92]. Con respecto a la elección en el tipo de comida, esto también coincide con la disminución por el gusto de comidas dulces o altamente palatables por parte del grupo Bmal1 cKO a ZT4 (Figura 19), pues distintos datos concuerdan con que existen evidencias que muestran que el estrés (el cual induce depresión) induce una

alimentación tipo “atraco” independientemente del estado metabólico, el alimento palatable pudiendo “compensar” el estado de ánimo depresivo [93-95]. Notablemente este efecto fue mucho más acentuado en los animales alimentados con dieta HFD, lo cual podría estar relacionado con una reducción de procesos inflamatorios en el cerebro como ya he comentado.

El estado de ánimo y el estado metabólico están relacionados directamente con el apetito y la elección de alimentos. Comer un alimento sabroso, puede modificar el estado emocional, al producir un sentimiento de comodidad, gratificación o disgusto. Estos sentimientos y emociones positivas (efecto gratificante y hedónico) a la comida, juegan un papel muy importante en la sobrealimentación y el desarrollo de la obesidad. Los efectos gratificantes de los alimentos están modulados por los estados internos del animal como los indicadores homeostáticos de la saciedad; por lo tanto, un estímulo alimentario que es placentero cuando el organismo se encuentra en estado hambriento, puede volverse desagradable al entrar en un estado de saciedad [35], algo que también coincide con el comportamiento alimenticio de los Bmal1 cKO HFD, pues como podemos recordar, estos ratones mantienen sus niveles de saciedad normales a pesar de haberlos retado con un ayuno largo (12 hrs.), es decir que, a pesar de no haber consumido alimentos en un largo periodo, se seguían sintiendo saciados, pues no presentaron comportamiento hambriento ni hiperfágico, alimentándose de manera normal cuando se les devolvió el alimento (Anexo 2). Es por ende posible que la señalización constante de saciedad les impida tener una señalización gratificante en respuesta a alimentos apetitosos. Tomando en cuenta estos resultados, y la interacción de los distintos núcleos hipotalámicos, para mantener el equilibrio energético a través de respuestas metabólicas y de comportamiento, podemos intuir que los ratones Bmal1 cKO muestran una reducción en la actividad de los circuitos relacionados con la recompensa.

Aunado a este comportamiento, existe una creciente evidencia de que los sistemas metabólicos y circadiano están interconectados a nivel transcripcional, ya que los

análisis genómicos han revelado que tanto los relojes neurales como los periféricos regulan la periodicidad de 24h de la transcripción de genes metabólicos como por ejemplo los que median los pasos que limitan la velocidad en la glucólisis, la oxidación de ácidos grasos y la fosforilación oxidativa, lo que indica que estos procesos están preparados para ocurrir en el momento óptimo durante los ciclos de utilización de glucosa y ácidos grasos [19]. Las dietas inapropiadas como las que contienen demasiada grasa pueden alterar el reloj, alterar los ritmos de comportamiento y la expresión circadiana de los genes que controlan la utilización de combustible en el hipotálamo, el hígado y el tejido adiposo [27]. Además de que los horarios de la ingesta de alimento también estarán alterando las respuestas metabólicas.

La evidencia de la existencia de relojes circadianos en los astrocitos y los estudios recientes acerca del papel del reloj circadiano en el control energético insinúan que el reloj molecular de los astrocitos podría estar modulando directa o indirectamente el balance energético [46, 54], ya que los relojes circadianos son capaces de modificar los comportamientos y la expresión circadiana de genes relacionados con el metabolismo de glucosa.

Aunque no están aclarados los mecanismos por los cuales las células gliales hipotalámicas regulan el equilibrio energético, se sabe que influye principalmente a través de la activación de receptores y transportadores gliales para diversas hormonas y factores metabólicos [89]. La mayoría de los procesos fisiológicos regulados por los niveles de glucosa, tienen un control central impulsado por la presencia de las neuronas sensibles a la glucosa [32].

Los resultados presentados aquí, tanto metabólicos como de comportamiento, nos muestran en conjunto que el reloj circadiano de los astrocitos está influenciando de alguna manera el metabolismo energético periférico a través del control central del hipotálamo trayendo consigo respuestas mejoradas en la homeostasis ante el consumo de una dieta alta en grasas.

XI. CONCLUSIÓN

En resumen, concluimos que la disrupción del reloj circadiano mediante la ablación de *Bmal1* únicamente en los astrocitos, reduce la adiposidad de ratones inducida por el consumo de una dieta alta en grasas. Así mismo, estos ratones presentan un aumento del gasto energético sobre todo durante el periodo nocturno y son capaces de mantener la amplitud en oscilación normal de la temperatura dependiendo de la hora del día (lo cual puede estar relacionado con el correcto funcionamiento del tejido adiposo pardo). En cuanto al control del metabolismo de glucosa y ácidos grasos, se observó un mejoramiento, que demuestra el vínculo entre la señalización de los astrocitos y los circuitos neuronales hipotalámicos que regulan múltiples aspectos del equilibrio energético y metabolismo periférico.

Además de esta mejora en las respuestas metabólicas, observamos también que el grupo *Bmal1* cKO alimentado con HFD tiende a reducir en el comportamiento tipo depresivo a pesar de su tipo de alimentación y aunado a eso, pudimos observar que después de un periodo de ayuno, este mismo grupo presenta un comportamiento de saciedad y consumo de alimento normal.

Logramos observar el importante control del núcleo ventromedial del hipotálamo y su capacidad de activación en respuesta a la glucosa, así como su control central en la termogénesis y su importante papel en la regulación del equilibrio energético.

En general, este estudio resalta la importancia de las células no neuronales en la enfermedad metabólica y demuestran el potencial de las intervenciones dirigidas por astrocitos para proporcionar nuevas terapias contra la obesidad.

Dada la epidemia actual de obesidad y su morbilidad cardiovascular y de otro tipo, encontrar vías novedosas para la intervención terapéutica, será de gran interés en el futuro previsible.

XII. RESUMEN GRÁFICO

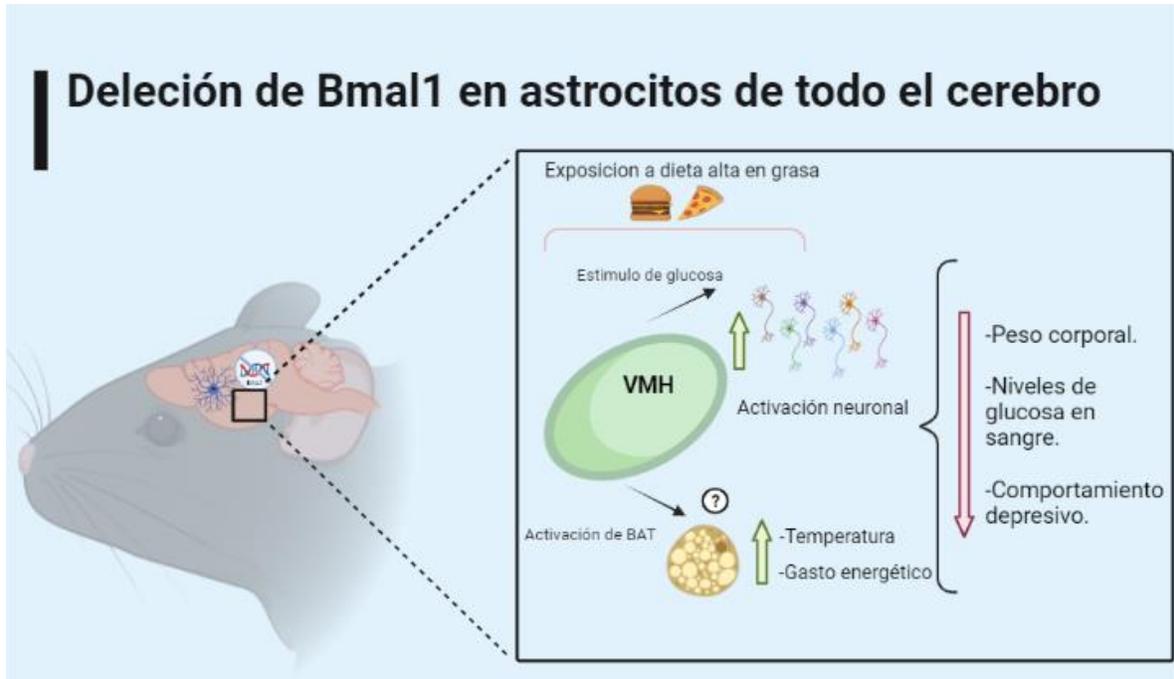


Fig. 22 Modelo knockout de Bmal1 en astrocitos de todo el cerebro. La deleción del gen del reloj Bmal1 en el celular que expresan GFAP (astrocitos) aunado a la exposición de una dieta alta en grasa, provoca cambios en el metabolismo energético de todo el organismo. Manteniendo oscilaciones normales en los cambios de temperatura, aumentando el gasto energético, y manteniendo la actividad neuronal en el núcleo ventromedial del hipotálamo como en condiciones de dieta normo calórica. (Created with BioRender.com)

XIII. PERSPECTIVAS

- Realizar un análisis de la expresión de genes relacionados con el metabolismo en páncreas, hígado, tejido adiposo pardo, tejido adiposo blanco e intestino.
- Extraer cerebro de ratones a ZT16 para observar la función neuronal en respuesta al estímulo de glucosa.
- El trabajo se enfocará en el núcleo ventromedial del hipotálamo, por lo que se realizará un análisis transcriptómico de este núcleo para evaluar la expresión circadiana de distintos genes y observar si hay alteraciones que estén relacionadas con el tejido adiposo pardo o con las funciones que observamos alteradas en este estudio.
- Extraer el tejido adiposo pardo y realizar un análisis transcriptómico para observar la expresión circadiana de genes involucrados en la adiposidad y el gasto energético.

XIV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yang, G., et al., *Timing of expression of the core clock gene Bmal1 influences its effects on aging and survival*. *Sci Transl Med*, 2016. **8**(324): p. 324ra16.
2. Bunger, M.K., et al., *Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals*. *Cell*, 2000. **103**(7): p. 1009-17.
3. Staels, B., *When the Clock stops ticking, metabolic syndrome explodes*. *Nat Med*, 2006. **12**(1): p. 54-5; discussion 55.
4. Reppert, S.M. and D.R. Weaver, *Molecular analysis of mammalian circadian rhythms*. *Annu Rev Physiol*, 2001. **63**: p. 647-76.
5. Orozco-Solis, R., et al., *The Circadian Clock in the Ventromedial Hypothalamus Controls Cyclic Energy Expenditure*. *Cell Metab*, 2016. **23**(3): p. 467-78.
6. Kolbe, I., N. Brehm, and H. Oster, *Interplay of central and peripheral circadian clocks in energy metabolism regulation*. *J Neuroendocrinol*, 2019. **31**(5): p. e12659.
7. Radziuk, J.M., *The suprachiasmatic nucleus, circadian clocks, and the liver*. *Diabetes*, 2013. **62**(4): p. 1017-9.
8. Schibler, U. and P. Sassone-Corsi, *A web of circadian pacemakers*. *Cell*, 2002. **111**(7): p. 919-22.
9. Hastings, M.H., E.S. Maywood, and M. Brancaccio, *Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus*. *Nat Rev Neurosci*, 2018. **19**(8): p. 453-469.
10. Ding, G., et al., *Central Circadian Clock Regulates Energy Metabolism*. *Adv Exp Med Biol*, 2018. **1090**: p. 79-103.
11. Greco, C.M. and P. Sassone-Corsi, *Circadian blueprint of metabolic pathways in the brain*. *Nat Rev Neurosci*, 2019. **20**(2): p. 71-82.
12. Albrecht, U., *The circadian clock, metabolism and obesity*. *Obes Rev*, 2017. **18 Suppl 1**: p. 25-33.
13. Froy, O., *Metabolism and Circadian Rhythms—Implications for Obesity*. *Endocrine Reviews*, 2010. **31**(1): p. 1-24.
14. Richards, J. and M.L. Gumz, *Mechanism of the circadian clock in physiology*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2013. **304**(12): p. R1053-64.
15. Turek, F.W., et al., *Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice*. *Science*, 2005. **308**(5724): p. 1043-5.
16. Kondratov, R.V., et al., *Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock*. *Genes Dev*, 2006. **20**(14): p. 1868-73.
17. Barca-Mayo, O., et al., *Deletion of astrocytic BMAL1 results in metabolic imbalance and shorter lifespan in mice*. *Glia*, 2020. **68**(6): p. 1131-1147.

18. 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.
19. Marcheva, B., et al., *Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes*. Nature, 2010. **466**(7306): p. 627-31.
20. Shimba, S., et al., *Deficient of a clock gene, brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), induces dyslipidemia and ectopic fat formation*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e25231.
21. Guo, B., et al., *The clock gene, brain and muscle Arnt-like 1, regulates adipogenesis via Wnt signaling pathway*. FASEB J, 2012. **26**(8): p. 3453-63.
22. Paschos, G.K., et al., *Obesity in mice with adipocyte-specific deletion of clock component Arntl*. Nat Med, 2012. **18**(12): p. 1768-77.
23. Storch, K.F., et al., *Intrinsic circadian clock of the mammalian retina: importance for retinal processing of visual information*. Cell, 2007. **130**(4): p. 730-741.
24. Rudic, R.D., et al., *BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis*. PLoS Biol, 2004. **2**(11): p. e377.
25. Goossens, G.H., *The Metabolic Phenotype in Obesity: Fat Mass, Body Fat Distribution, and Adipose Tissue Function*. Obes Facts, 2017. **10**(3): p. 207-215.
26. Jiang, P. and F.W. Turek, *The endogenous circadian clock programs animals to eat at certain times of the 24-hour day: What if we ignore the clock?* Physiol Behav, 2018. **193**(Pt B): p. 211-217.
27. Hastings, M.H., E.S. Maywood, and A.B. Reddy, *Two decades of circadian time*. J Neuroendocrinol, 2008. **20**(6): p. 812-9.
28. Tapia-Osorio, A., et al., *Disruption of circadian rhythms due to chronic constant light leads to depressive and anxiety-like behaviors in the rat*. Behav Brain Res, 2013. **252**: p. 1-9.
29. Stuber, G.D. and R.A. Wise, *Lateral hypothalamic circuits for feeding and reward*. Nat Neurosci, 2016. **19**(2): p. 198-205.
30. Seong, J., et al., *Hypothalamic inflammation and obesity: a mechanistic review*. Arch Pharm Res, 2019. **42**(5): p. 383-392.
31. Keeseey, R.E. and T.L. Powley, *Body energy homeostasis*. Appetite, 2008. **51**(3): p. 442-5.
32. Lopez-Gambero, A.J., et al., *Brain Glucose-Sensing Mechanism and Energy Homeostasis*. Mol Neurobiol, 2019. **56**(2): p. 769-796.
33. Lustig, R.H., *Childhood obesity: behavioral aberration or biochemical drive? Reinterpreting the First Law of Thermodynamics*. Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2006. **2**(8): p. 447-58.
34. Jennings, J.H., et al., *Visualizing hypothalamic network dynamics for appetitive and consummatory behaviors*. Cell, 2015. **160**(3): p. 516-27.
35. Saper, C.B., T.C. Chou, and J.K. Elmquist, *The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating*. Neuron, 2002. **36**(2): p. 199-211.
36. Fulton, S., *Appetite and reward*. Front Neuroendocrinol, 2010. **31**(1): p. 85-103.

37. King, B.M., *The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight*. *Physiol Behav*, 2006. **87**(2): p. 221-44.
38. Brobeck, J.R., J. Tepperman, and C.N. Long, *Experimental Hypothalamic Hyperphagia in the Albino Rat*. *Yale J Biol Med*, 1943. **15**(6): p. 831-53.
39. Timper, K. and J.C. Bruning, *Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity*. *Dis Model Mech*, 2017. **10**(6): p. 679-689.
40. Myers, M.G., Jr. and D.P. Olson, *Central nervous system control of metabolism*. *Nature*, 2012. **491**(7424): p. 357-63.
41. Camandola, S., *Astrocytes, emerging stars of energy homeostasis*. *Cell Stress*, 2018. **2**(10): p. 246-252.
42. Souza, D.G., et al., *The astrocyte biochemistry*. *Semin Cell Dev Biol*, 2019. **95**: p. 142-150.
43. von Bernhardi, R., et al., *Glial Cells and Integrity of the Nervous System*. *Adv Exp Med Biol*, 2016. **949**: p. 1-24.
44. Vasile, F., E. Dossi, and N. Rouach, *Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain*. *Brain Struct Funct*, 2017. **222**(5): p. 2017-2029.
45. Garcia-Caceres, C., et al., *Emerging role of glial cells in the control of body weight*. *Mol Metab*, 2012. **1**(1-2): p. 37-46.
46. Jackson, F.R., *Glial cell modulation of circadian rhythms*. *Glia*, 2011. **59**(9): p. 1341-50.
47. Yi, C.X., et al., *A role for astrocytes in the central control of metabolism*. *Neuroendocrinology*, 2011. **93**(3): p. 143-9.
48. Stein, L.M., et al., *Dorsal vagal complex and hypothalamic glia differentially respond to leptin and energy balance dysregulation*. *Transl Psychiatry*, 2020. **10**(1): p. 90.
49. Fuente-Martin, E., et al., *Ghrelin Regulates Glucose and Glutamate Transporters in Hypothalamic Astrocytes*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 23673.
50. Garcia-Caceres, C., et al., *Astrocytic Insulin Signaling Couples Brain Glucose Uptake with Nutrient Availability*. *Cell*, 2016. **166**(4): p. 867-880.
51. Kim, J.G., et al., *Leptin signaling in astrocytes regulates hypothalamic neuronal circuits and feeding*. *Nat Neurosci*, 2014. **17**(7): p. 908-10.
52. Ben Haim, L. and D.H. Rowitch, *Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation*. *Nat Rev Neurosci*, 2017. **18**(1): p. 31-41.
53. Miller, B.H., et al., *Circadian and CLOCK-controlled regulation of the mouse transcriptome and cell proliferation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(9): p. 3342-7.
54. Brancaccio, M., et al., *Astrocytes Control Circadian Timekeeping in the Suprachiasmatic Nucleus via Glutamatergic Signaling*. *Neuron*, 2017. **93**(6): p. 1420-1435 e5.
55. Fontaine, D.A. and D.B. Davis, *Attention to Background Strain Is Essential for Metabolic Research: C57BL/6 and the International Knockout Mouse Consortium*. *Diabetes*, 2016. **65**(1): p. 25-33.

56. Schreyer, S.A., D.L. Wilson, and R.C. LeBoeuf, *C57BL/6 mice fed high fat diets as models for diabetes-accelerated atherosclerosis*. *Atherosclerosis*, 1998. **136**(1): p. 17-24.
57. Deacon, R.M., et al., *A comparison of the behavior of C57BL/6 and C57BL/10 mice*. *Behav Brain Res*, 2007. **179**(2): p. 239-47.
58. Rajewsky, K., et al., *Conditional gene targeting*. *J Clin Invest*, 1996. **98**(3): p. 600-3.
59. Friedel, R.H., et al., *Generating conditional knockout mice*. *Methods Mol Biol*, 2011. **693**: p. 205-31.
60. Widdowson, E.M., *Assessment of the energy value of human foods*. *Proc Nutr Soc*, 1955. **14**(2): p. 142-54.
61. Galgani, J.E., S.R. Smith, and E. Ravussin, *Assessment of EchoMRI-AH versus dual-energy X-ray absorptiometry to measure human body composition*. *Int J Obes (Lond)*, 2011. **35**(9): p. 1241-6.
62. Ferrannini, E., *The theoretical bases of indirect calorimetry: a review*. *Metabolism*, 1988. **37**(3): p. 287-301.
63. Argmann, C.A., M.F. Champy, and J. Auwerx, *Evaluation of energy homeostasis*. *Curr Protoc Mol Biol*, 2006. **Chapter 29**: p. Unit 29B 1.
64. Orozco-Solis, R., et al., *SIRT1 Relays Nutritional Inputs to the Circadian Clock Through the Sf1 Neurons of the Ventromedial Hypothalamus*. *Endocrinology*, 2015. **156**(6): p. 2174-2184.
65. Lowe, M.R. and M.L. Butryn, *Hedonic hunger: a new dimension of appetite?* *Physiol Behav*, 2007. **91**(4): p. 432-9.
66. Bogdanova, O.V., et al., *Factors influencing behavior in the forced swim test*. *Physiol Behav*, 2013. **118**: p. 227-39.
67. Hatori, M. and S. Panda, *CRY links the circadian clock and CREB-mediated gluconeogenesis*. *Cell Res*, 2010. **20**(12): p. 1285-8.
68. Spiegelman, B.M. and J.S. Flier, *Obesity and the regulation of energy balance*. *Cell*, 2001. **104**(4): p. 531-43.
69. Garcia-Caceres, C., et al., *Role of astrocytes, microglia, and tanycytes in brain control of systemic metabolism*. *Nat Neurosci*, 2019. **22**(1): p. 7-14.
70. Argente-Arizon, P., et al., *Glial cells and energy balance*. *J Mol Endocrinol*, 2017. **58**(1): p. R59-R71.
71. Eckel-Mahan, K.L., et al., *Reprogramming of the circadian clock by nutritional challenge*. *Cell*, 2013. **155**(7): p. 1464-78.
72. Montgomery, M.K., et al., *Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding*. *Diabetologia*, 2013. **56**(5): p. 1129-39.
73. Trayhurn, P., *Thermoregulation in the diabetic-obese (db/db) mouse. The role of non-shivering thermogenesis in energy balance*. *Pflugers Arch*, 1979. **380**(3): p. 227-32.
74. Lowell, B.B., et al., *Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue*. *Nature*, 1993. **366**(6457): p. 740-2.
75. Harms, M. and P. Seale, *Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential*. *Nat Med*, 2013. **19**(10): p. 1252-63.

76. Bastias-Perez, M., et al., *Impact of Adaptive Thermogenesis in Mice on the Treatment of Obesity*. *Cells*, 2020. **9**(2).
77. Contreras, C., et al., *Traveling from the hypothalamus to the adipose tissue: The thermogenic pathway*. *Redox Biol*, 2017. **12**: p. 854-863.
78. Rothwell, N.J. and M.J. Stock, *A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis*. *Obes Res*, 1997. **5**(6): p. 650-6.
79. Yu, X.X., et al., *Cold elicits the simultaneous induction of fatty acid synthesis and beta-oxidation in murine brown adipose tissue: prediction from differential gene expression and confirmation in vivo*. *FASEB J*, 2002. **16**(2): p. 155-68.
80. Ricquier, D., *UCP1, the mitochondrial uncoupling protein of brown adipocyte: A personal contribution and a historical perspective*. *Biochimie*, 2017. **134**: p. 3-8.
81. Kim, K.W., et al., *Steroidogenic factor 1 directs programs regulating diet-induced thermogenesis and leptin action in the ventral medial hypothalamic nucleus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(26): p. 10673-8.
82. Sakaguchi, T., K. Arase, and G.A. Bray, *Sympathetic activity and food intake of rats with ventromedial hypothalamic lesions*. *Int J Obes*, 1988. **12**(4): p. 285-91.
83. Majdic, G., et al., *Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity*. *Endocrinology*, 2002. **143**(2): p. 607-14.
84. Levin, B.E., *Metabolic sensors: viewing glucosensing neurons from a broader perspective*. *Physiol Behav*, 2002. **76**(3): p. 397-401.
85. Le Foll, C. and B.E. Levin, *Fatty acid-induced astrocyte ketone production and the control of food intake*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2016. **310**(11): p. R1186-92.
86. Dhillon, H., et al., *Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis*. *Neuron*, 2006. **49**(2): p. 191-203.
87. Shimazu, T. and Y. Minokoshi, *Systemic Glucoregulation by Glucose-Sensing Neurons in the Ventromedial Hypothalamic Nucleus (VMH)*. *J Endocr Soc*, 2017. **1**(5): p. 449-459.
88. Lumeng, C.N. and A.R. Saltiel, *Inflammatory links between obesity and metabolic disease*. *J Clin Invest*, 2011. **121**(6): p. 2111-7.
89. Zhou, Y.D., *Glial Regulation of Energy Metabolism*. *Adv Exp Med Biol*, 2018. **1090**: p. 105-121.
90. Douglass, J.D., et al., *Astrocyte IKKbeta/NF-kappaB signaling is required for diet-induced obesity and hypothalamic inflammation*. *Mol Metab*, 2017. **6**(4): p. 366-373.
91. Jantaratnotai, N., et al., *The interface of depression and obesity*. *Obes Res Clin Pract*, 2017. **11**(1): p. 1-10.
92. Hryhorczuk, C., S. Sharma, and S.E. Fulton, *Metabolic disturbances connecting obesity and depression*. *Front Neurosci*, 2013. **7**: p. 177.

93. Hagan, M.M., et al., *The role of palatable food and hunger as trigger factors in an animal model of stress induced binge eating*. *Int J Eat Disord*, 2003. **34**(2): p. 183-97.
94. Warne, J.P., *Shaping the stress response: interplay of palatable food choices, glucocorticoids, insulin and abdominal obesity*. *Mol Cell Endocrinol*, 2009. **300**(1-2): p. 137-46.
95. Adam, T.C. and E.S. Epel, *Stress, eating and the reward system*. *Physiol Behav*, 2007. **91**(4): p. 449-58.

ANEXO 1. Composición de la dieta normocalórica e hipercalórica

2018S



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, manganous 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.

Standard Product Form: *Pellet*

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

Vitamins		
Vitamin A ^{e, f}	IU/g	30.0
Vitamin D ₃ ^{e, g}	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
C18:1n-9 Oleic	%	1.2
C18:2n-6 Linoleic	%	3.1
C18:3n-3 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.

^f 1 IU vitamin A = 0.3 µg retinol

^g 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 Diets are designed and manufactured for research purposes only.



© 2015 Envigo

0915

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

DIO Rodent Purified Diet w/60% Energy From Fat - Blue

58Y1

DESCRIPTION

Diet Induced Obesity Rodent Purified Diet with 60% Energy From Fat - Dyed Blue is based on AIN-76A Semi-Purified Diet, Rat or Mouse 5800-B. See Van Heek et al., J. Clin. Invest. 99:385-390, 1997, for initial use of this formula. Originally manufactured as "D12492".

Storage conditions are particularly critical to TestDiet® products, due to the absence of antioxidants or preservative agents. To provide maximum protection against possible changes during storage, store in a dry, cool location. Storage under refrigeration (2° C) is recommended. Maximum shelf life is six months. (If long term studies are involved, storing the diet at -20° C or colder may prolong shelf life.) Be certain to keep in air tight containers.

Product Forms Available*	Catalog #
1/2" Pellet	58126
1/2" Pellet, Irradiated	56833
Meal	1810473

*Other Forms Available By Request

INGREDIENTS

Lard	31.6600
Casein - Vitamin Free	25.8450
Maltodextrin	16.1530
Sucrose	8.8470
Powdered Cellulose	6.4610
Soybean Oil	3.2310
Potassium Citrate, Tribasic Monohydrate	2.1320
Calcium Phosphate	1.6800
AIN-76A Vitamin Mix	1.2920
DIO Mineral Mix	1.2920
Calcium Carbonate	0.7110
L-Cystine	0.3880
Choline Bitartrate	0.2580
Blue Dye #1	0.0500

Part of the TestDiet® "Blue-Pink-Yellow" DIO Series ("van Heek" Series)

DIO Rodent Purified Diet w/10% Energy From Fat - Yellow
 1/2" Pellet - Catalog # 58124 (58Y2)
 Meal - Catalog # 56834 (58Y2)

DIO Rodent Purified Diet w/45% Energy From Fat - Red
 1/2" Pellet - Catalog # 58125 (58V8)
 1/2" Pellet, Irradiated - Catalog # 55629 (58V8)
 Meal - Catalog # 1810729 (58V8)
 Meal, Irradiated - Catalog # 1810730 (58V8)

FEEDING DIRECTIONS

Feed ad libitum. Plenty of fresh, clean water should be available at all times.

CAUTION:

Perishable - store properly upon receipt.
 For laboratory animal use only, not for human consumption.

9/14/2010

NUTRITIONAL PROFILE ¹

Protein, %		23.1	Minerals	
Arginine, %	0.90	Calcium, %	0.79	
Histidine, %	0.67	Phosphorus, %	0.59	
Isoleucine, %	1.24	Phosphorus (available), %	0.59	
Leucine, %	2.24	Potassium, %	0.77	
Lysine, %	1.88	Magnesium, %	0.07	
Methionine, %	0.67	Sodium, %	0.15	
Cystine, %	0.48	Chlorine, %	0.25	
Phenylalanine, %	1.24	Fluorine, ppm	1.2	
Tyrosine, %	1.31	Iron, ppm	64	
Threonine, %	1.00	Zinc, ppm	46	
Tryptophan, %	0.29	Manganese, ppm	76	
Valine, %	1.47	Copper, ppm	7.8	
Alanine, %	0.71	Cobalt, ppm	0.0	
Aspartic Acid, %	1.66	Iodine, ppm	0.27	
Glutamic Acid, %	5.28	Chromium, ppm	2.6	
Glycine, %	0.50	Molybdenum, ppm	2.11	
Proline, %	3.04	Selenium, ppm	0.29	
Serine, %	1.43			
Taurine, %	0.00			
Fat, %		34.9	Vitamins	
Cholesterol, ppm	301	Vitamin A, IU/g	5.2	
Linoleic Acid, %	4.70	Vitamin D-3 (added), IU/g	1.3	
Linolenic Acid, %	0.39	Vitamin E, IU/kg	67.2	
Arachidonic Acid, %	0.06	Vitamin K (as menadione), ppm	0.65	
Omega-3 Fatty Acids, %	0.39	Thiamin Hydrochloride, ppm	7.8	
Total Saturated Fatty Acids, %	13.68	Riboflavin, ppm	8.7	
Total Monounsaturated Fatty Acids, %	14.00	Niacin, ppm	39	
		Pantothenic Acid, ppm	21	
		Folic Acid, ppm	2.8	
		Pyridoxine, ppm	7.5	
		Biotin, ppm	0.3	
		Vitamin B-12, mcg/kg	18	
		Choline Chloride, ppm	1,290	
		Ascorbic Acid, ppm	0.0	
Fiber (max), %		6.5	1. Formulation based on calculated values from the latest ingredient analysis information. Since nutrient composition of natural ingredients varies and some nutrient loss will occur due to manufacturing processes, analysis will differ accordingly. Nutrients expressed as percent of ration on an As Fed basis except where otherwise indicated.	
Carbohydrates, %		25.9	2. Energy (kcal/gm) - Sum of decimal fractions of protein, fat and carbohydrate x 4,9,4 kcal/gm respectively.	
Energy (kcal/g) ²		5.10		
From:	kcal	%		
Protein	0.924	18.1		
Fat (ether extract)	3.140	61.6		
Carbohydrates	1.035	20.3		



TestDiet
 www.testdiet.com

ANEXO 2. Arribo de saciedad en ratones WT CD, Bmal1 cKO CD, WT HFD y Bmal1 cKO HFD a dos horas diferentes del día.

