



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
Posgrado en Ciencias Bioquímicas**

TESIS

CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA RESTAURACIÓN CIRCADIANA DEL NAD⁺ SOBRE LOS PARÁMETROS METABÓLICOS Y LA HOMEOSTASIS HEPÁTICA EN UN MODELO DE OBESIDAD INDUCIDA POR LA DIETA EN RATÓN

Que para optar por el título de

Doctor en Ciencias

P R E S E N T A

M. en C. Quetzalcoatl Escalante Covarrubias

Tutora:

Dra. Lorena Aguilar Arnal

Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM

Miembros del Comité tutor:

Dr. Rudolf Buijs

Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM

Dra. Alicia González Manjarrez

Instituto de Fisiología Celular-UNAM

Ciudad Universitaria, Cd. de México, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Escalante Covarrubias Quetzalcoatl
Estudiante de Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del 22 de noviembre del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Doctorado en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**Caracterización de los efectos de la restauración circadiana del NAD+ sobre los parámetros metabólicos y la homeostasis hepática en un modelo de obesidad inducida por la dieta en ratón**", dirigida por la Dra. **Aguilar Arnal Lorena**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Hiriart Urdanivia Marcia (IFC)
VOCAL	Jaimes Hoy Elizabeth Lorraine (IBT)
VOCAL	Díaz Muñoz Mauricio (INb)
VOCAL	Torres y Torres Nimbe (INCMNSZ)
SECRETARIO	Díaz Villaseñor Andrea Sachi (IIB)

A LOS MIEMBROS DEL JURADO:

Es obligación de los tutores de este programa participar en éstas y otras actividades académicas encomendadas por nuestro Comité Académico. Sin embargo, en caso de que tenga un impedimento académico o de salud para cumplir con esta encomienda, es muy importante contar con su respuesta (Formato anexo) en un plazo no mayor a una semana.

Tome en cuenta que usted tiene **30 días hábiles** para emitir su voto con las rondas de revisión que considere necesarias.

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 22 de noviembre de 2021
COORDINADORA



Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Este trabajo fue apoyado por la Universidad Nacional Autónoma de México mediante los proyectos PAPIIT IA2017171, IN210619 e IN208022; y The International Center of Genomic Engineering and Bioinformatics Early Career Return Grant CRP/MEX16-05_EC.

Quetzalcoatl Escalante agradece a las instituciones correspondientes que, durante el plan de estudios de Doctorado, le otorgaron la beca de manutención #448972 por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), la beca de conclusión de estudios por parte la Universidad Nacional Autónoma de México, asociada al proyecto IN210619, así como la beca asociada al proyecto Human Frontiers Science Program RGY0078/2017.

El Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) sustentó la estancia en The Hospital for Sick Children en Toronto Canadá durante los estudios de Doctorado.

Se otorga un profundo agradecimiento al Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM, a la Red de apoyo a la investigación (RAI) al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, a la Unidad de Modelos Biológicos del IIB, con especial énfasis al Dr. Daniel Garzón Cortés y la MVZ. Rubí Zavala Gaytán y a la Red Interdisciplinaria de Epigenómica Mexicana (RIEM) por el apoyo académico e institucional.

Se extiende un agradecimiento a la Coordinación del posgrado en Ciencias bioquímicas, en especial a la M. en C. Norma Trejo Medina, a la Lic. Adelina González Pérez y al Lic. Julio Ignacio Palacios Ordoñez por su apoyo institucional y en la asistencia de procesos administrativos y académicos.

Le agradezco al Dr. David Ricardo Orozco Solís por compartirme sus conocimientos teóricos y técnicos, así como el recibirme en su laboratorio para proveerme de material y equipo fundamental durante el desarrollo de esta investigación.

Se le agradece a los técnicos académicos M. en C. Marcia Bustamante Zepeda, M. en C. Rafael Cervantes Roldan, Q.F.B. Mari Carmen Basualdo Sigales, M. en C. Everardo Tapia Mendoza, M. en C. Lucía del Carmen Márquez Alonso, Dr. David Eduardo Meza Sánchez y al Dr. Juan Manuel Germán Acacio por su apoyo técnico en la realización y planeación de experimentos así como en la facilitación de equipo y reactivos.

Finalmente agradezco a los integrantes de mi comité tutor: Dra. Lorena Aguilar Arnal, Dra. Alicia González Manjarrez y al Dr. Rudolph Marinus Buijs por su invaluable guía para que el presente proyecto se realizara con estricto apego a los parámetros científicos. Adicionalmente le agradezco a la Dra. Lorena Aguilar Arnal por la minuciosa labor que realizo durante el proceso de revisión del presente trabajo escrito.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

Agradezco la formación recibida por la Dra. Marina Gavilánez Ruiz y el Dr. León Patricio Martínez Castilla a quienes mi vida académica y personal siempre estará ligada.

Les agradezco a mis compañeros del laboratorio Dra. Lucía Mendoza Viveros, M. en C. Fernando Becerril Pérez, M. en C. Ignacio Pacheco Bernal, M. en C. Pablo Rojas Reyes, M. en C. Paola B. Mass Sánchez, M. en C. Ximena del Toro Ríos y M. en C. Franciso Pinta Castro por el apoyo que recibí en la ejecución del trabajo experimental y el aprendizaje teórico y práctico que siempre me dieron con gran generosidad.

Les agradezco a las familias Covarrubias y Grimaldo por su apoyo incondicional, especialmente a Raquel Covarrubias Gutiérrez que aunque no se encuentre presente sigue estando conmigo y a Ronald Acevedo Grimaldo por acompañarme en las buenas y las malas.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. Ritmos circadianos	2
2.1.1. Sincronizadores o Zeitgebers	4
2.1.2. Componentes fisiológicos del reloj circadiano en mamíferos	5
2.1.3. Los relojes periféricos	6
2.1.4. Componentes moleculares del reloj circadiano en mamíferos	7
2.1.5. Control postraduccional de los componentes moleculares del reloj circadiano	9
2.1.5.1. Fosforilación	9
2.1.5.2. Ubiquitinación	10
2.1.5.3. SUMOilación	10
2.1.5.4. Acetilación	10
2.1.6. Regulación rítmica de la expresión genética.....	11
2.1.7. Regulación epigenética de la transcripción mediada por CLOCK:BMAL1	12
2.1.8. Los ciclos circadianos y el metabolismo	14
2.1.8.1. Metabolismo circadiano de la glucosa	14
2.1.8.2. Regulación circadiana del metabolismo de lípidos	16
2.1.8.3. Interconexión entre ciclos circadianos y metabólicos: el NAD ⁺ como ejemplo paradigmático.	18
2.2. Síndrome metabólico.	22
2.2.1. Resistencia a la insulina.....	22
2.2.2. Diabetes tipo 2	23
2.2.3. Dislipidemia	24
2.3. Síndrome metabólico y ciclos circadianos	25
2.3.1. Mutaciones en la maquinaria central del reloj predisponen al síndrome metabólico... ..	25
2.3.2. El consumo de HFD altera los ritmos circadianos a nivel molecular y fisiológico	27
2.3.3. El desbalance metabólico inducido por el decaimiento en los niveles de NAD ⁺ : Producto de una dieta alta en grasa	28
2.4. En NAD ⁺ como terapia para combatir patologías relacionadas al síndrome metabólico	29
3. ANTECEDENTES INMEDIATOS	32
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33

5. HIPÓTESIS	34
6. OBJETIVO	35
6.1. Objetivos particulares	35
7. METODOLOGÍA.....	36
7.1. Esquema general de experimentación.....	36
7.2. Flujo de la estrategia experimental.....	37
7.2. Ratones y dietas	38
7.3. Estandarización del protocolo de cronoterapia para aumentar los niveles de NAD ⁺	38
7.4. Extracción de NAD ⁺ a partir de tejidos de ratón	39
7.5. Determinación de las concentraciones de NAD ⁺ por HPLC de fase reversa	39
7.6. Prueba de tolerancia a glucosa	40
7.7. Prueba de resistencia a la insulina	40
7.8. Determinación de la concentración de leptina en suero	40
7.9. Determinación de la concentración de insulina en suero de ratón mediante un ensayo de ELISA	41
7.10. Determinación de la concentración de triglicéridos a través de la oxidación del glicerol.....	42
7.11. Medición de la temperatura rectal y por termografía	42
7.12. Detección y cuantificación de gotas lipídicas en tejidos mediante la tinción con rojo oleoso	43
7.13. Extracción de RNA a partir de tejidos de ratón.....	44
7.14. Síntesis de cDNA.....	44
7.15. Cuantificación de transcritos por qRT-PCR	45
7.16. Determinación del ratio mtDNA/nDNA en hígado de ratón	45
7.17. Perfil transcripcional de hígados de ratón	46
7.18. Extracción de proteínas.....	47
7.19. Cuantificación de la concentración de proteínas por el método de Bradford.....	47
7.20. Determinación del estrés oxidante mediante la cuantificación de grupos carbonilo en hígado de ratón.	47
7.21. Detección de proteínas por Western Blot.....	48
7.22. Inmunofluorescencia contra mtCOX1	49
7.23. Determinación de los perfiles de actividad motriz y conducta alimentaria	50
7.24. Extracción de núcleo supraquiasmático de cerebros de ratón.....	50
7.25. Análisis estadístico	50
8. RESULTADOS	51

8.1. Estandarización del suministro de NAD ⁺	51
8.2. La cronoterapia con NAD ⁺ al ZT 11 restituye la rítmicidad circadiana de este metabolito en el hígado de animales alimentados con dieta hipercalórica.....	52
8.3. La cronoterapia con NAD ⁺ revierte la ganancia de peso sin alterar el consumo energético en individuos alimentados con dieta alta en grasa	53
8.4. La cronoterapia con NAD ⁺ aumenta la tolerancia a la glucosa y disminuye la resistencia a la insulina en ratones obesos.....	56
8.5. El suministro de NAD ⁺ al ZT 11 disminuye la concentración sérica de hormonas cuyo incremento predispone al desarrollo de síndrome metabólico	58
8.6. La acumulación de lípidos hepáticos disminuye como efecto de la cronoterapia al ZT 11 ...	60
8.6.1. El suministro de NAD ⁺ al ZT 11 disminuye la concentración de triglicéridos en el hígado de ratones y reestablece su oscilación circadiana	62
8.7. La cronoterapia al ZT 11 reestablece marcadores de estrés desregulados por la esteatohepatitis	64
8.8. La cronoterapia con NAD ⁺ reprogramo el transcriptoma hepático	65
8.8.1 La cronoterapia con NAD ⁺ al ZT 11 no altera la dinámica de expresión de los genes que codifican al reloj circadiano.....	65
8.8.2. La dinámica de acumulación de las proteínas del reloj no se altera cuando se suministra NAD ⁺ al ZT 11.....	67
8.8.3. La expresión diferencial de transcritos entre el ZT 6 y 18 está sujeta a reprogramación dependiente de la dieta y el suministro de NAD ⁺	68
8.9. La cronoterapia con NAD ⁺ al ZT 11 promueve rutas metabólicas que protegen en contra de la fisiopatología inducida por una dieta rica en grasa	70
8.9.1. La cronoterapia con NAD ⁺ al ZT 11 corrige la expresión anormal de genes y rutas metabólicas clave en enfermedades hepáticas relacionadas a la obesidad.....	70
8.9.2. La cronoterapia con NAD ⁺ al ZT 11 induce la expresión de programas transcripcionales que protegen de enfermedades relacionadas al síndrome metabólico	72
8.9.3. Rutas metabólicas relacionadas con la respuesta inmune y la homeostasis de nutrientes, están restituidas en los animales obesos tratados con NAD ⁺	75
8.10. La detección de nutrientes y la señalización de insulina, son reestablecidas en animales obesos cuando la oscilación del NAD ⁺ se recupera farmacológicamente	77
8.11. El NAD ⁺ suministrado al ZT 11 es más efectivo que cuando se suministra al ZT 23 para contrarrestar la fisiopatología producida por el consumo de HF	81
8.11.1. La cronoterapia aplicada al ZT 23 invirtió la acrofase del NAD ⁺ hepático al ZT 24	82
8.11.2. La hora del día determina la eficacia de NAD ⁺ como tratamiento para la disfunción metabólica inducida por la dieta.....	83
8.11.3. La proteína mtCOX1 está subexpresada en los individuos del grupo HFN23	87

8.11.4. Únicamente la cronoterapia al ZT 11 y no al ZT 23 restaura la dinámica de expresión de sensores metabólicos implicados en la regulación energética	88
8.11.5. El NAD ⁺ promueve la sobreexpresión de genes que controlan la oxidación de ácidos grasos al ZT 18 cuando es suministrado al ZT 11	90
8.12. La biodisponibilidad del NAD ⁺ determina la fase en la que se expresan los genes y proteínas del reloj circadiano, así como la expresión de los genes que controlan	94
8.13. El suministro de NAD ⁺ al ZT 23 no reorganiza el reloj circadiano del Núcleo Supraquiasmático ni tampoco afecta eventos comportamentales o de conducta alimentaria...	96
8.13.1. El NAD ⁺ suministrado a los ZT 11 y 23 mantiene de manera general los patrones de movimiento y alimentario en los individuos obesos a lo largo del ciclo circadiano.	96
8.13.2. El suministro de NAD ⁺ al ZT 23 no reorganiza el reloj circadiano del Núcleo Supraquiasmático.....	99
8.14. La cronoterapia con Nicotinamida al ZT 11 y 23 induce las mismas respuestas en las pruebas de GTT, ITT y la reprogramación del reloj circadiano que se observan con el suministro de NAD ⁺	100
9. Discusión	103
10. Conclusiones.....	111
11. Perspectivas	113
APÉNDICE A. Composición de las dietas	131
APÉNDICE B. Preparación de las soluciones para la tinción de ORO	133
B.1. Paraformaldehído al 4%.....	133
B.2. Rojo oleoso.....	133
B.3. Hematoxilina de Gill I	133
B.4. Solución de Litio	133
APÉNDICE C. Primers.....	135
APÉNDICE D. Anticuerpos	137
Apéndice E. Western blots por ZT.....	138
Apéndice F. Densitometría de las proteínas estudiadas por WB.....	145

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Las oscilaciones circadianas se ajustan a la función seno-coseno por lo que pueden estudiarse con propiedades de onda.....	3
Figura 2. El reloj circadiano posee una estructura jerárquica a nivel fisiológico.....	6
Figura 3. Bucle de retroalimentación de transcripción-traducción central en el sistema circadiano de células de mamíferos.....	8
Figura 4. Modificaciones postraduccionales que regulan la estabilidad de las proteínas del reloj....	11
Figura 5. Las fluctuaciones circadianas en los niveles de NAD ⁺ y la actividad de SIRT1 afectan la transcripción de los genes controlados por el reloj mediante la modificación de marcas epigenéticas.....	13
Figura 6. La gluconeogénesis mediada por CREB está regulada por CRY.....	16
Figura 7. El hígado suministra TG a los tejidos periféricos a través de su síntesis y transporte circadianos.....	17
Figura 8. Síntesis del NAD ⁺	19
Figura 9. Circuito de retroalimentación formado por NAMPT/SIRT1 y la maquinaria del reloj molecular.....	22
Figura 10. La dieta alta en grasa reprograma los ritmos circadianos.	28
Figura 11. Beneficios del aumento en los niveles de NAD ⁺	31
Figura 12. Esquema general de experimentación.....	36
Figura 13. Concentraciones hepáticas de NAD ⁺ en las pruebas de estandarización	51
Figura 14. La inyección de NAD ⁺ a ZT11 en animales obesos restituye la oscilación diurna hepática de este metabolito a patrones comparables con los controles.....	53
Figura 15. Ratones alimentados con HFD pierden peso tras el suministro de NAD ⁺ sin disminuir su consumo energético.....	54
Figura 16. Pruebas de tolerancia a glucosa.....	57
Figura 17. Prueba de resistencia a la insulina.....	58
Figura 18. Concentración de insulina y leptina en suero.....	59
Figura 19. Cuantificación de lípidos neutros detectados con ORO y proteínas lipogénicas de hígado de ratones CD, HF, HFN.....	61
Figura 20. Los niveles de triglicéridos descienden y recuperan su oscilación circadiana tras el tratamiento con NAD ⁺ al ZT 11.....	63
Figura 21. Concentración de PCO y mtDNA en tejido hepático.....	64
Figura 22. Genes diferencialmente expresados entre el ZT 6 y 18.....	66
Figura 23. La dinámica de las proteínas del reloj no se ve globalmente alterada por el suministro con NAD ⁺ al ZT 11.....	67
Figura 24. Transcriptoma y análisis funcional de los genes diferencialmente expresados durante el día y la noche.....	69
Figura 25. Programas transcripcionales restituidos a consecuencia de la cronoterapia al ZT 11.....	71
Figura 26. Programas transcripcionales expresados diferencialmente a consecuencia de la cronoterapia al ZT 11.....	74
Figura 27. La cronoterapia con NAD ⁺ regula a la baja procesos de inflamación y el metabolismo de colesterol inducido por la HFD.....	76
Figura 28. La cronoterapia con NAD ⁺ reestituye la expresión de proteínas que actúan como sensores metabólicos.....	79

Figura 29. Concentraciones de NAD+ a lo largo de un ciclo circadiano en individuos inyectados con este metabolito al ZT 11 y ZT 23.....	82
Figura 30. La protección contra la ganancia de peso inducida por la HFD fue más efectiva cuando el NAD+ se suministró al ZT 11.....	85
Figura 31. Abundancia de mtCOX1 en hígado de ratones obesos con tratamiento de NAD+ al ZT 11 y 23.....	87
Figura 32. Dinámica de acumulación de proteínas y sus PTMs que participan en la ruta de mTOR.....	89
Figura 33. Sobreexpresión de genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos a consecuencia del tratamiento con NAD+ al ZT 11.....	91
Figura 34. La dinámica de acumulación de las proteínas que controlan el reloj circadiano se invierte como consecuencia de suministrar NAD+ al ZT 23, al igual que los genes a los que controlan....	95
Figura 35. Consumo de alimento a lo largo del ciclo circadiano.....	97
Figura 36. Perfiles de actividad motriz y alimentaria a lo largo del ciclo circadiano.....	98
Figura 37. El suministro de NAD+ al ZT 23 no reorganiza la expresión genética de los componentes del reloj o de los genes controlados por el reloj.....	100
Figura 38. El suministro de Nicotinamida al ZT 11 detiene el aumento de peso y glucosa basal provocado por el suministro de una dieta rica en grasa.....	101
Figura 39. El tiempo de administración de NAD+, determina su eficacia para revertir la fisiopatología inducida por HFD y la configuración temporal del reloj circadiano.....	112

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Polimorfismos en genes que controlan el reloj circadiano asociados con trastornos metabólicos.....	36
Tabla Suplementaria 1. Secuencia de oligos utilizados en la reacción de qPCR	135
Tabla Suplementaria 2. Anticuerpos utilizados para la detección de proteínas por Western Blot .	137

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
<i>Arntl</i>	Aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1
AUC	Área bajo la curva
BMAL1	Brain and muscle ARNT-Like 1
CCGs	Genes controlados por el reloj circadiano
CKIe	Caseína cinasa citoplásmica
CLOCK	Circadian Locomotor Output Cycles Kaput
CRY1/2	Cryptochrome1/2
DAG	Diacil glicerol
DBP	D-Box Binding PAR BZIP Transcription Factor
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DT2	Diabetes tipo 2
FAD	Flavina adenin dinucleótido
FFA	Ácidos grasos libres
HACT	Hormona adrenocorticotrópica
HFD	Dieta alta en grasa; del inglés <i>high-fat diet</i>
IR	Resistencia a la insulina
LD	Ciclo compuesto por 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad
HSL	Lipasa sensible a hormonas
mRNA	RNA mensajero
NAD ⁺	Forma oxidada de la nicotinamida adenin dinucleótido
NAFLD	Hígado graso no alcohólico
NAMPT	Nicotinamida fosforibosil transferasa
NASH	Esteatosis hepática no alcohólica
ncRNA	RNAs que no codifica proteínas
Nr1D1	Gen que codifica a la proteína REV-ERB- α , nuclear receptor subfamily 1 group D member 1
PACAP	Polipéptido de la adenilato ciclasa de la pituitaria
PER1/2/3	Period1/2/3
PKA	Proteína cinasa dependiente de cAMP
PPAR γ	Receptor ativado por proliferadores de peroxisomas
PTMs	Modificaciones postraduccionales
PVN	Núcleo paraventricular
RNA	Ácido ribonucleico
SCN	Núcleo supraquiasmático; del inglés <i>suprachiasmatic nucleus</i>
SIRT1-7	Desacetilasa de histonas Sirtuina 1/2/3/4/5/6/7
SM	Síndrome metabólico
snRNA	RNAs nucleolares pequeños

TG

Triglicéridos

ZT

Unidad de tiempo con la que se miden los ritmos circadianos; del alemán *zeitgeber*
time

1. RESUMEN

El reloj circadiano es un sistema endógeno y autosustentable que anticipa y coordina la adaptación a las fluctuaciones ambientales diarias. Fallas en el sistema circadiano, forman parte de las características que subyacen a la obesidad y las enfermedades metabólicas, junto con concentraciones reducidas del metabolito NAD^+ , controladas por el reloj. En sincronía con estos antecedentes, el aumento de los niveles de NAD^+ , está emergiendo como una terapia para el tratamiento de la obesidad inducida por la dieta y la diabetes tipo 2; sin embargo, aún se desconoce el impacto de las fluctuaciones circadianas de NAD^+ en estos tratamientos. Usando un enfoque cronoterapéutico, demostramos que la hora del día determina la eficacia del NAD^+ como tratamiento para la enfermedad metabólica inducida por la dieta en ratones. Restaurar la oscilación circadiana del NAD^+ al inicio de la fase activa, revierte el aumento en el peso corporal, mejora la tolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina y, restaura la expresión génica hepática relacionada con la respuesta inflamatoria y el metabolismo de lípidos. Por el contrario, imponer en las concentraciones de NAD^+ oscilaciones en antifase, durante el inicio del periodo de descanso, compromete gravemente estas respuestas beneficiosas. En particular, la señalización en la detección de nutrientes hepáticos a cargo de mTOR, AMPK y AKT recuperó su rítmicidad, específicamente en ratones obesos tratados al inicio de la fase activa, mientras que permaneció desregulada en ratones tratados al inicio de la fase temprana. Sorprendentemente, la biodisponibilidad del NAD^+ apareció como un potente sincronizador del reloj molecular hepático, reorganizando su fase de acuerdo con el momento en el que se otorgó la cronoterapia con NAD^+ . Juntos, nuestros hallazgos demuestran que la hora del día es un determinante crítico de los efectos beneficiosos de las terapias basadas en NAD^+ y al mismo tiempo trazamos la estrategia básica de un enfoque terapéutico basado en la cronobiología.

2. INTRODUCCIÓN

La vida es un sistema complejo que mediante eventos evolutivos ha desarrollado mecanismos capaces de mantener el control y la regulación de su medio interno, para que el conjunto de procesos responsables de mantener la homeostasis, ocurran de modo adecuado [1]. Una de las adaptaciones más obvias en los organismos que habitan la tierra, es la capacidad de sincronizar sus actividades a un ciclo de luz oscuridad con una duración aproximada de 24 horas. Esta adaptación consiste en la modificación de su ambiente interno, provocando fluctuaciones diarias en comportamiento, aspectos fisiológicos y bioquímicos, incluyendo la concentración de muchos metabolitos y hormonas, además de cascadas cíclicas de expresión génica que se dan también en periodos de 24 horas.

Los fundamentos que regulan la oscilación rítmica de las constantes biológicas, nos permiten comprender el funcionamiento de los organismos mediante un sistema que influye de manera determinante en la organización de su operatividad, y que además posee la particularidad de actuar a diferentes niveles de complejidad como el fisiológico, el molecular y el epigenético, pero no por separado, sino sincronizando estos universos a través de una misma red informática que hace posible llegar a un punto en común: la homeostasis del organismo, que no sería posible de no estar bajo el control de un sincronizador maestro como el reloj circadiano.

2.1. Ritmos circadianos

Los ritmos circadianos regulan las oscilaciones de diversas variables biológicas en ciclos que poseen una duración de aproximadamente 24 horas que se encuentran acoplados al ciclo de luz oscuridad [2]. Precisamente es esto lo que se denota en el origen del término “circadiano”, que proviene del latín *circa diem* que se traduce como alrededor de un día.

Debido a que el establecimiento de los ritmos circadianos se realiza tomando en cuenta su ocurrencia con respecto al tiempo, las oscilaciones se caracterizan por los siguientes parámetros: su amplitud (diferencia entre los niveles máximos y mínimos expresados en la magnitud adecuada para la medición del evento), la fase (la sincronización de un punto de referencia en el ciclo en relación con un evento fijo) y el periodo (el intervalo de tiempo entre dos puntos de referencia de fase) [3] (Figura 1).

Además de los parámetros antes descritos, existen propiedades que, en conjunto, identifican a un ritmo circadiano como tal, y lo separan del resto de eventos biológicos. La

autosustentabilidad es una de estas propiedades, y se refiere a la capacidad que posee un evento biológico para continuar siendo cíclico aún en ausencia de señales externas como el día y la noche [4]. Dicha característica de expresión en los ritmos circadianos se denomina *free running* [5]. Cabe mencionar que la falta de entrenamiento del ritmo circadiano por señalizadores externos, podrá causar alteraciones en su periodo, fase y amplitud [3].

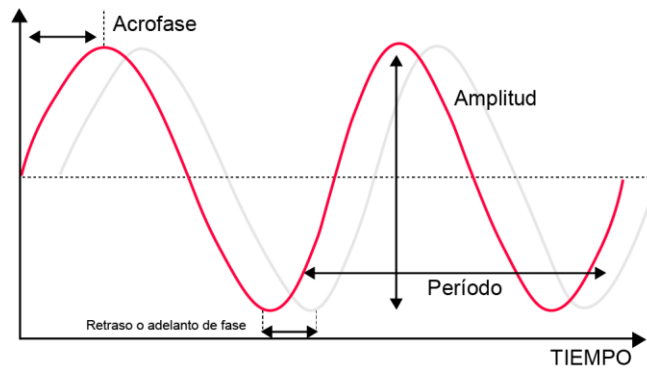


Figura 1. Las oscilaciones circadianas se ajustan a la función seno-coseno por lo que pueden estudiarse con propiedades de onda. Al registro de una oscilación circadiana puede medirse el periodo (~ 24 h), la amplitud (cambio entre un estado y otro) y la acrofase (punto en el que el ritmo llega al máximo). De esta manera, ajustando los parámetros biológicos a estas propiedades de onda, obtenemos valores que podemos estudiar. Por ejemplo, la acrofase se usa para ver cambios de magnitud entre el mismo tipo de ritmo bajo diferentes condiciones, como la variación de la secreción de melatonina de un individuo sometido a *jet lag* con respecto a las concentraciones estándar, caso en el que se observaría una amplitud disminuida con un periodo alargado, que provocaría un cambio de fase.

La persistencia de los ritmos en ausencia de un ciclo de luz/oscuridad, u otra señal de tiempo exógena, indica claramente la existencia de un reloj biológico interno. Por lo que otra propiedad de los ritmos circadianos, es que son endógenos con oscilaciones cercanas a las 24 h [6]. Además, estas oscilaciones pueden ser sincronizadas con respecto a factores medioambientales, pudiendo ser entrenados por señales externas, como el ciclo de luz-oscuridad [7, 8].

Además de generar la oscilación de diversas variables biológicas, el reloj circadiano es un sensor de información ambiental, que permite a los organismos prever y adaptarse a los cambios que ocurren en su entorno. Así, se desarrolla un sistema oscilante, que producirá un fenotipo cíclico en respuesta a indicadores específicos [9] que tiene la capacidad de coordinar temporalmente la función de diversos órganos y tejidos, así como la actividad metabólica [10]. El proceso de entrenamiento circadiano es por lo tanto, crítico para mantener el rendimiento humano normal, el comportamiento del sueño y el equilibrio energético, al traducir señales exógenas en mecanismos intracelulares que aseguran la correspondencia del tiempo biológico con el tiempo cósmico y geológico [11]. De dichas señales se hablará a continuación.

2.1.1. Sincronizadores o Zeitgebers

Dentro del campo de la cronobiología, el entrenamiento se entiende como un conjunto de procesos por medio de los cuales los ritmos biológicos son ajustados o sincronizados por señales periódicas que provienen del exterior [12]. Sin embargo, únicamente el periodo, la fase y la amplitud de estos ritmos son modificadas, no su ocurrencia [13]. Las señales provenientes del exterior y que son capaces de sincronizar los ciclos circadianos se denominan Zeitgebers [14, 15].

Tanto en animales como en plantas, el ciclo luz oscuridad es el zeitgeber dominante con capacidad de sincronizar el sistema circadiano. Además de la sincronización debida a la exposición lumínica, la intensidad de la luz puede modular los períodos del ciclo cuando los organismos son expuestos a luz constante. [16].

También podemos incluir la ingesta de la comida como un Zeitgeber. Esta señal tiene la capacidad de reorganizar el sistema circadiano, por ejemplo cuando los ritmos de alimentación son alterados. Cuando un periodo de ingesta, presente generalmente al inicio o la mitad del periodo de actividad, es eliminado, se observa una disminución de la amplitud en las oscilaciones de la temperatura y el cortisol [17]. Por su parte, un retraso de entre 5 y 6.5 h en el horario habitual de alimentación induce un corrimiento de fase en los niveles máximos de glucosa y leptina en suero, producto de una clara tendencia para sincronizar los picos de concentración de estos metabolitos alrededor de la hora de ingesta [17-19]. Inclusive, el perfil de expresión del gen *Per2*, que participa en el control de los ritmos circadianos y del cual se hablará en capítulos posteriores, se vio alterado en muestras de tejido adiposo proveniente de los individuos que participaron en este estudio [20].

Adicionalmente, la alimentación restringida a una hora fija puede inducir un aumento gradual de la actividad locomotora en ratones, la cual ocurre de 2 a 3 h antes de otorgarles alimento [21]. A este fenómeno comportamental se le denomina actividad de anticipación a los alimentos (FAA por sus siglas en inglés), y denota la capacidad que posee la comida para fijar un evento biológico cíclico por medio del entrenamiento [22].

El hígado, cuya actividad metabólica es esencial para mantener el balance energético, es muy receptivo a los esquemas de alimentación restringida, con los que incluso puede ser entrenado independientemente de las señales lumínicas [23, 24]. Así, los ratones a los que se les depletan los genes *Cry1* y *Cry2*, que participan en la regulación del reloj circadiano, exhiben un patrón de alimentación errático y pérdida de la ritmicidad en el metabolismo de los hepatocitos. Asombrosamente, cuando estos ratones están sujetos a un régimen de alimentación y ayuno rítmicos, varios parámetros circadianos en el hígado recuperan su oscilación [25]

Otro zeitgeber aceptado en la actualidad es el ejercicio [26-30], y adicionalmente algunas interacciones sociales también son consideradas un zeitgeber dentro de la teoría expuesta por Ehlers, Frank y Kupfer. [31-33].

2.1.2. Componentes fisiológicos del reloj circadiano en mamíferos

A nivel fisiológico, el sistema circadiano de los mamíferos está compuesto por relojes individuales situados en diferentes órganos y tejidos, que están organizados dentro de un sistema jerárquico (Figura 2) [34]. El núcleo supraquiasmático (SCN por sus siglas del inglés *suprachiasmatic nucleus*, localizado en el hipotálamo, alberga el marcapasos central y de mayor orden en la jerarquía de osciladores. Su rol fue descrito a principios de la década de 1970 por medio de su lesión directa en ratas, lo que produjo la abolición de los ritmos circadianos endocrinos y conductuales en todo el organismo [35].

El reloj central está controlado por aproximadamente 20,000 neuronas que conforman el SCN. Estas reciben las señales fóticas percibidas por las células ganglionares de la retina, cuyos axones forman parte del tracto retino hipotalámico. La transmisión sináptica entre las células ganglionares y el SCN, es mediado por glutamato y PACAP (polipéptido de la adenilato ciclasa de la pituitaria). Esta señal neuronal incrementa la transcripción de los genes *Per1-3* (que da lugar a las proteínas PER que contribuye a la regulación de los ritmos circadianos y cuyo papel será explicado ampliamente en la sección 1.3) [36, 37]. Las células ganglionares de la retina producen el ftopigmento melanopsina, responsable del entrenamiento por luz [38]. Ratones que carecen del gen que codifica para melanopsina (*Opn4*), muestran una reducción significativa en la amplitud de la respuesta circadiana al ser estimulados por un pulso de luz al comienzo de la noche, lo que evidencia la existencia de ftopigmentos especializados en respuestas a estímulos fóticos no visuales, como la sincronización circadiana [39].

Una vez que el estímulo lumínico es recibido por el SCN, éste difunde la señal a través de factores sinápticos difusibles a diferentes regiones del cerebro y glándulas endócrinas como la pineal y suprarrenales [40]. Por ejemplo, a través de una conexión polisináptica, el SCN garantiza que la glándula pineal produzca melatonina de manera rítmica, con un pico de concentración durante la noche, para promover el sueño en animales diurnos. En condiciones naturales de luz-oscuridad (LD), la luz azul suprime en gran medida la producción de melatonina [41], y promueve la producción de corticosterona en la glándula suprarrenal [42].

2.1.3. Los relojes periféricos

Desde que Balsalobre *et al.* detectaron la transcripción circadiana de genes controlados por el reloj (CCGs por sus siglas del inglés Clock-Controlled Genes) en hepatocitos y fibroblastos de rata [43], se demostró que el reloj circadiano no era exclusivo de las neuronas supraquiasmáticas, sino que se hallaba diseminado en diferentes tipos celulares y, en consecuencia, podía localizarse en diversos tejidos. Los ritmos circadianos persisten en pulmones aislados, hígados y otros tejidos cultivados *in vitro*, que no están bajo el control del SCN [44]. Bajo esta premisa, se ha comprobado la existencia de relojes periféricos en casi todos los tejidos del organismo [45].

En este sentido, el reloj central no fuerza el ritmo de los relojes periféricos, funciona más como un sistema de referencia para obtener una sincronización fina [23]. Los mecanismos fisiológicos subyacentes a esta coordinación, incluyen señales emitidas por el SCN que actúan sobre otras células nerviosas (señales neurales), o que se distribuyen a través de la sangre a otros órganos (señales hormonales) [23].

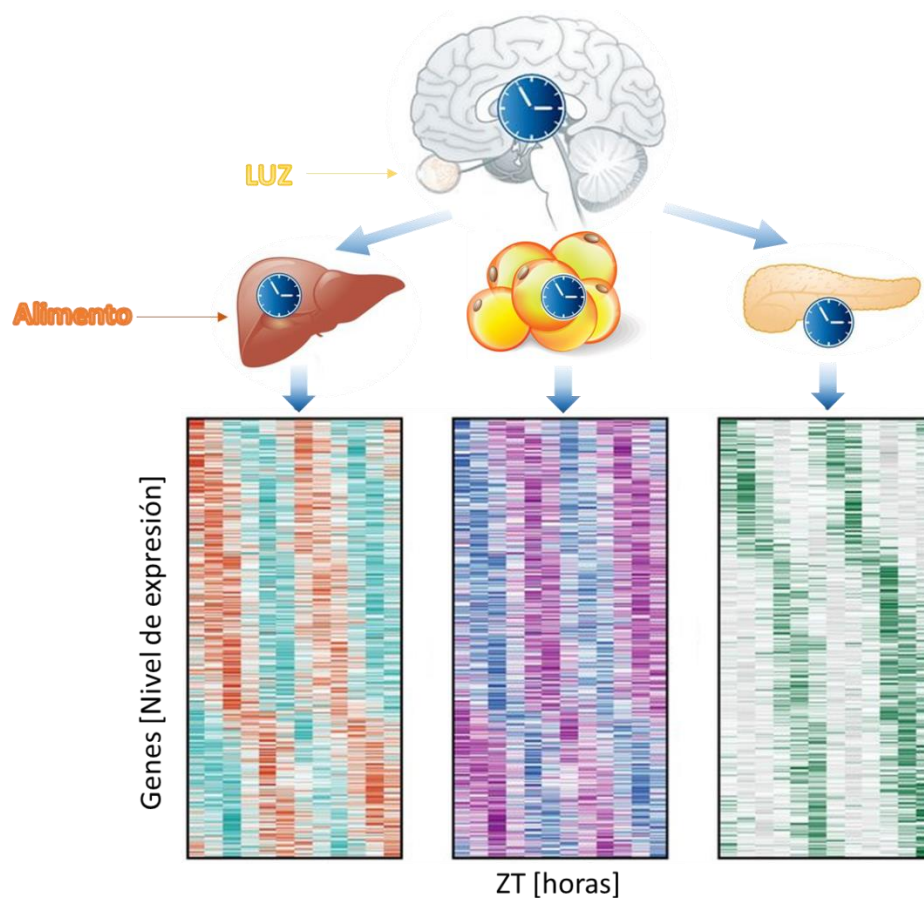


Figura 2. El reloj circadiano posee una estructura jerárquica a nivel fisiológico.

El núcleo supraquiasmático localizado en el cerebro es sincronizado por estímulos lumínicos que por medio de señales humorales y neuronales ayudan a sincronizar el resto de los relojes periféricos localizados en diferentes órganos y tejidos. Sin embargo, la ingesta de alimentos es un zeitgeber muy potente cuya señal es recibida por órganos como el hígado, el tejido adiposo y el páncreas. En conjunto,

estas señales estimulan ritmos en la transcripción de los genes, para acoplar al metabolismo a las necesidades particulares de cada órgano y tejido, ya que muchos de los genes transcritos rítmicamente (alrededor del 20% en hígado), son proteínas que participan activamente en el metabolismo. Inspirado de Bass and Takahashi, Science 2010.

Los relojes periféricos por lo tanto, tienen la capacidad de exponer ritmos que se acoplan a sus necesidades particulares con respecto a sus demandas metabólicas dentro del organismo, sincronizándose con las señales provenientes del exterior que sean más significativas y poderosas en el mantenimiento de su homeostasis (Figura 2). Por ejemplo, el intestino y el páncreas median las respuestas a la ingesta de nutrientes y controlan la liberación de factores de alteración sistémica mediante sus relojes locales. Un reloj circadiano en las células secretoras del intestino impulsa la expresión rítmica de la proteína de transporte sodio-glucosa 1, en este caso el reloj promueve el aumento en la captación de glucosa previo a la ingesta de alimento [46]. Como resultado, el flujo de glucosa desencadena la liberación de incretina la GLP1 en el intestino que, junto con el efecto directo de la glucosa en los islotes pancreáticos, promueve la liberación de insulina. Así en respuesta a la hiperglucemia postprandial, el páncreas libera la insulina que reciben los tejidos periféricos. Además, las células que conforman los islotes pancreáticos modulan la exocitosis de manera circadiana [47], por lo que la secreción de insulina a través de este fenómeno posee un componente circadiano robusto.

2.1.4. Componentes moleculares del reloj circadiano en mamíferos

En los últimos años, la cronobiología ha experimentado un progreso remarcable en cuanto a la descripción de las bases moleculares del sistema del reloj circadiano. Se sabe que los ciclos circadianos que se observan dentro del microcosmos celular son generados por osciladores moleculares, basados en mecanismos autorregulados de transcripción-traducción que constan de bucles activadores y represores interconectados. Las proteínas del reloj BMAL1 y CLOCK son los activadores transcripcionales, los cuales constan de dos subunidades con dominio hélice-bucle-hélice y pertenecen a la familia bHLH-PAS [48]. BMAL1 y CLOCK heterodimerizan y adquieren la capacidad de reconocer secuencias consenso denominadas E-boxes, localizadas en la región promotora de los genes controlados por el reloj (CCGs), promoviendo de esta manera su transcripción [49] (Figura 3).

Entre estos CCGs, se transcriben los genes que codifican a las proteínas represoras de la maquinaria del reloj, *Per1-3* (Period1-3) y *Cry1-2* (Criptocromo1-2), que conforman la señal negativa del bucle de retroalimentación. En ratones, el complejo CLOCK:BMAL1 es activado durante el día, provocando la transcripción de los genes *Per* y *Cry* por la tarde y la subsecuente acumulación de las proteínas PER y CRY al inicio del periodo nocturno [50]. Las proteínas PER y CRY heterodimerizan en

el citoplasma y son fosforiladas por las serina/treonina caseína cinasas 1δ (CK1 δ) y 1ϵ (CK1 ϵ) [51], promoviendo su translocación al núcleo durante la noche, donde interactúan con el factor de transcripción CLOCK:BMAL1 desestabilizando su unión en la cromatina, para de esta manera, inhibir la producción de transcritos que dependen del reloj molecular, lo que incluye la abolición de sus propios mRNAs [52] (Figura 3).

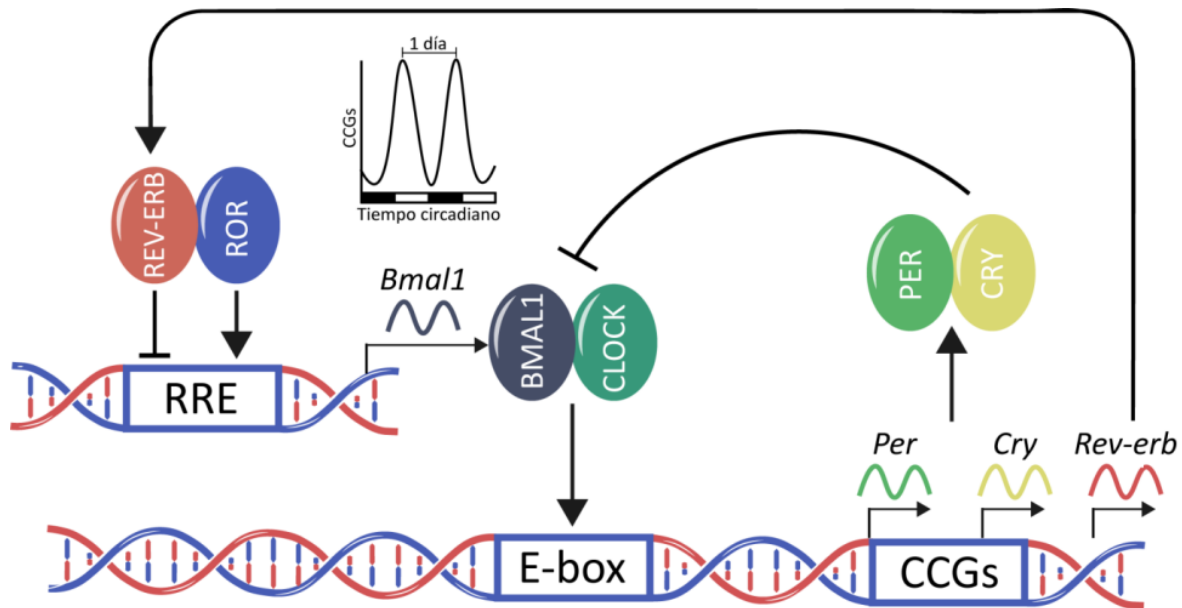


Figura 3. Bucle de retroalimentación de transcripción-traducción central en el sistema circadiano de células de mamíferos.

El heterodímero BMAL1:CLOCK se une a las E-box promoviendo la transcripción de los CCGs, como *Per* y *Cry*. Las proteínas PER y CRY forman un heterodímero que actúa sobre BMAL1: CLOCK para reprimir la transcripción de los CCGs, lo que incluye a sus propios mensajeros. Los receptores nucleares ROR y REV-ERB se unen a las secuencias RRE que se encuentra en el promotor de *Bmal1*, promoviendo o reprimiendo respectivamente, su transcripción. Este bucle adicional robustece el sistema para que la transcripción de los genes controlados por el reloj suceda en ciclos de 24 horas. Inspirado de Tahara y Shibata, Nature reviews 2016.

A medida que la transcripción de *Per* y *Cry* disminuye, se induce un decaimiento de las proteínas a las que codifican. La vida media de las proteínas PER y CRY es relativamente corta, y está controlada por la vía de las ubiquitina ligasas E3, que dirige a estas proteínas a su degradación proteosómica [53]. Una vez que la represión por retroalimentación negativa es minimizada debido a la disminución del complejo represor, el factor de transcripción CLOCK:BMAL1 reanuda un nuevo ciclo de transcripción a la mañana siguiente.

Aunado a este bucle de retroalimentación, el heterodímero CLOCK:BMAL1 también inducen la transcripción de los receptores nucleares REV-ERB- α/β (codificados por *Nr1d1* y *Nr1d2*), quienes tienen la capacidad de inhibir la transcripción de *Bmal1* a través de la unión directa a un elemento de respuesta RRE (Ror-Responsive Element) localizado en su promotor. Adicionalmente, el receptor

huérfano relacionado con el ácido retinoico $\alpha/\beta/\gamma$ (ROR $\alpha/\beta/\gamma$) compite con REV-ERB α/β por los elementos RRE del promotor de *Bmal1* para inducir su transcripción [54]. Así, el control rítmico en la expresión de *Bmal1* regula la activación temporal del factor de transcripción BMAL1:CLOCK, para producir oleadas rítmicas de expresión génica en un tiempo aproximado de 24 horas [55].

Aunque la regulación transcripcional es fundamental para organizar el circuito de retroalimentación circadiano, las proteínas del reloj central también están controladas por múltiples modificaciones postraduccionales (PTMs) que modulan su concentración, actividad y localización intracelular [56], algunas de las cuales se detallan a continuación.

2.1.5. Control postraduccionales de los componentes moleculares del reloj circadiano

2.1.5.1. Fosforilación

Uno de los mecanismos postraduccionales mejor estudiados en la regulación del reloj circadiano de mamíferos, es la fosforilación de sitios específicos en las proteínas PER1 y 2. Ésta se produce en los residuos de serina, treonina y tirosina, y regula la estabilidad estructural de estas proteínas, así como sus interacciones proteína-proteína, proteína-ligando, su localización celular y su actividad.

La interacción entre la caseína cinasa citoplásmica CKI ϵ y su homóloga CKI δ con PER2, produce su fosforilación en los residuos de Ser478 y Ser662 [57, 58] mediando su abundancia y actividad, así como su localización intracelular y degradación en el proteosoma [59] (Figura 4).

La proteína caseína cinasa 2 (CK2) se asocia con PER2 y lo fosforila en el residuo Ser53 para promover su degradación sumándose a la señal de CKI ϵ . Así, mediante la regulación en la abundancia de PER2, CK2 ayuda a la modulación fina de los ritmos circadianos, ajustando la inhibición del mecanismo molecular del reloj a ciclos de 24 horas. Debido a ello, la inactivación de CK2 produce un decremento en la amplitud y un incremento en el periodo de oscilación en la expresión de los genes controlados por el reloj. En contraste, su sobre expresión resulta en un incremento en la amplitud y un acortamiento del periodo de los CCGs [60].

En cuanto a las fosforilaciones que sufren otros integrantes del mecanismo molecular del reloj circadiano; se sabe que esta PTM ayuda a regular la actividad de CLOCK y BMAL1 como factores de transcripción. Por ejemplo, un estudio del mutante heterocigoto *Clock/Clock ^{Δ 19}*, ha revelado que la proteína CLOCK Δ 19 está hipofosforilada, lo que provoca una disminución en la efectividad de transactivación de los genes que codifican a las proteínas PER [61]. Adicionalmente, la versión hiperfosforilada de CLOCK posee tiempos de vida más largos, por lo que presenta concentraciones nucleares más altas que los de la proteína silvestre [62].

2.1.5.2. Ubiquitinación

La ubiquitinación es una PTM producida por la adición de una o varias moléculas de ubiquitina en residuos de lisina. Esta reacción está mediada por las ubiquitina ligasas.

Dentro de la regulación del mecanismo molecular del reloj circadiano, la ubiquitinación está ligada a la fosforilación. En general, cuando las proteínas PER y CRY son fosforiladas, esta señal conduce al reclutamiento de FBXW1A, FBXL3 y FBXW11, componentes del complejo ubiquitina ligasa E3, que promueven su poliubiquitinación y las dirigen a su degradación por la vía del proteosoma [63].

2.1.5.3. SUMOilación

De manera similar a la ubiquitina, el polipéptido conocido como *small ubiquitin-related modifier* (SUMO), es capaz de formar cadenas poli-SUMO mediante su polimerización sobre residuos de lisina. Esta reacción es sintetizada por la proteína (SUMO2/3) y también se le ha asociado con la regulación del reloj circadiano [64]. La SUMOilación de la Lys259 induce la ubiquitinación de BMAL1 y aumenta su transactivación y degradación [65]; al igual que la SUMOilación de la Lys67 y Lys851 de CLOCK en un modelo de células MCF-7 [66].

2.1.5.4. Acetilación

La acetilación consiste en la introducción de grupos acetilo a residuos de lisina y, antagoniza con la función de ubiquitinación y SUMOilación [67]. Sirtuina 1 (SIRT1), una desacetilasa dependiente de NAD⁺, se une a las proteínas del reloj de manera circadiana y promueve la desacetilación de PER2, lo que lleva a su degradación, al dejar múltiples residuos de lisina libres que pueden ser blanco de ubiquitinación [68]. En fibroblastos embrionarios de ratón KO para SIRT1, se observó una menor amplitud de la oscilación circadiana de los genes *Arntl*, *Rory*, *Per2*, y *Cry1* debido al aumento en la estabilidad de PER2 [68].

Interesantemente, CLOCK posee actividad de histona acetiltransferasa (HAT) y además, es capaz de acetilar a BMAL1 en el residuo Lys537, hecho que desencadena una serie de modificaciones postraduccionales dependientes de CK2 y SIRT1 que influyen en la regulación del reloj circadiano [69]. Dichas observaciones han sido evidenciadas en un modelo de hígado de ratón, en el cual también se indujo la expresión ectópica de BMAL1(K537R), un mutante de BMAL1 que ve afectada su acetilación. En dicho estudio se observó una disrupción en la ritmicidad de los CCGs controlados por el reloj endógeno del hígado [69], poniendo una vez más en evidencia, que la regulación postraduccional de los componentes centrales del reloj molecular, es crucial para el mantenimiento de la maquinaria circadiana (Figura 4).

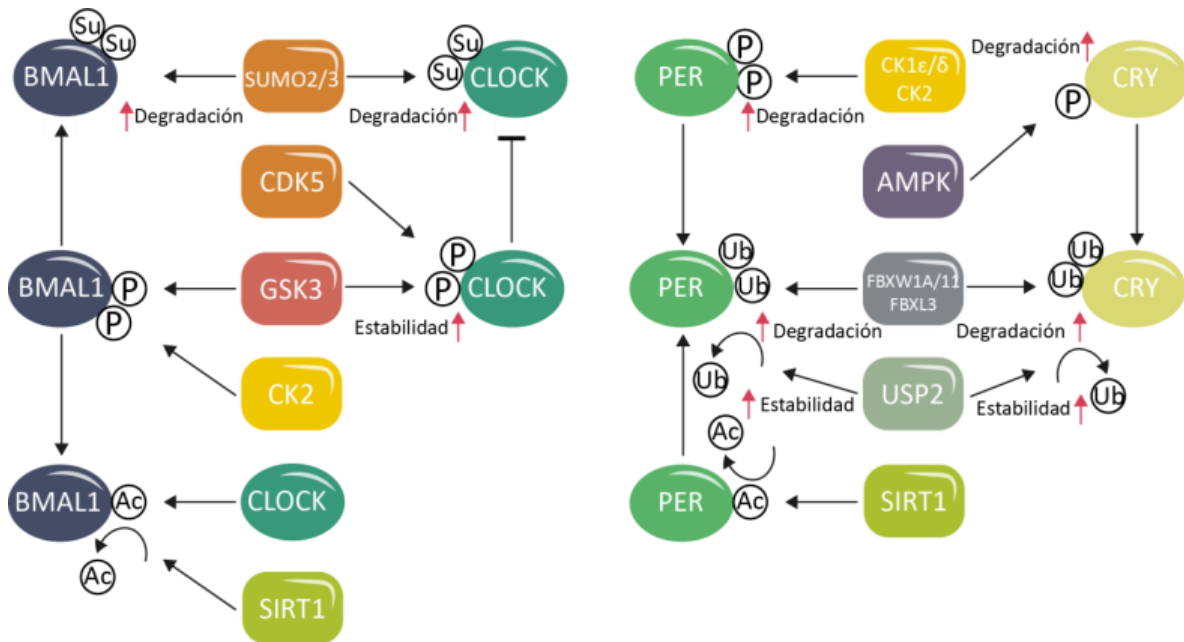


Figura 4. Modificaciones postraduccionales que regulan la estabilidad de las proteínas del reloj.

Este esquema resume algunas de las diversas modificaciones postraduccionales (PTM) que se ha documentado ocurren en las proteínas del reloj circadiano y que afectan su función, estabilidad y localización subcelular. P, fosforilación; Ac, acetilación; Su, SUMOilación y Ub, ubiquitinación.

2.1.6. Regulación rítmica de la expresión génica

Dado que la maquinaria molecular del reloj está principalmente compuesta por factores de transcripción, programas específicos de expresión génica están controlados por el reloj circadiano en cada órgano y tejido del cuerpo, conformando la base molecular de los ritmos fisiológicos. En un esfuerzo por dilucidar las conexiones entre el reloj molecular y los procesos biológicos a los que controla, se ha procedido a la caracterización de los genes que presentan ritmos transcripcionales a lo largo de 24h.

En estudios realizados por RNA-seq filtrados con el algoritmo JTK_CYCLE [70], utilizado para detectar patrones de oscilación con periodos de 24h, un 16% de los transcritos codificantes en hígado (3186) mostraron un patrón de oscilación circadiana, siendo el órgano más enriquecido en CCGs. En el riñón, pulmón y el tejido adiposo pardo se detectaron entre un 8 y un 14% de transcritos oscilantes, mientras que el corazón, el tejido adiposo blanco, el músculo y algunas regiones del cerebro están por debajo del 6% [71]. Interesantemente, se sabe que de todos los genes codificantes, únicamente los que componen al reloj central (*Arntl*, *Nr1d1*, *Nr1d2*, *Per1*, *Per2* y *Per3*) y algunos CCGs (*Dbp*, *Usp2*, *Tspan4* y *Tsc22d3*) muestran oscilaciones en todos los tejidos analizados [71].

De esta manera, el transcriptoma circadiano de cada órgano posee una firma particular; como lo muestra la expresión rítmica de *Elov3* (Fatty Acid Elongase 3), *Elov6* (Fatty Acid Elongase 6) y *Fasn* (Fatty Acid Synthase) en el hígado, cuyo propósito es regular la síntesis circadiana de ácidos grasos [72]; *Myh1* (Myosin Heavy Chain 1), *Ucp3* (Uncoupling Protein 3) y *Atrogin1* (Muscle Atrophy F-Box Protein) en el músculo, para inducir la contracción y el mantenimiento estructural [73] y, *Slc2a2* (Solute Carrier Family 2 Member 2), *Pdx1* (Pancreatic And Duodenal Homeobox 1) y *Kcnj11* (Potassium Inwardly Rectifying Channel Subfamily J Member 11) en el páncreas, quienes controlan rítmicamente la secreción de insulina [74].

Diversos estudios funcionales realizados a genes con oscilaciones circadianas muestran que la regulación rítmica de su expresión promueve la acumulación simultánea de transcritos que participan en la misma vía metabólica. Así, la expresión en hígado de los genes que codifican la ATP citrato liasa (*Acly*) responsable de la biosíntesis de Acetil-CoA; la Acetil-CoA Carboxilasa Alfa (*Acaca*), que cataliza la carbonilación de Acetil-CoA a malonil-CoA, y la sintetasa de ácidos grasos (*Fasn*), responsable de la síntesis de ácidos grasos, acoplan su transcripción durante el periodo de ingesta [75].

La resolución de los transcriptomas circadianos y la caracterización puntual de la fase en la que se producen algunos mRNAs de interés clínico, proporcionan una herramienta potencial para la farmacología. Por ejemplo las estatinas, una familia de fármacos que reducen el colesterol, inhiben a la enzima HMG-CoA reductasa (HMGR). HMGR alcanza su punto máximo de actividad durante la noche; en consecuencia, las estatinas con vidas medias cortas mostraron una eficacia máxima cuando se tomaron por la noche, es decir, cuando su gen diana estaba más activo [76]. De esta manera, la dilucidación de los transcritos circadianos permite realizar estudios cronoterapéuticos prospectivos, porque aportan información para maximizar la efectividad de ciertos fármacos acoplando su administración en momentos específicos del día.

2.1.7. Regulación epigenética de la transcripción mediada por CLOCK:BMAL1

Aunada a la regulación transcripcional y postraduccional, se conocen algunos mecanismos epigenéticos que ayudan al control de la maquinaria molecular circadiana, los cuales incluyen la modificación de los residuos de lisina presentes en las colas amino terminal de las histonas mediante la introducción de metilaciones y acetilaciones [77].

Etchegaray *et al.* (2003) evidenciaron, mediante un estudio en hígado de ratón, el mecanismo que el reloj molecular utiliza para regular los ritmos circadianos a través de la acetilación de las histonas que controlan la expresión de *Cry1* y *Per1/2*. Describieron que la

acetiltransferasa de histonas (HAT) P300 participa junto con el complejo CLOCK:BMAL1, regulando la acetilación cíclica de la lisina 9 y 14 de la histona H3, que se encuentran en los promotores de los genes *Cry1* y *Per1/2* [77]. Aunado a este hecho, se demostró que la proteína CLOCK posee actividad HAT, y que esta se ve aumentada al heterodimerizarse con BMAL1 al momento de unirse a su E-box en la región promotora de los CCGs [78].

Las deacetilasas de histonas (HDAC) son también importantes reguladores de los ritmos circadianos mediante la eliminación de los grupos acetilo de las lisinas en las histonas, lo que permite la compactación de la cromatina para impedir la entrada de la maquinaria transcripcional. La proteína dependiente de NAD^+ SIRT1 es un miembro de la familia de las HDAC de clase III llamadas Sirtuinas, que trabaja directamente con las proteínas del reloj. Más concretamente, SIRT1 revierte la actividad promotora de la transcripción iniciada por el complejo CLOCK:BMAL1 promoviendo la desacetilación de las histonas [79], en contraposición a la actividad HAT de CLOCK (Figura 5).

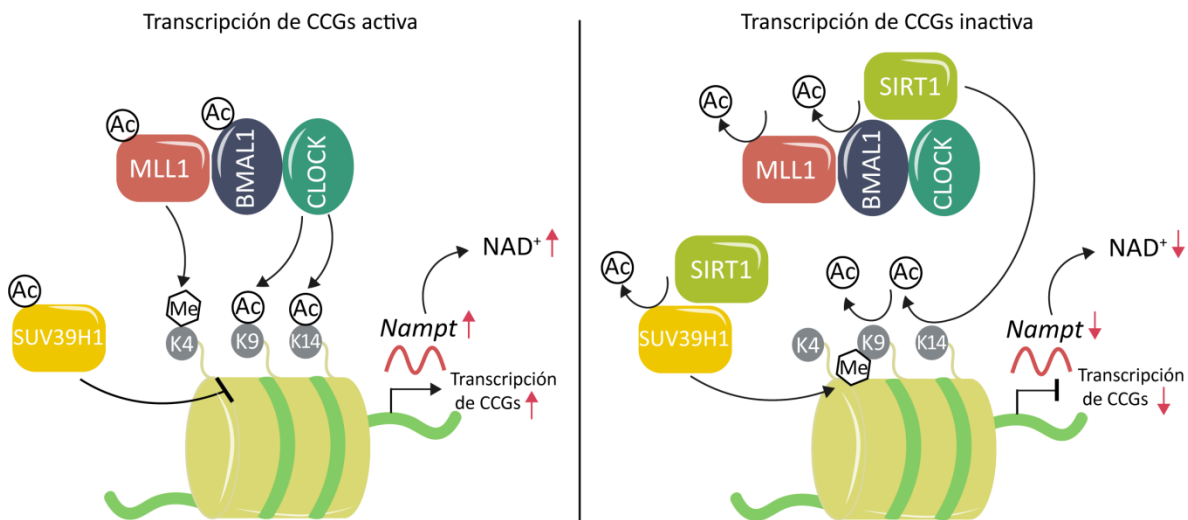


Figura 5. Las fluctuaciones circadianas en los niveles de NAD^+ y la actividad de SIRT1 afectan la transcripción de los genes controlados por el reloj mediante la modificación de marcas epigenéticas.

Cuando la actividad de SIRT1 es baja debido a la ausencia de su cofactor NAD^+ , MLL1 permanece acetilado, lo que promueve su actividad y el aumento de la marca H3K4me3 en los promotores de los CCGs, estos eventos promueven el reclutamiento de BMAL1:CLOCK a la cromatina, lo que favorece la actividad de HAT de CLOCK y el aumento de la acetilación en H3K9 y H3K14, impidiendo así el aumento de la marca represiva H3K9me3 catalizado por SUV39H1, configurando cambios en la cromatina que potencializan la transcripción de los CCGs, entre los cuales se encuentra el gen de la NAMPT, la enzima limitante de la ruta de rescate en la síntesis del NAD^+ , provocando un aumento de su concentración. El aumento en los niveles endógenos de NAD^+ promueve la actividad de HDAC de SIRT1 sobre CLOCK y MLL1, provocando un descenso en la marca H3Kme3 y la desacetilación de H3K9 y H3K14, mientras que al desacetilar a SUV39H1, provoca un aumento en su actividad y de la marca represiva H3K9me3 . En consecuencia, la transcripción de los CCGs desciende, reduciéndose los niveles de NAD^+ y la actividad de SIRT1, lo que induce el regreso al ciclo en el que los modificadores de la cromatina que promueven la transcripción se encuentran activos.

De manera indirecta, SIRT1 también posee la capacidad de regular la trimetilación cíclica de la H3K4 en promotores controlados por la maquinaria del reloj. SIRT1 desacetila los residuos de Lys1130 y 1133 de la metiltransferasa de histonas MLL1 de manera circadiana, quienes modulan la actividad metiltransferasa de MLL1. Estos ritmos de acetilación/desacetilación imponen oscilaciones en los niveles de H3K4me3 en los promotores de los CCGs. [80]. De igual manera, la histona metiltransferasa SUV39H1 de mamíferos es blanco de la desacetilación de SIRT1 en el residuo K266 de su dominio catalítico SET, activando así su capacidad metiltransferasa, lo cual resulta en el incremento de la marca H3K9me3 dependiente de la actividad de SIRT1 [81] (Figura 5).

2.1.8. Los ciclos circadianos y el metabolismo

La transcripción rítmica de genes que regulan procesos metabólicos trae consigo varias ventajas a los organismos. En términos de bioenergética, el reloj acopla los ciclos conductuales (sueño/vigilia) y nutricionales (ayuno/alimentación) para mantener la constancia fisiológica durante el cambio diario entre estos estados [82]. Como resultado, algunas enzimas que regulan pasos limitantes son expresadas rítmicamente, presentando niveles máximos que coinciden con la disponibilidad del sustrato y/o los requerimientos metabólicos. Además, la expresión cíclica de las rutas metabólicas en las que participan estas enzimas ayuda a separar temporalmente procesos incompatibles, impidiendo el solapamiento del catabolismo y el anabolismo, lo que evita ciclos fútiles.

En particular, en el se hígado llevan a cabo un gran número de actividades metabólicas, en cuya regulación participan los ciclos circadianos. Así, la anotación funcional del cistroma, el transcriptoma y el proteoma circadiano hepático, muestran un enriquecimiento de reguladores metabólicos. En las siguientes secciones, se expondrán algunos ejemplos de metabolismo circadiano haciendo énfasis en el hígado.

2.1.8.1. Metabolismo circadiano de la glucosa

Diversos reportes han demostrado que los niveles de glucosa en sangre periférica exhiben claras oscilaciones circadianas [83-85]. En el caso del hígado, la glucosa entra en los hepatocitos donde se fosforila y se convierte a glucosa-6P para integrarse a tres principales rutas metabólicas: la glucólisis, para la producción de energía; la glucogenogénesis, para almacenar energía en forma de glucógeno, y en la ruta de las pentosas fosfato.

Durante el proceso de toma de glucosa circulante en la sangre por parte de los hepatocitos, es esencial la expresión del transportador de glucosa GLUT2, así como de la enzima glucocinasa (GCK), que fosforila a la glucosa, para inducir su metabolización. Ambas enzimas muestran ritmos

diarios con niveles máximos que coinciden con los períodos de ingesta [86]. Así, durante el periodo de consumo alimenticio, la insulina activa la glucogenogénesis, a través de una cascada de señalización que conduce a la inhibición de la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3), quien fosforila a la glucógeno sintasa (GS) para inactivarla; promoviendo así, la síntesis de glucógeno. GSK3 presenta ritmos diarios de fosforilación y actividad, y actúa sobre algunos componentes del reloj circadiano, por ejemplo, afectando la estabilidad de REV-ER β [87].

Durante el ayuno, se presentan ritmos circadianos en la señalización del glucagón que influyen en el metabolismo de la glucosa hepática. El glucagón envía señales a través de su receptor acoplado a la proteína G y a la adenilato ciclasa para activar a la proteína cinasa A (PKA), que a su vez promueve la glucogenólisis y la gluconeogénesis para suministrar glucosa a los tejidos periféricos [88]. La PKA activa a la proteína de unión al elemento de respuesta AMP cíclico (CREB) mediante su fosforilación, promoviendo su unión a los sitios CRE, que se encuentran en los promotores de *Per1* y de genes gluconeogénicos como la glucosa-6-fosfatasa (*G6pc*) y la fosfoenol piruvato carboxilasa (*Pck1*), estimulando así su transcripción [89].

Aunado a este hecho, estudios realizados en ratones, demostraron que CRY1 controla la gluconeogénesis en el hígado a través de la ruta cAMP/CREB. . Durante el inicio de la mañana, cuando los niveles de CRY son altos, la fosforilación de CREB y la transcripción de sus blancos es baja, ya que los individuos recién salen de su periodo de alimentación y no requieren la liberación de glucosa en sangre por parte del hígado. Pero mientras avanza el día y se agudiza el ayuno, los niveles de CRY1 descienden y comienza la transcripción de *G6pc* y *Pck1*, activando la gluconeogénesis en el hígado para surtir de glucosa los órganos periféricos [90]. La ruta metabólica que sustenta dicho mecanismo, está basada en la capacidad que CRY1 posee para interactuar con la subunidad α de la proteína G, causando un cese en la producción de AMPc estimulada por glucagón, provocando una baja en la actividad de PKA y en consecuencia de la fosforilación de CREB, lo que a su vez induce el descenso en la transcripción de sus genes blanco [90]. Así, el ritmo circadiano de los niveles de proteína CRY1 forma una señal para la respuesta del programa de gluconeogénesis durante el ayuno (Figura 6).

Interesantemente, el ayuno prolongado también aumenta la proporción de AMP/ATP y activa la cinasa activada por AMP (AMPK), que fosforila a CRY y lo dirige a degradación promoviendo la actividad de CREB [91]. En conjunto, esto sugiere un mecanismo en el que CRY1 actúa como un punto de equilibrio entre las respuestas a corto y largo plazo al déficit de nutrientes (Figura 6).

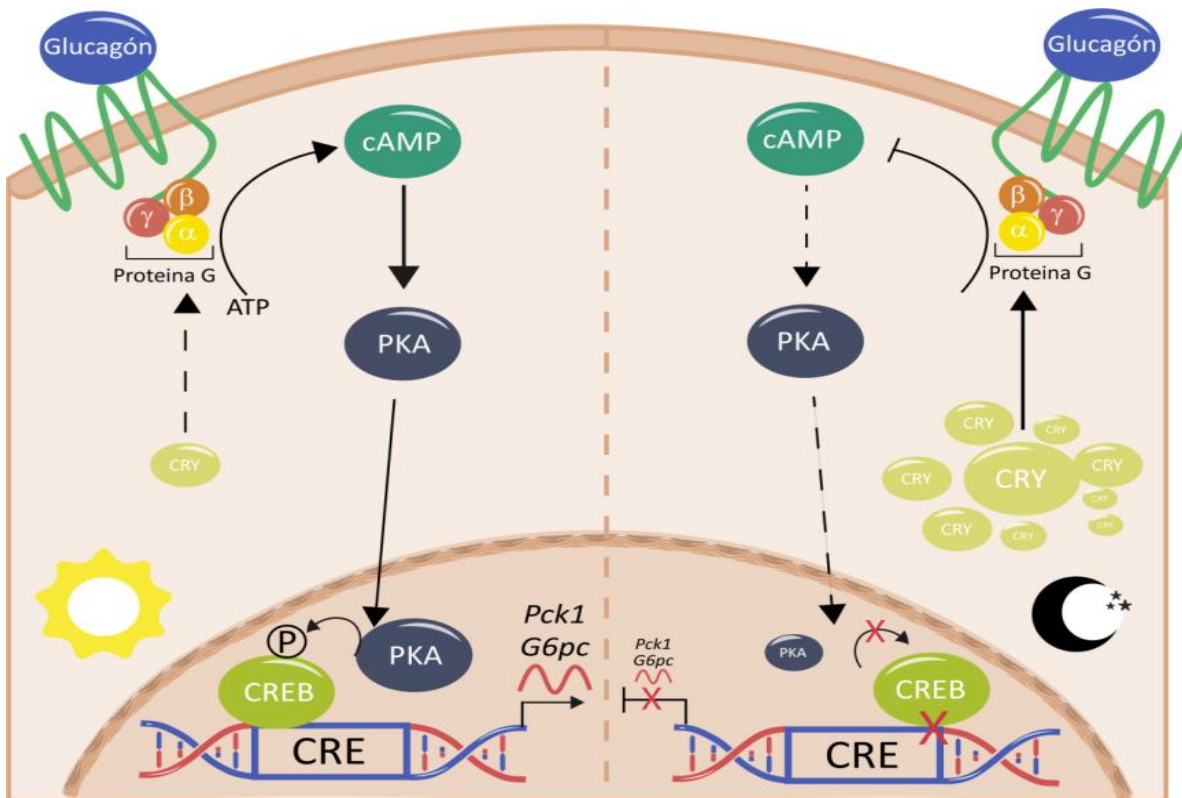


Figura 6. La gluconeogénesis mediada por CREB está regulada por CRY.

Las concentraciones de CRY1, regulan los cambios circadianos de la gluconeogénesis hepática a través de la interacción con la subunidad α de la proteína G, que conduce a la regulación temporal de la señalización del glucagón al regular la fosforilación de CREB y la subsecuente transcripción de los genes gluconeogénicos *G6pc* y *Pck1*. Inspirado de Panda y Hatory, Cell research 2010.

2.1.8.2. Regulación circadiana del metabolismo de lípidos

El metabolismo lipídico está intrínsecamente ligado al reloj circadiano. Debido a ello, puede observarse una separación temporal de su síntesis, transporte y catabolismo [92]. Estudios de metabolómica realizados en plasma sanguíneo humano, revelan que el 15% de metabolitos despliegan oscilaciones circadianas, y que un 80% de estos componentes rítmicos son lípidos [93]. Dicha regulación circadiana promueve una respuesta eficaz en el procesamiento de diferentes especies lipídicas como los triglicéridos (TG) para así adecuarse a las demandas metabólicas específicas, según las necesidades energéticas del organismo [94].

Los TG representan la mayor fuente de almacenamiento y transporte de lípidos entre las células y el plasma sanguíneo [95]. La lipogénesis es la ruta principal que abastece al hígado de TG. La primera reacción en llevarse a cabo, y que además limita el flujo su biosíntesis, es la acetilación del glicerol-3-fosfato por la glicerol-3-fosfato acetiltransferasa (GPAT) para producir ácido lisofosfatídico (Alp). La enzima 1-acil-glicerol-3-fosfato-acetil transferasa (AGPAT), adiciona un ácido graso al Alp para producir fosfatidato, el cual es transformado a diacilglicerol (DAG) por la enzima

fosfatidato fosfatasa 1 (PAP). Finalmente el DAG es convertido a TG por la diacilglicerol acetiltransferasa (DGAT) [96] (Figura 7).

Durante el periodo de alimentación, que se da durante la noche en ratones, los ácidos grasos que provienen de la dieta, se esterifican en forma de triglicéridos en el hígado; debido a ello, su síntesis esta acoplada a los periodos de ingesta para sincronizarla con respecto a la disponibilidad del sustrato [97].

Acorde a lo anterior, la mayor parte de las enzimas que participan en la síntesis de TG, poseen un patrón de acumulación circadiano [72]. A la par, los niveles de mRNA de los genes que codifican a estas enzimas también presentan oscilaciones circadianas. *Gpat2* aumenta su transcripción durante el periodo nocturno, mientras que los mRNAs de *Agpat1* y *Agpat2* poseen su pico de acumulación al ZT 16. A su vez, los mRNAs de *Dgat1* y *Dgat2* muestran sus niveles máximos al ZT 12 y ZT 16, respectivamente [98] (Figura 7). Además, se sabe que las proteínas del reloj se reclutan a los promotores o secuencias reguladoras de genes involucrados en el metabolismo lipídico, en particular en la biosíntesis de triglicéridos [99, 100]

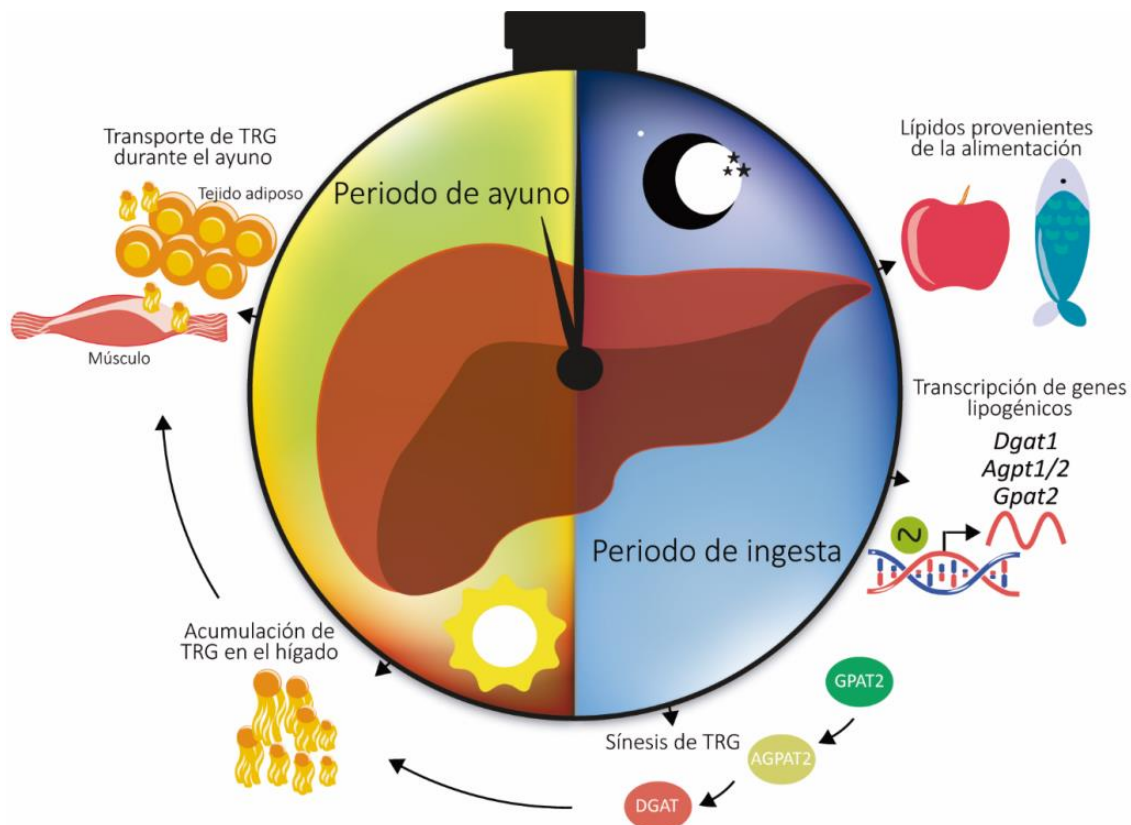


Figura 7. El hígado suministra TG a los tejidos periféricos a través de su síntesis y transporte circadianos.

En los ratones, la transcripción de los genes *Gpat2*, *Agpt2* y *Dgat1* se incrementa durante el periodo de alimentación promoviendo la síntesis de TG. Durante el periodo de ingesta, la energía proviene de los lípidos y otras moléculas que contienen los alimentos, por lo que

la síntesis de TG es regulada positivamente provocando un aumento en el contenido de TG hepático que se ve reflejado en el periodo de ayuno y es exportado a tejidos periféricos como el muscular y adiposo.

Una vez que la síntesis de TG alcanza su cénit durante el periodo de ingesta, un importante reservorio de triglicéridos se acumula en el hígado, alcanzando su concentración máxima al ZT 8 [98]. Durante el ayuno, estos TG son transportados en forma de VLDL al corazón, músculo y cerebro, contribuyendo a la exportación de grasas que se lleva a cabo principalmente por el tejido adiposo. Interesantemente, estudios de lipidómica realizados en hígado de ratón mostraron que un 17% de lípidos, en particular los triglicéridos, poseen un patrón de oscilación circadiano [72]. .

Cabe mencionar que algunos reguladores maestros del metabolismo lipídico como PPAR γ , PGC1 α y SREBP1 presentan patrones rítmicos de expresión en el hígado [101], y que alteraciones en la actividad de la proteína CLOCK resultan en una acumulación irregular de intermediarios y productos del metabolismo lipídico en el hígado [102], lo que también se observó en animales a los que se les depletó el gen *Per2* en este órgano [103], evidenciando aún más la intrínseca relación que existe entre el metabolismo de lípidos y el reloj circadiano.

2.1.8.3. Interconexión entre ciclos circadianos y metabólicos: el NAD⁺ como ejemplo paradigmático.

Un gran número de metabolitos oscilan de manera circadiana, entre los que resalta la nicotinamida adenina dinucleótido o NAD⁺. Esta molécula juega un papel bien conocido como aceptor de hidrógenos en diversas reacciones catalizadas por enzimas oxidoreductasas implicadas en el metabolismo intermediario, dando lugar al NADH que proporciona poder reductor a la cadena de transporte de electrones [104]. Sin embargo, los roles del NAD⁺ se han ampliado más allá del papel que juega en las reacciones de oxido-reducción, ya que también actúa como cofactor de una amplia gama de enzimas “consumidoras de NAD⁺”, como las Sirtuinas, Poli(ADP-ribosa)polimerasas y las ADP-Ribosa sintetasas (de las cuales se hablará más adelante en este capítulo) [105].

Para que las funciones dependientes del NAD⁺ se puedan llevar a cabo, la célula asegura su biodisponibilidad a través de dos ejes biosintéticos, el *de novo* y la ruta de salvamento [106]. La biosíntesis *de novo* comienza con el consumo de L-Triptófano a través de la dieta [107]; éste se convierte a N-Formilquinorenina, mediante la acción enzimática de la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) o la triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO) [108]. En los mamíferos, TDO es la enzima principal que contribuye a la biosíntesis *de novo* de NAD⁺ en el hígado. En tejidos extrahepáticos, el IDO citosólico desempeña un papel importante, con una actividad más alta reportada en pulmón, bazo e intestino delgado [109]. Cuatro conversiones enzimáticas posteriores dan como resultado la formación del α -amino- β -carboximuconato- ϵ -semialdehído (ACMS), compuesto muy inestable que se convierte

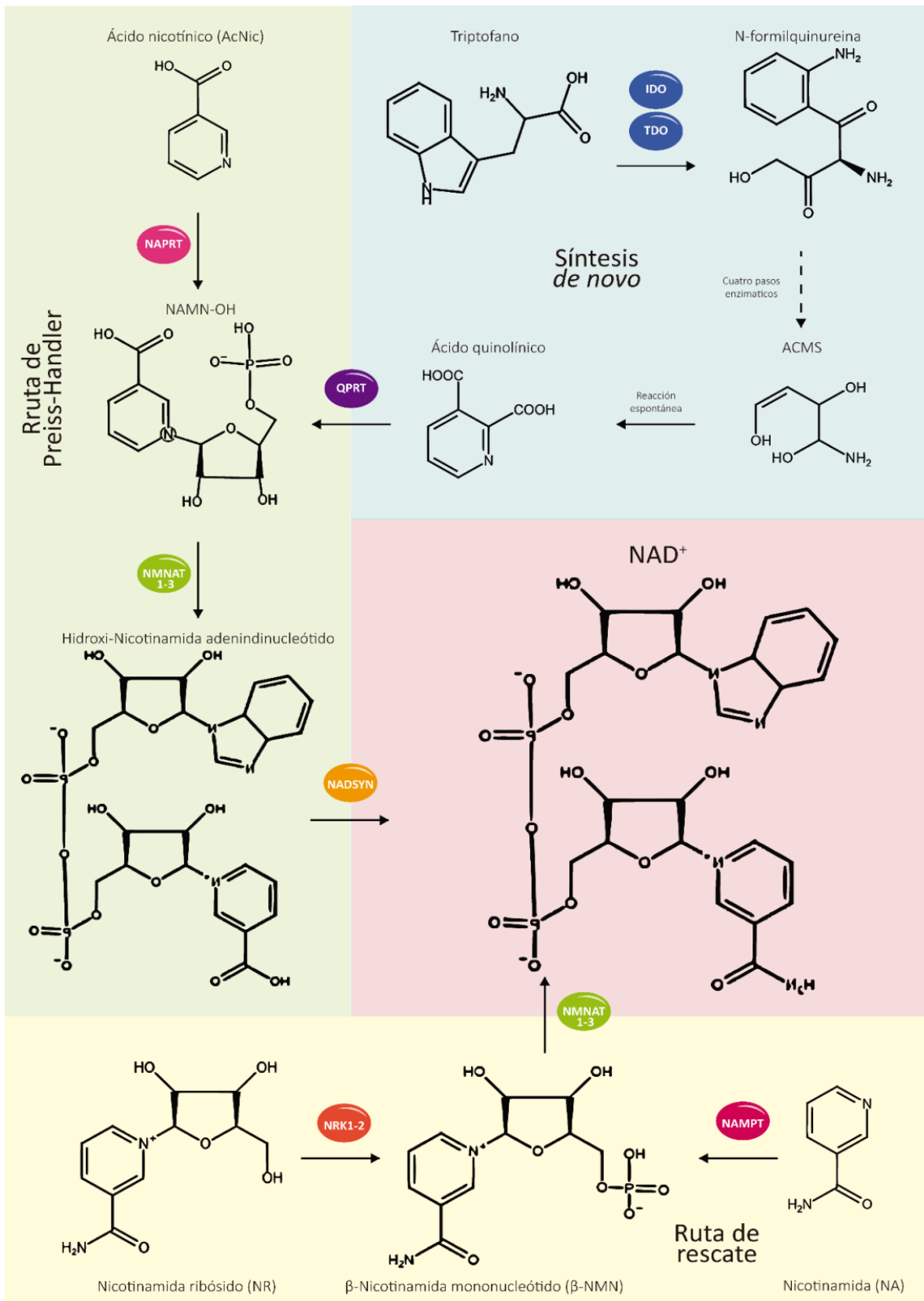


Figura 8. Síntesis del NAD⁺.

El NAD⁺ Se sintetiza a través de la ruta *de novo*, la ruta de Preiss-Handler y la ruta de salvamento, siendo esta última la responsable de mantener las concentraciones intracelulares de NAD⁺.

de manera espontánea a ácido quinolínico, que posteriormente se transforma en un precursor directo del NAD^+ en forma de Hidroxi-nicotinamida mononucleótido (NMN-OH) por medio de la enzima Quinolato fosforribosil transferasa (QPRT) [107] (Figura 8).

Aunque el NAD^+ puede sintetizarse a partir del Triptófano, su fuente principal dentro de la célula proviene de la ruta de salvamento, que requiere la captación de otros precursores del NAD^+ como la Niacina o ácido nicotínico (NA), la Nicotinamida ribósido (NR) y la Nicotinamida (NAM). Cuando el precursor se presenta en forma de NA su síntesis hacia NAD^+ sigue la ruta conocida como ruta de Peiss-Handler, que se describe a continuación. La enzima Nicotinato fosforribosiltransferasa (NAPRT) cataliza su transformación a NMN-OH para después ser convertido a Hidroxi-Nicotinamida adenindinucleótido por medio de la enzima Nicotinamida mononucleótido adeniltransferasa (NMAT1-3), para después ser convertido a NAD^+ por medio de la enzima NAD -sintetasa (NADSYN). En el caso que el precursor sea NR, la enzima Nicotinamida ribósido cinasa (NRK1-2), lo convierte a β -Nicotinamida mononucleótido (β NMN), al que también es convertida la NAM, pero en este caso la reacción es catalizada por la Nicotinamida fosforribosiltransferasa (NAMPT). Una vez convertidos estos compuestos a β NMN, las enzimas NMAT1-3 catalizan la reacción a NAD^+ [106] (Figura 8).

Interesantemente, la enzima NAMPT y su producto el NAD^+ muestran oscilaciones circadianas que están reguladas por la maquinaria molecular de reloj en mamíferos[110].

Se sabe que los niveles de expresión del gen *Nampt* poseen una robusta oscilación diurna en el hígado y el tejido adiposo de ratones, con un pico al comienzo del período nocturno, al ZT 12 [111]. Estas oscilaciones transcripcionales imponen ritmos diurnos a los niveles de la proteína NAMPT. Dichos patrones de oscilación circadiana en la transcripción de *Nampt* y la proteína a la que codifica, son eliminados por completo en ratones con el genotipo *Clock* Δ 19 que expresan una proteína CLOCK mutante y se ha observado que la ritmicidad del NAD^+ se ve interrumpida en el hígado de ratones *Clock* Δ 19 y en fibroblastos embrionarios de ratón que carecen de la proteína CLOCK, además de observarse una reducción sistémica en las concentraciones de NAD^+ [112].

Por otro lado, ratones deficientes de BMAL1, también exhiben una reducción significativa en los niveles de NAD^+ y del mensajero de *Nampt* en el hígado. Interesantemente, se ha demostrado que el heterodímero BMAL1:CLOCK se une rítmicamente a tres E-boxes presentes en la región promotora de *Nampt*, haciendo evidente que la expresión de este gen está a cargo de la maquinaria del reloj circadiano [112].

Debido a que el NAD^+ puede servir como cofactor, su biodisponibilidad a lo largo del ciclo circadiano afecta a la actividad de diversas enzimas. En años recientes, una familia de proteínas en particular ha atraído la atención en el campo de investigación de la cronobiología por sus implicaciones en el metabolismo intermediario, el envejecimiento y el control del reloj circadiano. La familia de las Sirtuinas está compuesta por un grupo de desacetilasas/ADP-ribosiltransferasas dependientes de NAD^+ , a las que se les conoció inicialmente por regular el envejecimiento y la longevidad en levadura, gusanos y moscas [113-115]. Los mamíferos cuentan con 7 ortólogos de estas desacetilasas, de los cuales SIRT1 ha sido ampliamente estudiado. SIRT1 juega un papel importante en la regulación de metabolismo en respuesta a la disponibilidad nutricional en múltiples tejidos [116-118], al mediar respuestas a las señales nutricionales, particularmente en casos de baja nutrición, como es el caso del ayuno y la restricción calórica [119].

Se sabe que SIRT1 muestra un patrón de oscilación en su actividad enzimática, mediante la cual se regula de manera circadiana la desacetilación de BMAL1 y la histona H3, así como su reclutamiento al complejo CLOCK:BMAL1 en los promotores de los genes controlados por el reloj [120]. Por otro lado, se sabe que una deficiencia de SIRT1 causa un aumento en los niveles de expresión de *Period2* tanto en fibroblastos embrionarios de ratón como en el hígado, ligando a SIRT1 con los patrones de oscilación de la expresión de los CCGs [68]. Además, se demostró que SIRT1 desacetila a PER2 de manera circadiana, promoviendo su degradación e influyendo así en la estabilidad de PER2 dentro del núcleo [121].

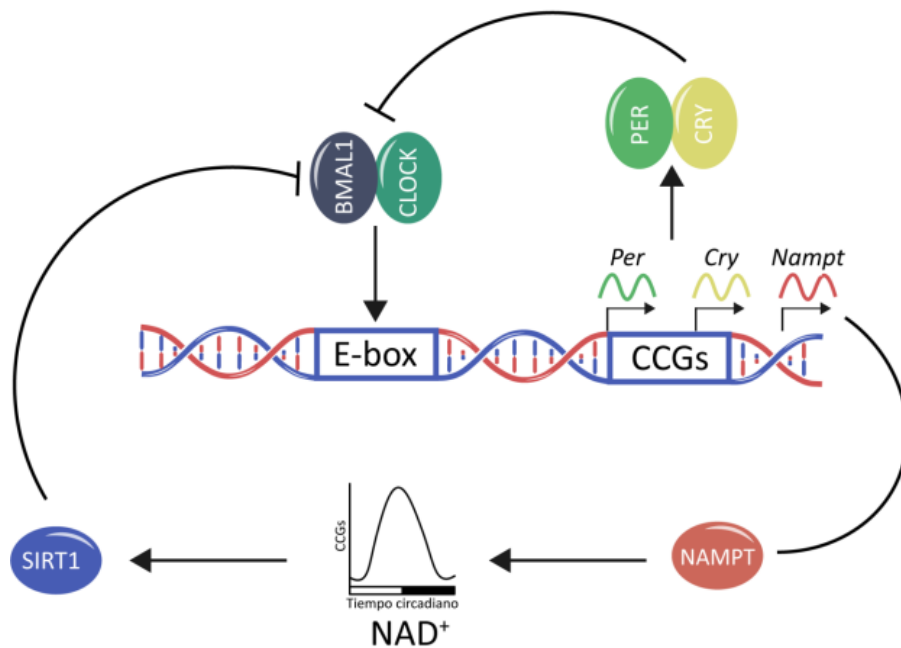


Figura 9. Circuito de retroalimentación formado por NAMPT/SIRT1 y la maquinaria del reloj molecular.

Mientras que CLOCK:BMAL1 comprenden una rama positiva del ciclo de retroalimentación circadiana de transcripción-traducción, el complejo de PER:CRY inhibe la transcripción formando la rama negativa de este bucle. NAMPT/NAD⁺/SIRT1 comprenden otro bucle de retroalimentación integrado a la maquinaria circadiana con capacidad para intervenir en la regulación rítmica de los genes controlados por el reloj mediante la integración de este "oscilador metabólico".

Se propone que SIRT1 influye en la transcripción de los CCGs mediante su interacción con CLOCK:BMAL1, modulando la producción de NAMPT y la biosíntesis de NAD⁺, cuya biodisponibilidad regularía de manera circadiana la actividad de SIRT1 [68, 112] (Figura 9). De hecho, se sabe que la inhibición de NAMPT por FK866, un potente inhibidor de esta enzima [122], anula la supresión dependiente de SIRT1 sobre la transcripción mediada por CLOCK:BMAL1 y altera la oscilación de la expresión de los CCGs en hepatocitos primarios de ratón [110], lo que sugiere que la vía impulsada por NAMPT/NAD⁺ modula la regulación transcripcional circadiana en los mamíferos [123, 124].

2.2. Síndrome metabólico.

El síndrome metabólico (SM) es una condición clínica que se caracteriza por la aparición de amplias variaciones fenotípicas relacionadas con la obesidad, cuya incidencia se asocia a personas con una predisposición endógena, en ocasiones predeterminada genéticamente y condicionada a diversos factores ambientales, como la dieta y la actividad física [125]. El exceso de grasa y masa corporal favorecen la aparición de este síndrome [126].

Los individuos con SM, presentan una asociación de problemas de salud crónicos que aparecen secuencialmente o de manera simultánea, por lo cual es considerada como una condición multifactorial. La resistencia a la insulina se considera uno de los factores más relevantes en el desarrollo de SM [127] sin embargo, existe un conjunto de anomalías metabólicas que robustecen su establecimiento, tales como: diabetes tipo 2 (DT2) y dislipidemia [128], de las cuales se hará una breve revisión.

2.2.1. Resistencia a la insulina

La insulina es una proteína de ~6 kDa que se produce en las células b pancreáticas. Organiza la captación y almacenamiento de la glucosa, así como el metabolismo de lípidos y proteínas. Su señalización principal se da a través de la vía de fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K)/Akt; la cual se activa por la unión de la insulina a su receptor (IR), un receptor de tirosina compuesto por dos subunidades a y dos subunidades b. Cuando la insulina se une a estas subunidades, provoca su autofosforilación y consecuente activación, dando como resultado la activación del sustrato del IR (IRS) desencadenando así el arco metabólico PI3K-PDK1 y AKT que promueve la síntesis de glucógeno y la captación de glucosa. Cuando algunos de estos mecanismos falla, puede presentarse resistencia a la insulina [129].

La resistencia a la insulina (IR) es el mejor indicador del SM [129] y está caracterizada por una respuesta biológica atenuada ante niveles normales o elevados de insulina a nivel celular, lo que promueve un aumento en su secreción, dando lugar al estado hiperinsulinémico característico en sujetos con IR. [130].

Los principales efectos negativos que se presentan ante una acción insulínica deficiente son: La reducción en la captación de glucosa mediante el desfavorecimiento de la traslocación de los glucotransportadores GLUT1-4 a la membrana plasmática de diversos tejidos; un desbalance entre la síntesis de glucógeno y su degradación, reducción del metabolismo oxidante de la glucosa, aumento de la gluconeogénesis hepática y un desbalance de la captación y el almacenamiento de grasa en diversos tejidos, principalmente el adiposo [131].

Si bien la captación de glucosa en el hígado no depende de la insulina, este órgano realiza la eliminación de aproximadamente el 30% de la de glucosa circulante en todo el cuerpo. Además, la insulina regula procesos metabólicos clave en la fisiología hepática [132]. El principal papel de la insulina en el hígado consiste en estimular la síntesis de glucógeno durante el periodo de ingesta, a la par que se inhibe la gluconeogénesis [133]. En caso de presentarse IR, estos procesos se ven afectados, dando como resultado un aumento en la producción de glucosa a través de la gluconeogénesis, como en el estado de ayuno; sin embargo, a diferencia del ayuno, la hiperglucemia estimula la sobreexpresión del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) en el hígado, contribuyendo al desarrollo de fibrosis, como se ha comprobado en biopsias hepáticas de pacientes humanos con IR [134] (Figura 10).

2.2.2. Diabetes tipo 2

La diabetes tipo 2 (DT2) es una enfermedad crónica caracterizada por altos niveles de glucosa en sangre asociados a una incapacidad progresiva de las células β pancreáticas para compensar la resistencia a la insulina [135]. Las tensiones ambientales y fisiológicas, como el consumo de dietas altas en grasa, el aumento de peso, la inactividad física y la interrupción de los ciclos circadianos, pueden empeorar la resistencia a la insulina [136, 137]. A medida que las células β del páncreas no logran compensar la resistencia a la insulina predominante, se desarrolla una intolerancia a la glucosa y diabetes. Cuando la glicemia se mantiene elevada de manera constitutiva, la función de las células β se deteriora aún más, con disminución de la sensibilidad a la glucosa y empeoramiento de la hiperglucemia. Se sabe que los islotes pancreáticos, reducen su tamaño en pacientes diabéticos como consecuencia de la hiperglucemia [138].

La morbilidad de la DT2 se relaciona tanto con la gravedad de la hiperglucemia como con las consecuencias metabólicas de la resistencia a la insulina. Los defectos primarios en la acción de la insulina parecen estar en las células musculares y los adipocitos, con una translocación alterada de GLUT4 que da como resultado un transporte de glucosa mediado por insulina alterado [139]. En el hígado la síntesis de glucosa y la glucogenolisis, que aumentan durante el ayuno, no se suprimen con la comida, por lo que el aporte de glucosa a la circulación se mantiene elevado constantemente, con el riesgo de llegar a niveles que producen daño fisiológico durante la ingesta [140]. Los elevados niveles de glucosa circulante promueven la reacción entre azúcares y otras moléculas como las proteínas, los lípidos y los ácidos nucleicos, produciendo modificaciones por glicosilación que alteran la función de estos componentes biológicos, produciendo patologías como el daño renal [141] y la retinopatía diabética [142] entre otros.

2.2.3. Dislipidemia

La dislipidemia consiste en el aumento de la concentración plasmática de colesterol y lípidos en sangre [143] y es una condición estrechamente asociada al desarrollo del síndrome metabólico [144]. Las anomalías lipídicas asociadas con esta patología se caracterizan por una elevada concentración de triglicéridos séricos en ayunas y un desbalance en la composición de los complejos macromoleculares responsables del transporte de grasa por todo el organismo, conocidas como lipoproteínas [143]. De esta manera, las lipoproteínas de alta densidad (HDL) que transportan el colesterol que captan de los tejidos y órganos del cuerpo al hígado, se encuentran reducidas, al contrario que las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) cuya producción en el hígado se sobre estimula [145]. Es importante resaltar que el desbalance entre la concentración de HDL y VLDL, es un patrón que se correlaciona fuertemente con el riesgo cardiovascular, cuya aparición es uno de los principales riesgos que conlleva la dislipidemia [145].

Se ha reportado que cualquier condición que aumente el flujo de ácidos grasos libres aumentará la producción de VLDL, tal y como ocurre en estados de obesidad visceral, de resistencia a la insulina y en DT2. En particular, la disrupción en la señalización de insulina juega un papel central en la regulación del transporte hepático de triglicéridos asociados a lipoproteínas de muy baja densidad. Se sabe que la hipersecreción hepática de VLDL y la consiguiente hipertrigliceridemia, así como la disminución de HDL circulantes se deben a las fluctuaciones fisiológicas de la insulina como respuesta a los estímulos alimenticios; por lo que al afectarse la vía de señalización de la insulina se predispone a la hipersecreción de VLDL [146]. En estudios in vivo, se ha demostrado que una baja en la producción del segundo mensajero fosfatidilinositido (3,4,5)

trifosfato, que participa en la vía de señalización de la insulina, conlleva al desarrollo de la hipersecreción de VLDL [147].

2.3. Síndrome metabólico y ciclos circadianos

La creciente evidencia de estudios clínico-epidemiológicos también sugieren que uno de los principales cambios en el mundo industrializado que contribuye a la patogénesis del SM implica la introducción de luz artificial y el trabajo durante la noche [148]. En este sentido, el establecimiento de conductas que promueven el desacoplamiento del reloj circadiano, como el aumento generalizado de la reducción voluntaria del sueño, el consumo de alimentos durante el periodo nocturno [149, 150], la estimulación con luz artificial fuera del fotoperiodo [151, 152] y la administración de fármacos que tienen como diana a los componentes del reloj [153] predisponen al desarrollo de obesidad.

Además se ha observado que los trastornos comunes del comportamiento circadiano y del sueño están asociados con un aumento del hambre, una disminución del metabolismo de la glucosa y lípidos, así como a cambios amplios en las señales hormonales involucradas en la saciedad [154]. Sorprendentemente, la obesidad y la alimentación rica en grasa también afectan recíprocamente el sistema circadiano en ratones, lo que indica que el metabolismo, los ritmos circadianos y posiblemente el sueño están interconectados a través de vías moleculares y conductuales complejas [155]. Por lo tanto, pueden ponerse en marcha alteraciones en la homeostasis energética asociadas con la obesidad en un contexto de alteración circadiana. Por ejemplo, en ensayos de interrupción del sueño en humanos se observa una desregulación metabólica generalizada relacionada a cambios de expresión en las proteínas del reloj causados por el aumento en la metilación de los promotores de *Cry1* y *Per1* en adipocitos que contribuyen al desarrollo del síndrome metabólico [156].

2.3.1. Mutaciones en la maquinaria central del reloj predisponen al síndrome metabólico

En mamíferos se ha observado que la disrupción en la sincronización de los ritmos circadianos causada por la afectación de los genes reloj tiene consecuencias directas en el desarrollo del síndrome metabólico, ya que el reloj molecular impone oscilaciones circadianas en enzimas limitantes del metabolismo intermedio [157-159]. Por ejemplo, la fase de oscilación en la expresión de los genes de los islotes implicados en el metabolismo de la glucosa y la señalización de la insulina se retrasa en los ratones mutantes de *Clock* y *Artl* (denominación alternativa para *Bmal1*) [160]. Estas mutaciones también provocan una reducción sistémica de la tolerancia a la glucosa [161], una secreción limitada de insulina y defectos de tamaño y proliferación de islotes pancreáticos que

empeoran con la edad [162], debido a que la interrupción condicional del reloj pancreático conduce a alteraciones en la expresión de genes involucrados en su crecimiento y el ensamblaje de vesículas secretoras de insulina [163].

Por otro lado en adipocitos de ratón, la disminución en la expresión de *Clock* causa obesidad con pérdida de la ritmicidad circadiana en la expresión de adipocitoquinas y disminución de los niveles de adiponectina [164].

Los ratones con fenotipo *Clock*^{Δ19/Δ19} que expresan un factor de transcripción CLOCK mutante dominante negativo, desarrollan un espectro completo de enfermedades hepáticas cuando se exponen a una dieta alta en grasa, entre las que se incluyen esteatohepatitis y cirrosis [165], a la par que exhiben niveles altos de TG en suero [166]. En consecuencia, la mutación en el gen *Clock* predispone a los ratones a un riesgo mayor de contraer síndrome metabólico. Inclusive cuando estos ratones son alimentados con dieta normocalórica, muestran un ritmo de alimentación diurno muy atenuado, son hiperfágicos, obesos y desarrollan hiperleptinemia, hiperlipidemia, esteatosis hepática, hiperglucemia e hipoinsulinemia. Además, la expresión de transcritos que codifican péptidos hipotalámicos asociados con el equilibrio energético está atenuada en estos ratones mutantes [160].

Por otro lado, en modelos de ratones con fenotipo *Cry1/2*^{-/-} y *Rev-erba*^{-/-} también se cuenta con la evidencia suficiente para ligar la deficiencia de estos componentes del reloj al desarrollo de SM.[167, 168].

En humanos, se han identificado tres haplotipos del gen *CLOCK* (rs4864548, rs3736544, y rs1801260) junto con otros polimorfismos que afectan a la maquinaria del reloj y que predisponen diferencialmente al desarrollo de síndrome metabólico (Tabla 1).

Tabla 1. Polimorfismos en genes que controlan el reloj circadiano asociados con trastornos metabólicos.

Gen	SNPs	Variación	Localización	Patología	Referencia
<i>Clock</i>	rs10002541	T>C	Cromosoma 4, intrónico	Diabetes	[169]
	rs12649507	G>A	Cromosoma 4, intrónico	Ingesta alimentaria	[170]
	rs4580704	G>C	Cromosoma 4, intrónico	Diabetes, Enfermedades cardiovasculares, niveles alterados de HDL	[171]
	rs3749474	C>T	Cromosoma 4, 3-UTR	Ingesta alimentaria	[172]
<i>Per2</i>	rs7602358	G>T	Cromosoma 2, intrónico	Diabetes	[173]
<i>Per3</i>	rs57875989	Depleción/inserción	Cromosoma 1, comienzo del gen	Diabetes	[174]

<i>Bmal1</i>	rs11022775	C>T	Cromosoma 11, intrónico	Diabetes gestacional	[175]
	rs7950226	G>A	Cromosoma 11, intrónico	Diabetes gestacional	
<i>Cry1</i>	rs12315175	T>C	Cromosoma 12, intrónico	Diabetes	[176]
	rs8192440	A>G	Cromosoma 12, intrónico	Diabetes	[177]
<i>Cry2</i>	rs11605924	A>C	Cromosoma 11, intrónico	Diabetes	[177]
	rs2292912	C>G/T	Cromosoma 11, intrónico	Diabetes	[176]

2.3.2. El consumo de HFD altera los ritmos circadianos a nivel molecular y fisiológico

La relación entre el reloj circadiano y el metabolismo es bidireccional, por lo que los procesos metabólicos pueden alterarlo, como lo muestran diversas investigaciones en las que se observan disrupciones circadianas debidas a distintas intervenciones nutricionales (Figura 11).

Por ejemplo, ratones que generan obesidad por ser alimentados con una dieta de alto contenido calórico mostraron afecciones en la sincronización fótica del núcleo supraquiasmático, presentando alteraciones de fase en los ritmos normales de actividad y temperatura corporal. Estas alteraciones incluyen un retraso en el reinicio de los ritmos conductuales y de temperatura corporal después de la prueba de *jet-lag*, y una baja en la inducción de las vías de c-FOS y P-ERK tras estimular mediante luz al núcleo supraquiasmático [178], demostrando que la alimentación rica en grasa modifica la sincronización circadiana con la luz. Además, ratones alimentados con dieta alta en grasa (HFD) presentan cambios en el período del ritmo de actividad locomotora y alteraciones en la expresión y el ciclo de los genes centrales del reloj circadiano, los receptores nucleares que regulan los factores de transcripción del reloj y los CCGs involucrados en la utilización de energía en el hipotálamo, el hígado y el tejido adiposo; lo que inca que el consumo de una dieta alta en calorías altera la función del reloj molecular de los ratones [155].

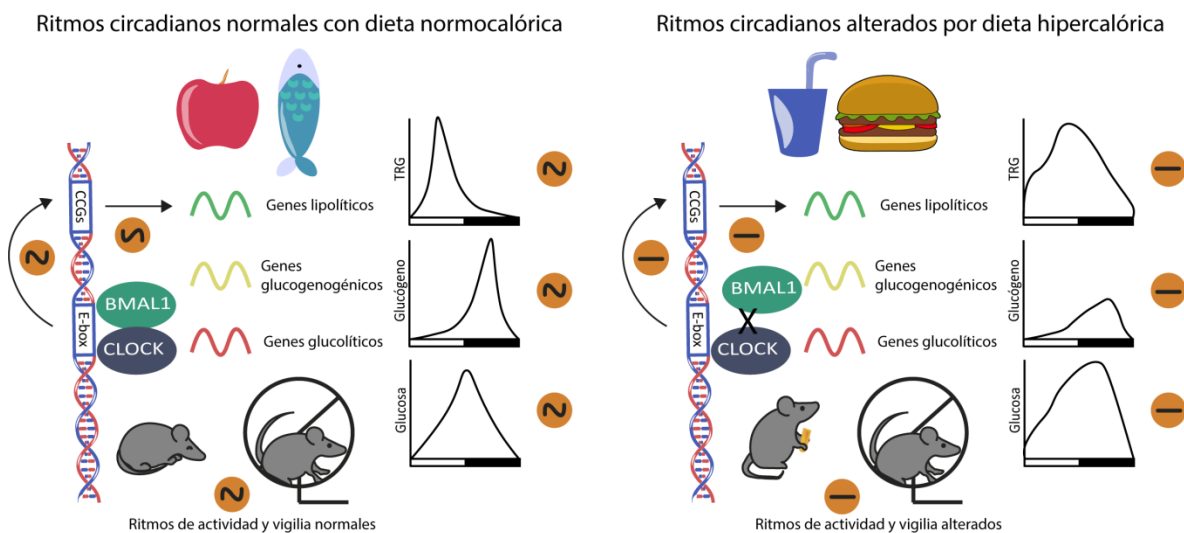


Figura 10. La dieta alta en grasa reprograma los ritmo circadianos.

Bajo una dieta normocalórica se observa ritmicidad en la unión de CLOCK:BMAL1 a la cromatina, por lo que la producción circadiana de transcritos que intervienen en vías del metabolismo energético se mantiene, induciendo oscilaciones en el metabolismo de TG, síntesis de glucógeno y glucosa, que favorecen la homeostasis energética a lo largo del ciclo sueño vigilia. La HFD desregula la unión de CLOCK:BMAL1 a la cromatina, lo que irrumpe la producción circadiana de genes reguladores del metabolismo energético, provocando cambios de fase y amplitud o incluso la desaparición de las oscilaciones circadianas de algunos metabolitos, al mismo tiempo que causa un retraso en la sincronización inducida por la luz del ciclo sueño/vigilia.

Se sabe que los niveles de expresión del gen *Nampt* poseen una robusta oscilación diurna en el hígado y el tejido adiposo de ratones, con un pico al comienzo del período nocturno, al ZT 12 [111]. Estas oscilaciones transcripcionales imponen ritmos diurnos a los niveles de la proteína NAMPT. Dichos patrones de oscilación circadiana en la transcripción de *Nampt* y la proteína a la que codifica, son eliminados por completo en ratones con el genotipo *ClockΔ19* que expresan una proteína CLOCK mutante y se ha observado que la ritmicidad del NAD⁺ se ve interrumpida en el hígado de ratones *ClockΔ19* y en fibroblastos embrionarios de ratón que carecen de la proteína CLOCK, además de observarse una reducción sistémica en las concentraciones de NAD⁺ [112].

Probablemente una de las alteraciones más significativas que induce la HFD, es la remodelación del transcriptoma circadiano. En hígado, conduce a alteraciones en la expresión y amplitud de los genes que controlan el reloj circadiano y de los CCGs involucrados en el control del metabolismo; además altera el reclutamiento a la cromatina de BMAL1:CLOCK, reprogramando el transcriptoma circadiano al suprimir las oscilaciones de algunos genes y generar oscilaciones de novo, conduciendo a una profunda reorganización de rutas metabólicas y a la aparición de oscilaciones en uno de los reguladores centrales de la lipogénesis, PPARY, que contribuye al desarrollo de obesidad e hígado graso [111]. Estos efectos a nivel transcripcional se ven acompañados de una profunda reorganización del metaboloma circadiano, que afecta las concentraciones de un gran número de metabolitos que presentan oscilaciones circadianas como es el caso del NAD⁺ [180].

2.3.3. El desbalance metabólico inducido por el decaimiento en los niveles de NAD⁺: Producto de una dieta alta en grasa

La biodisponibilidad del NAD⁺ a lo largo del ciclo circadiano es un potencial regulador temporal del metabolismo, debido a que la variación circadiana de su concentración afecta a las oxidoreductasas y a las enzimas consumidoras de NAD⁺ (ADP- poli (ADP-ribosa) polimerasas, cADP-ribosa sintasas y Sirtuinas) que lo utilizan como coenzima para llevar a cabo sus actividades catalíticas [181].

Dada la naturaleza crítica de las vías reguladas por la biodisponibilidad del NAD⁺, el mantenimiento de los niveles de este cofactor es imperativo para el funcionamiento óptimo de los

órganos. El decaimiento en los niveles de NAD⁺ está estrechamente relacionado al consumo de una dieta alta en grasa y al desarrollo de enfermedades metabólicas como la obesidad [182], debido a que la biosíntesis de NAD⁺ mediada por NAMPT está severamente comprometida en los órganos metabólicos a causa del consumo de una HFD [183]. La disminución del flujo de NAD⁺ en la célula provoca la irrupción de una amplia gama de disfunciones metabólicas que afectan el funcionamiento mitocondrial, procesos de inflamación, meiosis, autofagia, apoptosis y a los ritmos circadianos [184-186]; por ello en los últimos años se ha colocado como un blanco terapéutico con mucho potencial [187].

2.4. En NAD⁺ como terapia para combatir patologías relacionadas al síndrome metabólico

El papel del NAD⁺ como pieza fundamental del metabolismo ha experimentado un resurgimiento, debido al reciente cúmulo de evidencia que lo pone al centro de procesos clave como el envejecimiento [188], el estrés y la toxicidad celular [188] y el síndrome metabólico [189, 190]. Debido a ello se ha puesto énfasis en entender su biosíntesis, su relación con efectores metabólicos y su papel como fármaco de interés clínico.

Más allá de que se sepa que el NAD⁺ es fundamental para mantener el correcto funcionamiento del metabolismo celular, un balance adecuado en la biodisponibilidad de este metabolito protege, en particular al hígado, de la acumulación de grasa, la aparición de fibrosis y la resistencia a la insulina [191-195]; así como del desarrollo de patologías como hígado graso no alcohólico (NAFLD) y esteatosis hepática no alcohólica (NASH). Debido a estos antecedentes, el incremento en los niveles de NAD⁺ está siendo utilizado como una estrategia para contrarrestar estos estados patológicos (Figura 12).

Se han planteado diversas estrategias para aumentar las concentraciones de NAD⁺, por ejemplo a través de la estimulación de sus síntesis [106] mediante la manipulación de enzimas involucradas en su producción, como se ha observado al inducir la sobreexpresión de NAMPT [196], o potenciar su actividad con fármacos como el P7C3 [197]. Del mismo modo, la sobreexpresión de NMNAT [198] y NQPR1 [199] inducen aumentos en las concentraciones de NAD⁺. La ola más reciente de enfoques para estimular la producción de NAD⁺ se basa en el principio de prevenir el escape de intermedios de la ruta biosintética NAD⁺ por medio de la inhibición farmacológica de la enzima ACMS [200, 201].

Alternativamente, la suplementación con precursores de NAD⁺ como la Nicotinamida, la Nicotinamida ribósido (NR) y el βNMN es eficaz *in vitro* e *in vivo* para aumentar la concentración del

cofactor en ratones e incluso en humanos [202-205]. El ribósido de dihidronicotinamida se ha reportado recientemente como otro precursor bioquímico de NAD⁺, que induce un aumento consistente de sus concentraciones en mamíferos, líneas celulares y tejidos de ratón [206].

El potencial del aumento en las concentraciones de NAD⁺ se ha examinado en una variedad de modelos preclínicos y entornos de enfermedad, algunos de ellos relacionados al síndrome metabólico [195, 207-209]. El suministro intraperitoneal diario de β NMN (500 mg/Kg) en un grupo de ratones a los que se les indujo DT2 mediante el consumo de HFD, aumentó su tolerancia a la glucosa, mejoró su sensibilidad hepática a la insulina y restauró la expresión de genes que mejoraron el estrés oxidante, la respuesta inflamatoria y el ritmo circadiano, en parte a través de la activación de SIRT1. Además, los niveles de NAD⁺ y NAMPT muestran disminuciones significativas en múltiples órganos durante el envejecimiento, y el β NMN mejora la intolerancia a la glucosa y los perfiles de lípidos en ratones con DT2 inducida por la edad. Estos hallazgos brindan información crítica sobre una posible intervención nutricional contra la DT2 inducida por la dieta y la edad [183].

En particular, el aumento inducido en las concentraciones de NAD⁺ ha mostrado ser altamente efectiva para tratar trastornos hepáticos asociados con la obesidad. La NAFLD se caracteriza por una acumulación anormal de lípidos en el hígado, que supera el 10% de su masa total [210]; este incremento de ácidos grasos generalmente está provocado por una alimentación alta en carbohidratos [184-186], y se caracteriza por una función mitocondrial alterada, aumento del estrés oxidante, inflamación, fibrosis [211, 212] y una reducción en los niveles de NAD⁺ en los hepatocitos [213]. En este contexto, la preservación del contenido de NAD⁺ intracelular, parece ser un enfoque eficaz para prevenir la acumulación de lípidos hepáticos. Así, una vez establecido el NAFLD se ha demostrado en modelos murinos que el aumento en los niveles de NAD⁺ a través de la administración de β NMN atenúa la fibrosis por un mecanismo que involucra la reactivación de las enzimas sirtuinas [214]. En un modelo animal de cirrosis producida por la agudización del NAFLD, que se caracterizó por daño hepático grave, inflamación y fibrosis, se produjo una disminución e incluso en algunos individuos experimentales, se revirtió la progresión de la patología [215] al suministrar con β NMN.

El suplemento con NR en el alimento (400mg/peso/día) de ratones alimentados con una dieta hipercalórica redujo significativamente el peso corporal de los individuos así como los factores que predisponen al desarrollo de fibrosis⁺. También se observó un aumento del gasto energético debido a la regulación positiva de la β -oxidación en el músculo esquelético y el tejido adiposo pardo [216].

El éxito obtenido en modelos animales, basado en el aumento de las concentraciones de NAD^+ como coadyuvante de enfermedades metabólicas ha sido robusto, por lo que actualmente se desarrollan ensayos clínicos en humanos. Por ejemplo, en un ensayo clínico cruzado, aleatorizado y doble ciego, en el que se evaluó la suplementación crónica de la NR en humanos, se determinó una tolerancia favorable a este compuesto, y la estimulación eficaz del metabolismo de NAD^+ en personas sanas, adultos de mediana edad y mayores de 60 años. En este último grupo se reportó una reducción de la presión y rigidez arterial [217].

Es importante resaltar que en estas investigaciones, el suministro de NAD^+ es *ad libitum* y no se relaciona con su pico de biodisponibilidad, sin embargo, actualmente se cuenta con evidencia suficiente que indica la presencia de un diálogo entre la concentración circadiana de NAD^+ , el control de programas transcripcionales regulados por la maquinaria del reloj y los ciclos de anabolismo-catabolismo, que promueven la activación de vías metabólicas particulares en momentos específicos del día para responder a los requerimientos energéticos del individuo. Debido a ello, es importante caracterizar en un modelo de obesidad inducido por la dieta alta en grasa, el efecto del suministro de NAD^+ en forma de cronoterapia, para así poder dilucidar el impacto que tiene su biodisponibilidad en el metabolismo intermediario y en la maquinaria del reloj circadiano, así como en el control transcripcional y la oscilación de los CCGs, sobre todo de aquellos que codifican a proteínas que desempeñan un papel en la homeostasis energética del individuo.

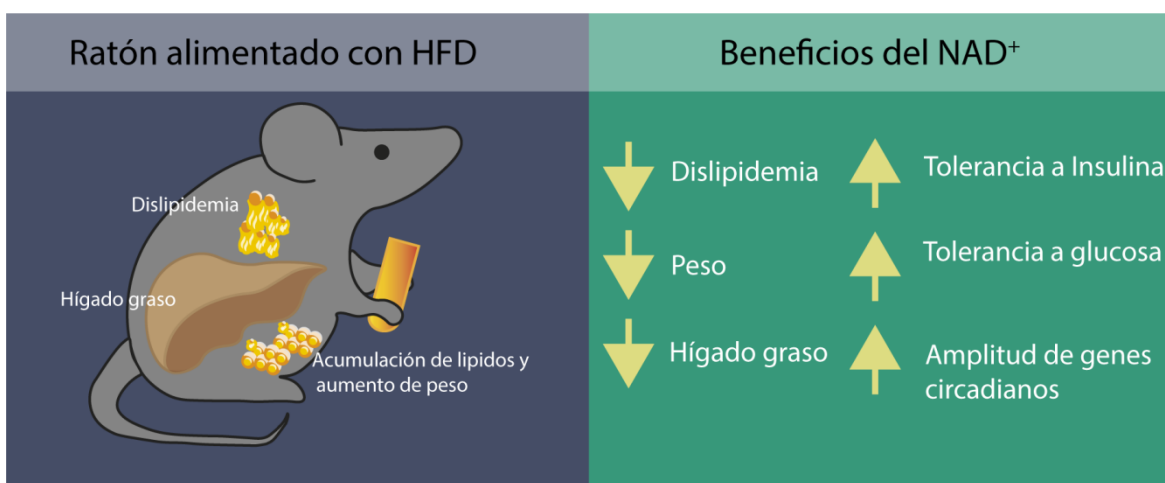


Figura 11. Beneficios del aumento en los niveles de NAD^+ .

Las dietas altas en grasa disminuyen los niveles endógenos de NAD^+ , la caída en las concentraciones de este metabolito está relacionada al desarrollo de patologías asociadas al síndrome metabólico. El incremento inducido con la suplementación de metabolitos como la NR, el βNMN y la Niacina, revierten los efectos de la dieta alta en grasa frenando el desarrollo de enfermedades metabólicas.

3. ANTECEDENTES INMEDIATOS

La mutación homocigota del gen *Clock* en ratones induce hiperfagia, obesidad, hiperlipidemia, esteatosis hepática, hiperglicemia e hipoinsulinemia contribuyendo así al desarrollo del síndrome metabólico [160]. Aunado a este hecho, la inactivación de *Clock* y *Bmal1* suprime la variación diurna de glucosa y triglicéridos, mientras que la gluconeogénesis es abolida por la depleción de *Bmal1* y es disminuida en la ausencia de *Clock* [218], evidenciando que la perturbación en el centro de control del reloj molecular influya en el desarrollo del síndrome metabólico. Por otro lado, también se ha descrito el efecto que provocan las dietas obesogénicas como agentes modificadores de los ritmos circadianos en mamíferos, alterando la expresión de los genes del reloj central como *Clock*, *Bmal1* y *Per2* con una consecuente alteración en las oscilaciones de CCGs como PPAR α y PPAR γ tanto en hígado como en tejido adiposo de ratón [155].

Por otro lado, investigaciones recientes revelan que la exposición a dietas ricas en grasa y el proceso de envejecimiento comprometen la biosíntesis del NAD⁺ y consecuentemente, conducen a la pérdida de los ritmos circadianos, desencadenando estados patológicos como hipoxia y diabetes tipo II [219-222]. De la misma manera, la restauración de los niveles de NAD⁺ mediante aporte nutricional constante puede revertir parcialmente este efecto negativo y mejorar el estado de salud en ratones [221, 222]. Sin embargo, aunque las concentraciones de NAD⁺ están controladas por el reloj circadiano, no se han implantado los principios de su tratamiento como cronoterapia, ni tampoco se ha dilucidado el efecto de aumentar las concentraciones de NAD⁺ sobre sensores metabólicos específicos ni sobre el mecanismo del reloj circadiano.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de las múltiples investigaciones que vinculan al sistema circadiano con el desarrollo y tratamiento de patologías asociadas al consumo de una dieta alta en grasa, su integración en la práctica clínica no está consolidada. Es muy llamativo que pese a la efectividad demostrada del NAD⁺ para combatir obesidad, hiperinsulinemia, NAFLD, entre otros, estos estudios pasan por alto el rasgo circadiano de su síntesis. En consecuencia, el impacto que tiene la oscilación de su biodisponibilidad en la eficacia de su suministro y en el mecanismo del reloj molecular bajo un contexto de obesidad, continúa en gran medida sin ser entendido. Por esta razón, descifrar cómo afecta el control circadiano en la biodisponibilidad del NAD⁺, a la funcionalidad de diversos mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de patologías asociadas a la obesidad, es imperante. De este modo, evaluar los efectos del tratamiento con NAD⁺ a distintas horas del día puede dar pistas muy valiosas que permitan aumentar su efectividad para modular el metabolismo energético, robustecer los ritmos circadianos e incrementar sus efectos benéficos sobre la salud.

En el presente proyecto se define el impacto de los ritmos circadianos del metabolismo del NAD⁺ en el mantenimiento de la homeostasis de lípidos y glucosa, así como en la ritmicidad diurna de mecanismos moleculares que influyen en el control de la glicemia, dislipemia y esteatosis hepática. De manera novedosa, se desea comprobar si el NAD⁺ suministrado al inicio de la fase activa aumentará su efectividad en el tratamiento de la fisiopatología de la obesidad inducida por la dieta en mayor medida que cuando se le suministra al inicio del periodo de descanso, y cómo el cambio de su biodisponibilidad circadiana impacta de manera directa al mecanismo molecular del reloj hepático.

5. HIPÓTESIS

La restauración de la ritmicidad circadiana del NAD^+ por medio del aumento de su biodisponibilidad al inicio del periodo de actividad en ratones con disfunción metabólica asociada a la ingesta de dieta rica en grasa, beneficiará la recuperación de la fisiopatología de la obesidad inducida por la dieta. Este efecto estará mediado, al menos en parte, por una reprogramación en la transcripción de genes que se evidenciará en las respuestas de cascadas de señalización intracelular específicas. Contrariamente, elevar los niveles de NAD^+ a horas del día que no serían requeridos por el tipo de metabolismo característico de este tiempo circadiano, como sería el inicio de la fase de inactividad, resultará menos eficaz en la corrección de la fisiopatología de la obesidad inducida por la dieta, debido a la reorganización del reloj circadiano hepático, quien funge como mediador para corregir la disfunción metabólica a través del NAD^+ .

6. OBJETIVO

Evaluar el efecto de la restauración de la ritmicidad circadiana del NAD⁺ y su aumento exógeno en antifase, sobre la fisiopatología de la obesidad en un modelo de obesidad inducida por la dieta en ratón y descifrar los actores moleculares implicados.

6.1. Objetivos particulares

- a) Generar un modelo de obesidad inducida por la dieta en ratón
- b) Restaurar las oscilaciones circadianas del NAD⁺ en ratones obesos mediante intervención cronofarmacológica.
- c) Evaluar si tras la elevación en las concentraciones del NAD⁺, se observan mejoras metabólicas en la patología de la obesidad y determinar si estas están asociadas a la intervención cronofarmacológica a un tiempo circadiano en particular.
- d) Evaluar el efecto de la restauración en los ritmos circadianos del NAD⁺ hepático en la transcripción de genes del reloj y genes circadianos en hígados de ratones con fenotipo obeso.
- e) Dilucidar el impacto de la biodisponibilidad del NAD⁺ en diversos sensores nutricionales como AKT, AMPK y mTOR, para determinar si a través de esta relación puede causarse un efecto protector sobre las afecciones metabólicas que provoca la obesidad.
- f) Evaluar el suministro del NAD⁺ en un ZT antifásico al que se observa su biodisponibilidad habitual.

7. METODOLOGÍA

7.1. Esquema general de experimentación

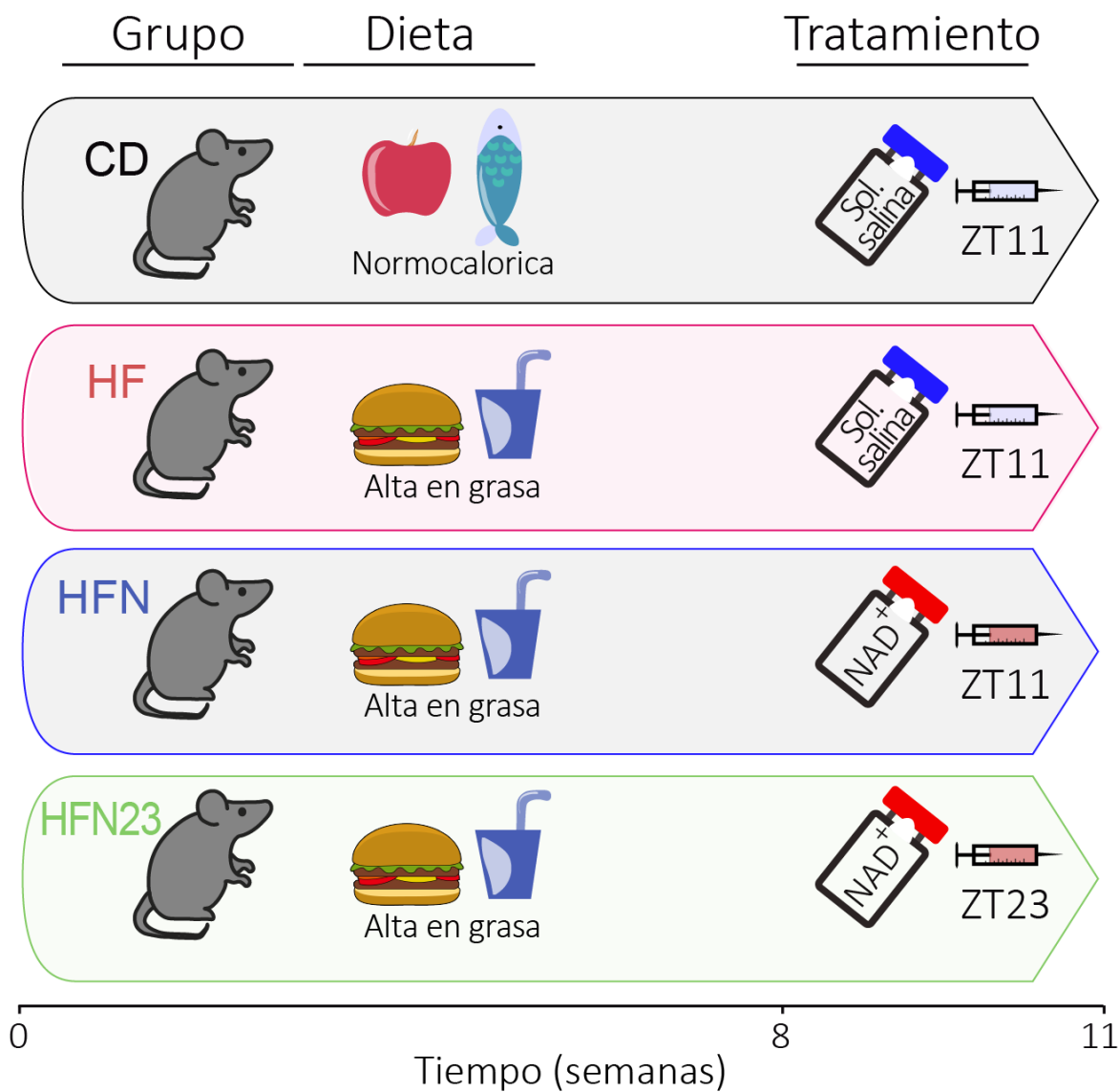
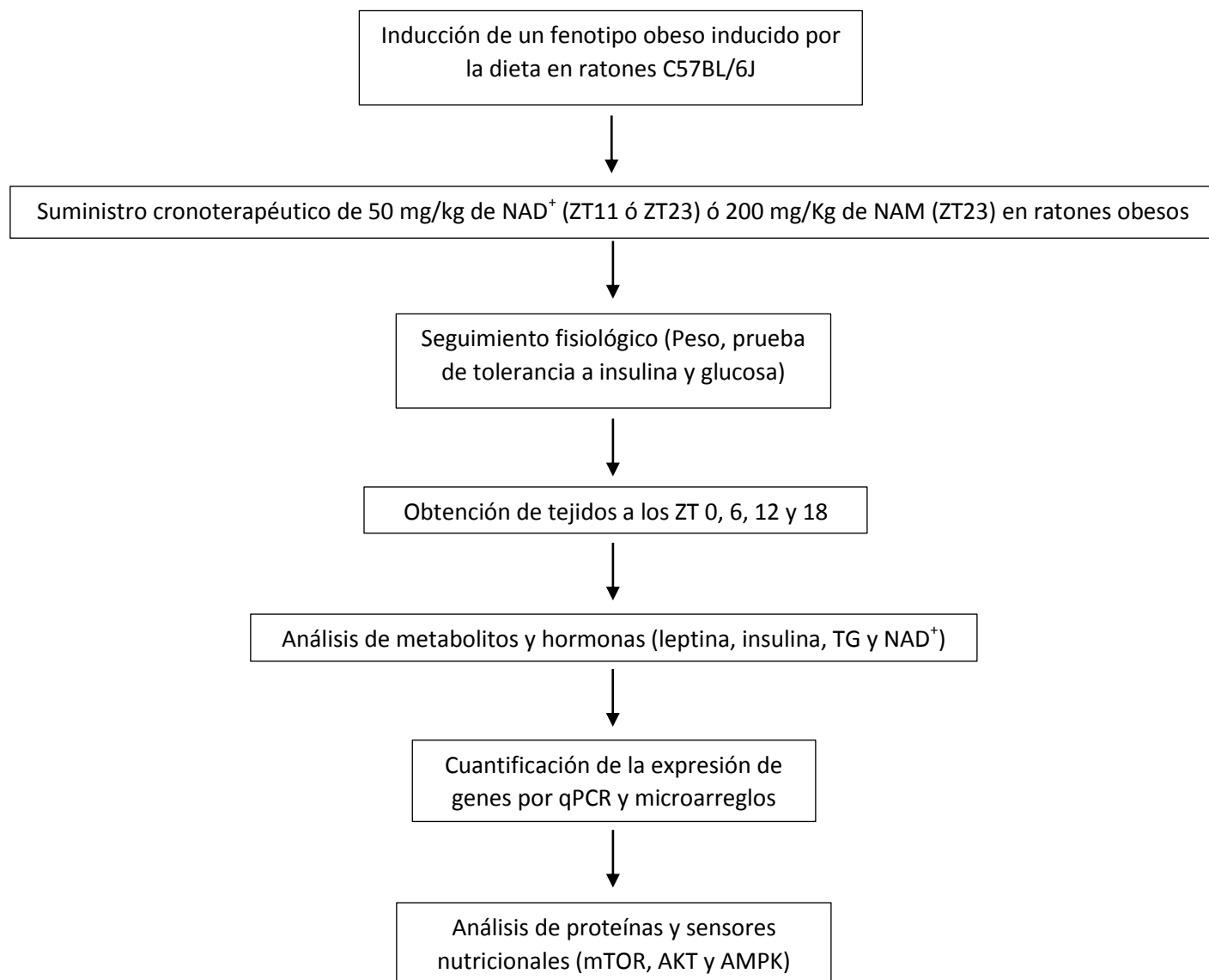


Figura 12. Esquema general de experimentación.

Cuatro grupos de animales fueron alimentados por 11 semanas con dieta normocalórica (CD) ó alta en grasa (HF, HFN y HFN23), a las 8 semanas se les aplicó solución salina al ZT11 (CD y HF) ó 50 mg/Kg de NAD⁺ al ZT 11 (HFN) ó 23 (HFN23).

7.2. Flujo de la estrategia experimental



7.2. Ratones y dietas

Se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6J, alojados en la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, en un ambiente de temperatura (24°C) y humedad controlados (44%), con ciclos LD de 12:12.

A partir de las cuatro semanas de edad, los ratones pertenecientes al grupo control, se alimentaron por diez semanas ad libitum con la dieta TD. 20185 Teklad global 18% protein rodent diet, en la que el 18% de cada Kcal/g de alimento proviene de las grasas, 24% provienen de proteína y 58% de carbohidratos. Por otro lado, una cohorte de animales de cuatro semanas de edad fue alimentada ad libitum en las 10 semanas posteriores con la dieta rica en grasa TD. 160547 Teklad Custom Diet, en la que el 53% de cada Kcal/g de alimento proviene de grasa, 15% provienen de proteína y 38% de carbohidratos. Ambas dietas fueron personalizadas para igualar el contenido de fuentes dietéticas de NAD⁺ suplementando con 0.2% de triptófano y 115 mg/kg de ácido nicotínico. Para mayores detalles de la dieta, consúltese su composición detallada en el apéndice A. La ingesta de alimentos y el peso corporal se midieron una vez a la semana.

Todos los protocolos se implementaron de acuerdo a la normativa vigente del Comité interno para el cuidado y uso de los animales de laboratorio, (CICUAL) del IIB, con el protocolo aprobado para el proyecto con registro ID240.

7.3. Estandarización del protocolo de cronoterapia para aumentar los niveles de NAD⁺

Se suministraron dosis de NAD⁺ (SIGMA-ALDRICH) correspondientes a: 800, 100, 50 y 10 mg/Kg de peso, a un grupo de diez ratones de la cepa C57BL/6J vía intraperitoneal al ZT 8, en un volumen aproximado de 180 µL, utilizando dos ratones por dosis. Adicionalmente se suministraron dos individuos con 180 µL de solución salina de cloruro de sodio (PISA), que fue el vehículo en el que se disolvió el NAD⁺. Los ratones fueron sacrificados 1 hora después del suministro con NAD⁺ por medio de dislocación cervical. Se extrajeron hígado, cerebro, tejido adiposo pardo, tejido adiposo blanco inguinal y sangre, para que inmediatamente posterior a su recolección los tejidos fueran preservados a -80°C hasta su uso.

Posteriormente se tomaron 100 mg de hígado evitando su descongelación para proceder a la extracción de NAD⁺ y la cuantificación de este metabolito por HPLC (como se detalla en la sección 6.4) con la finalidad de determinar la dosis de NAD⁺ más adecuada para su incorporación en la cronoterapia. Se seleccionó como dosis experimental la dosis mínima que indujo un aumento estadísticamente significativo de NAD⁺ hepático con respecto a los hígados de control. Por lo tanto,

para todos los experimentos, los ratones fueron inyectados vía IP con 50 mg / kg de peso corporal / día de NAD⁺ durante 20 días al ZT 11 (una hora antes de apagar las luces) o al ZT 23 (una hora antes de encender las luces).

En el caso de los individuos tratados con Nicotinamida (NAM), esta fue aplicada por vía intraperitoneal a los ZT 11 y 23 durante tres semanas, duplicando los parámetros experimentales del tratamiento con NAD⁺. Se inyectaron dosis de 200 mg/Kg de peso según lo publicado en reportes anteriores que demuestran un alza del NAD⁺ en hígado un hora después de la suplementación intraperitoneal con NAM [223]

7.4. Extracción de NAD⁺ a partir de tejidos de ratón

Se tomaron aproximadamente 100 mg de tejido almacenado a -80°C, evitando su descongelación. El tejido fue trasladado a un tubo de ensayo sumergido en hielo donde se le agregó HClO₄ al 10% en una proporción 1:10 (peso de tejido: volumen de HClO₄ 10%). La muestra fue homogeneizada con un Homogeneizador Polytron en intensidad 3 durante 1 minuto y se dejó reposar 15 minutos en hielo para posteriormente verter el homogeneizado en un tubo de 1.6 µL y centrifugar a máxima velocidad (~22,000 g) a 4 °C por 5 minutos. Se recolectaron 1.2 mL del sobrenadante para agregarles 0.4 mL de K₂CO₃ 3M y agitar en vórtex vigorosamente. La mezcla fue mantenida en hielo por 3 minutos para después centrifugarla a máxima velocidad (~22,000 g) a 4 °C por 5 minutos. Finalmente se recolectó el sobrenadante y se transfirió a otro tubo para ser almacenado a -80°C hasta su lectura en HPLC.

7.5. Determinación de las concentraciones de NAD⁺ por HPLC de fase reversa

Las mediciones de NAD⁺ se realizaron de acuerdo con Yoshino e Imai (2013) [79], con sutiles modificaciones. Se procesaron 100 mg de tejido congelado en un volumen final de 2 ml de HClO₄ al 10% con un homogeneizador Polytron (Kinematica CH-6010 Kiriens-Lu) y se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se neutralizó añadiendo un tercio del volumen de K₂CO₃ 3M y se agitó con vórtex. Después de 10 min de incubación en hielo, las muestras se centrifugaron a 13000 rpm a 4°C durante 5 min. El sobrenadante se diluyó al 30% con buffer de fosfato 50 mM (3.85% de KH₂PO₄ 0.5 M, 6.15% de K₂HPO₄ 0.5 M, agua grado HPLC al 90% (v/v/v), pH 7.0, se filtró a través de un filtro de 0.22 µm y se desgasificó). Se analizaron 50 µl de las muestras utilizando un sistema de HPLC LC VL (Agilent) conectado a un detector de matriz de diodos. Los analitos se separaron en una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 de 4.6 x 150 mm, 5 µm (Agilent p / n 993967-

902). La fase móvil fue corrida en gradiente se a un caudal de 1 ml/min y consistió en dos disolventes: (A) tampón fosfato 50 mM pH 6.8 y (B) metanol al 100%. La concentración inicial de A fue del 100%, la solución se mantuvo en la columna durante 5 min y luego B se aumentó progresivamente al 5% durante 1 min, se mantuvo al 5% B durante 5 min, seguido de un aumento al 15% de B durante 2 min, se mantuvo al 15% B durante 10 min y se volvió a las condiciones iniciales de 100% de A en 1 min, y se mantuvo al 100% A durante 6 min. El NAD⁺ se detectó usando una longitud de onda de muestra de 261 nm y una longitud de onda de referencia de 360 nm. Se utilizaron estándares adecuados, incluido NAD⁺, para la calibración e identificación del tiempo de retención/migración de NAD⁺ dentro de las muestras. El control del instrumento, la adquisición de datos y el análisis se realizaron utilizando el sistema Agilent ChemStation para LC, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los niveles de NAD⁺ se cuantificaron basándose en el área del pico en los cromatogramas en comparación con una curva estándar y se normalizaron al peso del tejido.

7.6. Prueba de tolerancia a glucosa

Se aplicó un ayuno de 12 horas previo al experimento. La glucosa basal fue determinada con un glucómetro ACCU CHEK active (ROCHE) tomando una muestra de sangre vía caudal; inmediatamente se procedió al suministro intraperitoneal de D-glucosa (SIGMA) en una dosis de 2g/Kg de peso disuelta en solución salina de cloruro de sodio (PISA). Los niveles de glucosa fueron registrados a los 15, 30, 60 y 120 minutos. Este experimento se realizó al ZT 4 y 16.

7.7. Prueba de resistencia a la insulina

Se aplicó un ayuno de 5 horas previo al experimento. La glucosa basal fue determinada con un glucómetro ACCU CHEK active (ROCHE) tomando una muestra de sangre vía caudal; inmediatamente se procedió al suministro intraperitoneal de insulina humana recombinante (Eli Lilly cat. HI0210) en una dosis de 0.6 UI/Kg de peso disuelta en solución salina de cloruro de sodio (PISA). Los niveles de glucosa fueron registrados a los 15, 30, 60 y 120 minutos. Este experimento se realizó al ZT 4 y 16. Al finalizar el experimento, los individuos fueron colocados inmediatamente en contacto con su dieta respectiva

7.8. Determinación de la concentración de leptina en suero

Se utilizó el Kit comercial Mouse leptin ELISA (Crystal Chem No. 90030), que incluye una placa de 96 pozos, la cual fue activada mediante dos enjuagues con 300 µL de buffer de lavado. Se dispensaron

45 μL del diluyente para muestras en cada pozo y 50 μL del anticuerpo anti-mouse leptin (que se provee listo para usarse). Posteriormente se agregaron 5 μL de la muestra de suero en una dilución 1:5 [suero:diluyente para muestra] ó 5 μL de estándar de leptina. Para la preparación de la curva patrón se realizaron diluciones dobles seriales del estándar provisto por el fabricante, según las instrucciones en el protocolo del kit.

Posteriormente se incubó la placa durante toda la noche a 4°C. Pasado este periodo el contenido de los pozos fue aspirado, para proceder a realizar cinco lavados utilizando 300 μL de buffer de lavado. Posteriormente se colocaron 100 μL de la enzima anti-guinea pig IgG, preparada según las instrucciones del kit, con la que se incubó durante 3 horas a 4°C.

Cumplido el tiempo de incubación, se aspiró el contenido de cada pozo y se realizaron siete lavados utilizando 300 μL de buffer de lavado. Se adicionaron 100 μL por pozo del sustrato enzimático para el anticuerpo secundario, dejándose reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente y en ausencia de luz. La reacción fue detenida con 100 μL de H_2SO_4 1N agitando suavemente la placa. La absorbancia fue medida dentro de los 30 minutos posteriores al paso anterior a 450 nm para sustraer estos valores a una lectura posterior de 630nm en el Synergy H1 microplate reader (BioTek). Las concentraciones de las muestras problema fueron determinadas mediante la resolución de la ecuación de la recta determinada con la curva estándar.

7.9. Determinación de la concentración de insulina en suero de ratón mediante un ensayo de ELISA

Se utilizó el Kit comercial Ultra sensitive mouse insulin ELISA (Crystal Chem No. 90080) que provee una placa de 96 pozos en la que se dispensaron 95 μL de diluyente para muestras. Posteriormente se colocaron 5 μL de muestra o estándares dentro de los pozos designados. Para la preparación de la curva patrón se realizaron diluciones dobles seriales del estándar provisto por el fabricante, según las instrucciones en el protocolo del kit. Se incubó por 2 horas a 4°C.

Transcurrido el tiempo de incubación, se aspiró el contenido de los pozos para ser enjuagados utilizando 300 μL de buffer de lavado. Se adicionaron 100 μL de la enzima conjugada anti-insulina y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se aspiró el contenido de los pozos y se aplicaron tres enjuagues con buffer 300 μL de buffer de lavado. A cada pozo se le adicionaron 100 μL de sustrato para el anticuerpo secundario con el que se incubó durante 40 minutos a temperatura ambiente aislando la placa de fuentes lumínicas. La reacción se paró con 100 μL H_2SO_4 1N. 15 minutos después se registró la absorbancia a 450 y 630 nm en el

Synergy H1 microplate reader (BioTek). Las concentraciones de las muestras problema fueron determinadas mediante la resolución de la ecuación de la recta determinada con la curva estándar.

7.10. Determinación de la concentración de triglicéridos a través de la oxidación del glicerol

Con el objetivo de determinar la concentración de triglicéridos en hígados de ratón, se recurrió a un método colorimétrico basado en la oxidación del glicerol utilizando el kit comercial Triglyceride colorimetric assay (Cayman chemical_Item No. 10010303), que consiste en la hidrólisis enzimática de los triglicéridos mediante la lipoproteína lipasa que da como resultado glicerol y ácidos grasos libres. La subsecuente oxidación del glicerol se da mediante el acoplamiento de tres reacciones enzimáticas: 1) El glicerol es fosforilado a glicerol-3-fosfato en una reacción catalizada por la glicerol cinasa 2) el glicerol-3-fosfato es oxidado por la glicerol fosfato oxidasa dando como resultado de la reacción dihidroxiacetona fosfato y H_2O_2 , 3) el peróxido de hidrógeno resultante es utilizado como sustrato de la peroxidasa para hacer reaccionar el H_2O_2 con la 4-aminoantipina y la N-etil-N-(3-sulfopropil)-m-ansidina (ESPA), dando como resultado la producción de $4H_2O$ y quinoneimina, un indicador colorimétrico que posee un pico de absorción entre los 530 y 550 nm.

Para su medición en suero se tomaron 5 μ L diluidos 1:5. Cuando la cuantificación de triglicéridos se realizó en hígado, se trasladaron 75 mg del tejido a un tubo de 1.6 mL evitando su descongelación. A la biopsia fueron añadidos 375 μ L de NP40 (1X) con inhibidor de proteasas cOpleteTM (Roche 1183617000) en concentración 1X. Posteriormente el tejido fue homogeneizado por 30 segundos en el homogeneizador D1000 Handheld homogenizer (Benchmark Scientific) en el nivel 3. Al término de la homogeneización se centrifugó a 10000g x 10 minutos a 4°C para posteriormente transferir el sobrenadante a un tubo nuevo inmerso en hielo. Se tomaron 20 μ L del extracto para ser diluido 1:5 [extracto:NP40 1X] y se adicionaron 5 μ L de la muestra por pozo. Tanto en la cuantificación en suero como en hígado, se dio inicio a la reacción añadiendo 75 μ L del mix de enzimas por pozo y se leyó a 540 nm en el Synergy H1 microplate reader (BioTek).

Para la preparación de la curva estándar se realizaron diluciones dobles seriales del estándar provisto por el fabricante, según las instrucciones del protocolo del kit.

7.11. Medición de la temperatura rectal y por termografía

La temperatura rectal (n = 10 ratones y 3 réplicas técnicas) se registró utilizando un termómetro digital portátil (BIOSEB) cada 3 horas durante 24 horas. Para la adquisición de termografía infrarroja, los ratones se colocaron dentro de una caja acrílica en la oscuridad. Las imágenes

térmicas se adquirieron en ZT 12 utilizando una cámara compacta de bolsillo con sistema de imágenes térmicas Inframetrics C2 (FLIR Systems) con una frecuencia de 9 Hz, sensibilidad térmica <math><0.10\text{ }^\circ\text{C}</math>, resolución n = 4, con 3 repeticiones técnicas). El procesamiento de imágenes se realizó utilizando el software FLIR-Tools (2020 FLIR® Systems).

7.12. Detección y cuantificación de gotas lipídicas en tejidos mediante la tinción con rojo oleoso

La detección de lípidos totales se realizó por medio del lisocromo rojo oleoso (ORO), que es un tinte soluble en grasa que tiñe lípidos neutros y ésteres de colesterol sin provocar coloración en membranas biológicas [224]. Para ello, se tomaron aproximadamente de 3 a 5 mm cúbicos de hígado evitando su descongelación. La biopsia fue embebida en Tissue-Tek (Sakura_4583) manteniéndola en hielo hasta que el Tissue-Tek solidifique. La temperatura del criostato se mantuvo entre -20 y -25°C, y se realizaron cortes de 10 μm . Los cortes se montaron en una laminilla previamente tratada con gelatina y se reservaron a -80°C hasta su uso.

Una vez preparadas las soluciones para la tinción (Véase apéndice B), las laminillas se descongelaron 10 minutos a temperatura ambiente. Se enjuagaron con PBS 1X y se escurrieron horizontalmente sobre una toalla húmeda. Se fijó con paraformaldehído al 4% durante dos minutos y posteriormente se enjuagaron con agua desionizada. Dentro de una cubeta de tinción, las laminillas fueron sumergidas en la solución de trabajo ORO durante 5 minutos. Después las laminillas se enjuagaron con agua desionizada hasta eliminar el exceso de tinte. La mitad de las muestras teñidas fueron reservadas para realizar la cuantificación de lípidos acumulados, mientras que las repeticiones técnicas fueron contra teñidas con Hematoxilina de Gill I durante 30 segundos la cual fue aclarada con una solución de litio 1:5 durante 3 segundos.

La cuantificación de lípidos acumulados en el tejido se realizó por medio del software ImageJ utilizando las imágenes capturadas en un microscopio óptico bajo el objetivo de 20X [224] dentro de las primeras 24 hr después de realizada la tinción con rojo oleoso. Se Fotografiaron un mínimo de 3 cuadros por cada una de las diferentes profundidades del tejido cortadas. Las imágenes RGB fueron convertidas a escala de grises de 8-bits, utilizando el siguiente flujo de comandos: Image \rightarrow Type \rightarrow 8-bit, y posteriormente se ajustó el rango de píxeles en negro (rojo oleoso) a tomar en cuenta para el análisis, para ello se siguió el flujo de comandos: Image \rightarrow Type \rightarrow Threshold tool.

Se cuantificó tamaño promedio de las gotas lipídicas, así como su porcentaje de ocupancia en la imagen por medio del siguiente flujo de comandos: Analyze → Analyze Particles. El análisis fue realizado en un entorno de imágenes añadidas por stack, para que fueran procesadas con los mismos parámetros de threshold y del programa Analyze Particles.

7.13. Extracción de RNA a partir de tejidos de ratón

Se tomaron aproximadamente 30 mg de tejido a los que se les añadieron 0.5 mL de Trizol® Reagent (TRizol™ Reagent, Invitrogen, cat. no. 15596018) para ser homogenizados por 30 segundos aproximadamente con el homogeneizador D1000 Handheld homogenizer (Benchmark Scientific, D1000 homogenizer) en el nivel 2 dentro de un tubo de microcentrífuga de 2 mL. El homogenado se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación completa del complejo de nucleoproteínas. Posteriormente se añadió 0.1 ml de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 15 segundos para posteriormente incubar a temperatura ambiente por tres minutos. Transcurrido este tiempo, la muestra fue centrifugada durante 15 minutos a 12000 g a 4°C. Al finalizar el tiempo de centrifugación la muestra se separó en tres fases: una fase inferior color rojo, una interface y una fase acuosa superior incolora que constituyó aproximadamente el 50% del volumen total; la cual fue extraída por medio de una micropipeta inclinando el tubo a 45°C y teniendo cuidado de no tomar la fase intermedia. Posterior al traspaso de la fase acuosa en un tubo nuevo, se agregaron 0.25 mL de isopropanol agitando suavemente antes de incubar por 10 minutos a temperatura ambiente para después centrifugar durante 10 minutos a 12000 g a 4°C. El sobrenadante fue desechado por decantación dejando únicamente el pellet de RNA, el cual fue resuspendido en 1 mL de etanol al 75% y se agitó en vórtex brevemente para posteriormente centrifugar durante 5 minutos a 7500 g a 4 ° C. Se decantó el sobrenadante con una micropipeta y posteriormente se dejó secar el pellet durante 10 minutos aproximadamente. El pellet resultante fue resuspendido en 20 µL de agua grado biología molecular (Corning® 46-000). La muestra se dejó a 4 °C durante toda la noche para asegurar una resuspensión completa. Finalmente 2 µL de la muestra fueron utilizados para cuantificar su concentración en el NanoDrop (Thermo Scientific) y el resto de la extracción fue almacenada -80°C hasta su uso.

7.14. Síntesis de cDNA.

Se realizó utilizando el kit de síntesis de cDNA iScript™ (Bio-Rad, cat. No 1708890). Se mezclaron 500 ng de ARN con 2 µl de 5X iScript Reaction Mix y 0.5 µl de la enzima iScript Reverse transcriptasa

en un volumen de 10 μ l. El termociclador (Axygen MaxyGene™ II) se programó de la siguiente manera: alineación durante 5 min a 25°C, transcripción inversa durante 20 min a 46°C e inactivación durante 1 min a 95°C. La reacción se enfrió a 4°C y se diluyó a 5 ng / μ l.

7.15. Cuantificación de transcritos por qRT-PCR

Las reacciones se realizaron en un volumen final de 10 μ l, añadiendo 5 μ l del reactivo Universal SYBR Green Super Mix (Bio-Rad, cat. 1725121), 2.5 μ M de *primer forward* y *reverse* y 7.5 ng de cDNA por reacción. El termociclador (Bio-Rad, CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System) se configuró en el siguiente programa: 30 s a 95°C seguido de 40 ciclos de 5 s a 95°C y 30 s a 65°C. La amplificación de un solo producto se verificó mediante un análisis integrado de la curva de fusión posterior al experimento. Los valores se normalizaron con respecto a los *house keeping* *B2m* y *Tbp*. Se utilizó la media geométrica para determinar los valores de Ct de los *house keeping* y se calcularon los valores de expresión de los genes de interés utilizando la metodología Δ CT. Las secuencias de los primers están disponibles en la Tabla 1 dentro de los apéndices.

7.16. Determinación del ratio mtDNA/nDNA en hígado de ratón

Se utilizaron ~10 mg de hígado para extraer el DNA por medio del Kit DNeasy© Blood & Tissue. La biopsia fue colocada en un tubo de 1.5 mL y se le adicionaron 180 μ L de buffer ATL para ser homogeneizada con el homogeneizador manual Pellet pestles (SIGMA-ALDRICH). Se añadieron 20 μ L de proteinasa K [5%] y se incubó a 56°C durante 90 minutos, agitando cada 30 minutos. Se añadieron 4 μ L de RNAsa A [100mg/mL] y se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente para agregar una mezcla de 400 μ L de etanol:buffer AL [1:1] y llevar al vórtex por 15 segundos. Se trasladó la mezcla a una mini columna y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto. Se sustituyó el tubo recolector por uno nuevo y se añadieron 500 μ L de buffer AW1 para centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto. Se sustituyó el tubo recolector por uno nuevo y se añadieron 500 μ L de buffer AW2 para centrifugar a 14000 rpm por tres minutos. Se colocó la columna en un tubo de 1.5 mL y se adicionaron 100 μ L de buffer AE, se centrifugó a 8000 rpm por un minuto previa incubación a temperatura ambiente durante un minuto. Se repitió el paso anterior depositando lo colectado en el tubo de 1.5 al interior de la columna procediendo a la cuantificación del DNA por medio de un NanoDrop (Thermo Scientific).

Se realizó una reacción de qPCR como se indica en el apartado 6.14 utilizando primers para la cuantificación de los genes S18 y mtCOX1 (véase Apéndice C para conocer la secuencia de los

primers). Finalmente se calculó el número relativo de copias de mtDNA utilizando la siguiente fórmula: $\Delta Ct = Ct(S18) - Ct(mtCOX1)$, por lo tanto: $mtDNA = 2^{\Delta Ct}$.

7.17. Perfil transcripcional de hígados de ratón

Se prepararon muestras de ARN provenientes de hígado para su análisis por *microarrays* utilizando nuestros procedimientos descritos anteriormente, con ligeras modificaciones. Brevemente, el ARN total se extrajo primero con el reactivo TRIzol (Invitrogen), luego se limpió con RNeasy Mini Kit (QIAGEN cat. No. 74106) de acuerdo con el protocolo de limpieza de ARN del fabricante. Los valores de RIN (≥ 7.0) se validaron con un Bioanalyzer RNA 6000 Nano (Agilent). Los experimentos de *microarrays* fueron realizados por la Unidad de *Microarrays* del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN, Ciudad de México) utilizando el ensayo Clariom™D para *Mus musculus* (Applied Biosystems™) en el sistema GenChip Scanner 3000 (Affymetrix). Los experimentos de *microarrays* se realizaron por triplicado ($n = 3$ réplicas biológicas). El Clariom™D Array consta de un catálogo de 66100 transcritos, 214900 genes codificantes, 498500 exones y 282500 uniones de empalme exón-exón de *Mus musculus*. Las secuencias se asignan a la base de datos UniGene del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Los datos brutos fueron procesados y analizados por el software Affymetrix MAS 5.0. Los cambios de amplitud dependientes de ZT se tomaron en cuenta solo si los cambios en los niveles de mRNA eran de más de 1.3 veces entre los valores diurnos y nocturnos y poseían diferencias estadísticamente significativas (prueba t de Student, $P < 0.05$). Los genes que se expresaron diferencialmente entre las condiciones se determinaron con una significación estadística en la prueba t de Student ($P < 0.05$). Los análisis funcionales se realizaron utilizando la herramienta "Compute Overlaps" para explorar la superposición con las bases de datos Canonical Pathways (CP), Procesos biológico de Gen Ontology (GO:BP) y *gen sets* en MSigDB. La herramienta está disponible en: <https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/annotate.jsp>, y estima la significancia estadística calculando el FDR *q-value*, análogo al valor hipergeométrico del *P-value* después de la corrección para pruebas de hipótesis múltiples según Benjamini y Hochberg. El análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA) se realizó utilizando GSEA v. 4.0.3. [225] para determinar la puntuación de enriquecimiento de los conjuntos de genes que integran un *set* contenido en MSigDB v7.0111 [226], seleccionando el método de clasificación Signal2Noise. El programa findMotifs.pl incluido dentro del software HOMER [227] se utilizó para el descubrimiento y enriquecimiento de motivos, buscando dentro de regiones genómicas que van de 300 Kb corriente arriba a 50 Kb corriente abajo

con respecto al sitio de inicio de la transcripción TSS, buscando motivos con una longitud de 6 a 8 pares de bases. El enriquecimiento de motivos se calcula mediante findMotifs.pl utilizando el método acumulativo de distribución hipergeométrica.

7.18. Extracción de proteínas

Se pesaron alrededor de 30 mg de hígado evitando su descongelación. El tejido fue homogeneizado con el homogeneizador D1000 Handheld homogenizer (Benchmark scientific) dentro de una solución de RIPA (ver la composición del buffer en el apéndice D), se agregaron 300 μ L de buffer por cada 10 mg de tejido. El buffer contaba con un coctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas en las siguientes concentraciones: cOmplete mini (ROCHE #11873580001) 1:25 v/v, PMSF 1mM, Na₃VO₄ 1mM y NaF 0.5mM. El homogenado se incubó por 20 min. a 4°C, agitando en vórtex cada 5 min. Se centrifugó a 13000 rpm durante 20 minutos a 4°C, para posteriormente rescatar el sobrenadante, el cual se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones, y se guardó el sobrenadante a -80°C hasta su utilización.

7.19. Cuantificación de la concentración de proteínas por el método de Bradford.

Partiendo de una concentración de 200 μ g/ μ L de BSA disuelto en buffer de RIPA, se realizaron diluciones seriadas de 6.4, 3.2, 1.6, 0.8 y 0.4 μ g/ μ L de BSA, más un blanco que contenía RIPA. En una placa de 96 pozos se colocaron 200 μ L de reactivo de Bradford (SIGMA #B6916), al que se les adicionó 2 μ L de cada una de las diferentes concentraciones de albúmina bovina antes expuestas, para la realización de la curva patrón. Del mismo modo, 2 μ L de la muestra problema fue también adicionado a 200 μ L de reactivo de Bradford. Se incubó en ausencia de luz por 10 min., para finalmente llevar la placa a un lector de ELISA, en el que se registró la absorbancia a 595 nm en el Synergy H1 microplate reader (BioTek).

7.20. Determinación del estrés oxidante mediante la cuantificación de grupos carbonilo en hígado de ratón.

Se añadieron 400 μ L de extracto proteico de hígado de ratón en una concentración de 0.5 mg/mL a un tubo de 1.5 mL con 400 μ L de 2,4-dinitrophenylhydrazina [10 mM en 0.5 M H₃PO₄] (SIGMA-ALDRICH), y pasados 10 minutos de incubación a temperatura ambiente evitando la exposición a la luz, se añadieron 200 μ L de NaOH [6M]. Simultáneamente se preparó un blanco sustituyendo el extracto de proteína por 400 μ L de buffer de RIPA. Tras 10 minutos de incubación, se procedió a

leer en el espectrofotómetro bajo una absorbancia de 450 nm. El contenido de proteína con grupos carbonilo (PCO) expresado como nmol de PCO/mg de proteína se calculó utilizando la siguiente fórmula: $\text{PCO/mg de proteína} = [106(\text{ABS}_{450 \text{ nm}}/22000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})/(\text{mg/mL de proteína})]$.

7.21. Detección de proteínas por Western Blot

Las soluciones de carga para los inmunoblots se prepararon realizando concentrados de proteína de 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ añadiendo buffer de Laemmli 6X (60 mM Tris HCl pH 6.8, 12% SDS, 47% glicerol y 0.03% azul de bromofenol) a una concentración de 1:6 [volumen total:buffer de Laemli 6X] y 1M DTT a una concentración de 1:20 [volumen total: 1M de DTT]. Previo a su uso inmediato, las proteínas fueron desnaturalizadas exponiendolass a 98°C por 5 min en un thermoblock. Se prepararon geles separadores con bis-acrilamida al 40% [37.5:1] a una concentración del 5.5% para mTOR y mTORSer2448; al 14 % para detectar 4EBP1. La acrilamida al 40% [29.1:0.9] se utilizó para la preparación de geles desnaturalizantes al 10% para la detección de p70 S6K, AMPK, Beclina-1, p90RSK, PPARY, SIRT1 y AKT. Mientras que se prepararon geles al 8% para detectar a ULK1 y RAPTOR. La proteína CEBP α fue corrida en un gel separador al 12%. El gel concentrador se preparó con acrilamida al 40% [29.1:0.9] en una concentración del 4% en todos los casos.

Se cargó cada una de las muestras, 20 μg para la detección de proteína total y 40 μg para la detección de PTMs, pipeteando 12 ó 16 μL de la solución de carga en cada carril, así como el marcador de peso molecular (PAGE Ruler Plus, Thermo Scientific #26619). La electroforesis se llevó a cabo en una cubeta mini-PROTEAN Tetra system (BIO-RAD) con un voltaje constante de 100V durante ~2h utilizando buffer de corrida (192 mM Glicina, 25 mM Tris base y 0.1% SDS). La transferencia fue realizada a 40V durante toda la noche a 4°C con buffer de transferencia (192 mM Glicina, 25 mM Tris base y 20% de metanol), hacia una membrana de PVDF Immobilon-P (Merck-Millipore). Una vez finalizada la transferencia, la membrana fue bloqueada con 5% w/v leche libre de grasa, 1X TBS 0.05% Tween©20 con agitación gentil durante 1 hora. Posteriormente, la membrana fue lavada por 20 minutos con 1X TBS 0.5% Tween©20 cambiando esta solución cada 5 min. Las membranas se incubaron a 4°C durante toda la noche con el anticuerpo primario. Los anticuerpos primarios utilizados en este estudio fueron: Provenientes de Cell Signaling: PPARY (2443), AKT (9272), Phospho-AKTSer473 (9271), AMPK α (5831), Phospho-AMPK α Thr172 (50081), mTOR (2893), Phospho-mTORSer2448 (5536), Phospho-p70 S6KThr389 (9234), Phospho-4E-BP1Thr37/46 (2855), RSK1/RSK2/RSK3 (9355), Phospho-p90RSKSer359 (8753), REV-ERB α (13418), Raptor (2280), Phospho-RaptorSer792 (2983), ULK1 (8054), Phospho-ULK1Ser555 (5869), Beclin-1 (3495), and Phospho-Beclin1Ser93 (14717), diluidos 1:1000; de Santa Cruz: C/EBP α (SC-365318, 1:500); de

Abcam: BMAL1 (Ab3350, 1:1000) y MTCO1 (Ab14705, 1:2000); de Alpha Diagnostics International: PER2 (PER21-A 1:2000); de Bethyl Laboratories: CRY1 (A302-614A 1:1000); de Sigma: α -Tubulin (T5168, 1:80000); de Genetex: GAPDH-HRP (GTX627408-01, 1:120000) y P84 (GTX70220-01, 1:1000). Los anticuerpos secundarios fueron Anti-rabbit IgG (Cell Signaling, 7074, 1:150000 para BMAL1, 1:10000 para PPAR γ y 1:80000 para el resto de las proteínas o Anti-mouse IgG (Sigma I8765, 1:80000) (ver apéndice D para ver la identificación y las condiciones de dilución de cada anticuerpo).

Se lavaron las membranas con TBS-Tween 0.5% para eliminar el exceso de anticuerpo, y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios anti-Rabbit-HRP o anti-mouse-HRP, según correspondiera (ver apéndice C). Finalmente se reveló la membrana por quimioluminiscencia en el equipo Gel Logic 1500 Imaging System (KODAK) utilizando Chemiluminiscent HRP Substrate (Millipore). Las bandas de las proteínas fueron cuantificadas por densitometría utilizando el software Studio Lite Version 5.0 (LI-COR biosciences). De 4 a 5 réplicas fueron utilizadas para la cuantificación.

7.22. Inmunofluorescencia contra mtCOX1

Se incluyeron en Tissue-Tek (Sakura_4583) de 3 a 5 mm cúbicos de hígado congelado y posteriormente se realizaron cortes de 10 μ m manteniendo la temperatura del criostato de entre -20 a -23 °C. Los cortes fueron montados en una laminilla previamente tratada con gelatina y se reservaron a -80 °C hasta su uso. Tras retirar las laminillas de su almacenamiento, se colocaron a T.A. por 5 minutos y se procedió a fijarlas con PFA 4% por 10 minutos a 4 °C. Posteriormente se lavaron con PBS pH 7.4 en agitación constante por 10 minutos, para después ser lavadas dos veces por 10 minutos con PBST 0.05% Triton-X100 en agitación constante para proceder a su bloqueo durante 1 h a T.A. con solución de bloqueo (3% w/v BSA, 1X PBST 0.05% Triton-X100). Se diluyó el anticuerpo primario con solución de bloqueo y se incubó durante toda la noche a 4°C en agitación. Posteriormente el anticuerpo fue retirado con micropipeta y eliminado con 3 lavados de 10 minutos en agitación con PBST. Posteriormente se incubó con anticuerpo secundario (1:1000 en solución de bloqueo) por 2 horas y se retiró con 3 lavados de PBST por 10 minutos en agitación, para después incubarse con DAPI (1:10000 en PBS pH 7.4) durante 5 minutos. Finalmente el DAPI se retiró con 2 lavados de 10 minutos en agitación constante con PBS pH 7.4. Las laminillas fueron montadas con medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, H-1000-10) y observados bajo el objetivo de 40X.

7.23. Determinación de los perfiles de actividad motriz y conducta alimentaria

Los ratones fueron introducidos a un sistema de registro modelo OA_Spad19-12 basado en sensores infrarrojos capaces de monitorear la actividad ambulatoria y la conducta alimentaria, esta última por medio de la detección en la recurrencia de visitas al comedero. A los 11 días de haber sido introducidos se comenzó el suministro de NAD⁺ al ZT 11 o 23, según correspondiera hasta el término del tratamiento. Los datos fueron recabados con el programa OASPAD20 y analizados con el programa RhythmicAlly [228], un programa de código abierto que corre en R y que permite procesar y visualizar datos de naturaleza circadiana.

7.24. Extracción de núcleo supraquiásmico de cerebros de ratón

El núcleo supraquiásmico fue extirpado directamente de cerebros congelados de ratón utilizando unas tijeras pequeñas de disección. Una vez obtenido el NSQ, se depositó en Trizol para proceder a la extracción de mRNA.

7.25. Análisis estadístico

Todos los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media. Los análisis estadísticos fueron realizados aplicando análisis de varianza de dos vías (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples, excepto cuando se indique lo contrario en las leyendas de las figuras. Las diferencias entre los grupos se calificaron como estadísticamente significativas con $P < 0.05$. GraphPad Prism versión 5.0 para Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE. UU.) y Excel (Microsoft Office 360) se utilizaron para los análisis estadísticos y la elaboración de las gráficas.

La ritmicidad circadiana se evaluó empleando CircWave versión 1.4.6, CircWave usa una regresión armónica lineal hacia adelante para calcular el perfil de la onda ajustada en un período de 24 h. La ritmicidad circadiana se confirmó cuando se rechazó la hipótesis nula con respecto a la amplitud, al ejecutar una prueba F que produjo un valor significativo ($P < 0,05$). Circwave proporcionó el cálculo del centro de gravedad (CoG), que representa la acrofase de la curva, con desviación estándar.

8. RESULTADOS

8.1. Estandarización del suministro de NAD⁺

La biodisponibilidad del NAD⁺ varía a lo largo del ciclo circadiano. Debido a que su patrón de oscilación puede alterarse como consecuencia de la exposición a esquemas de alimentación hipercalórica y al suministro exógeno de NAD⁺, determinamos las condiciones necesarias para la cuantificación de las concentraciones hepáticas de este metabolito a lo largo de un periodo de 24 horas. Partiendo de un conjunto de 16 ratones BALB/c con aproximadamente 3 meses de edad y alimentados con dieta normal, se constituyeron cuatro grupos de cuatro individuos cada uno, los cuales fueron sacrificados mediante el método de dislocación cervical al ZT 0, ZT 6, ZT 12 y ZT 18 (N = 4). Inmediatamente a su sacrificio se extrajo NAD⁺ hepático y se cuantificó por HPLC (Figura 13A).

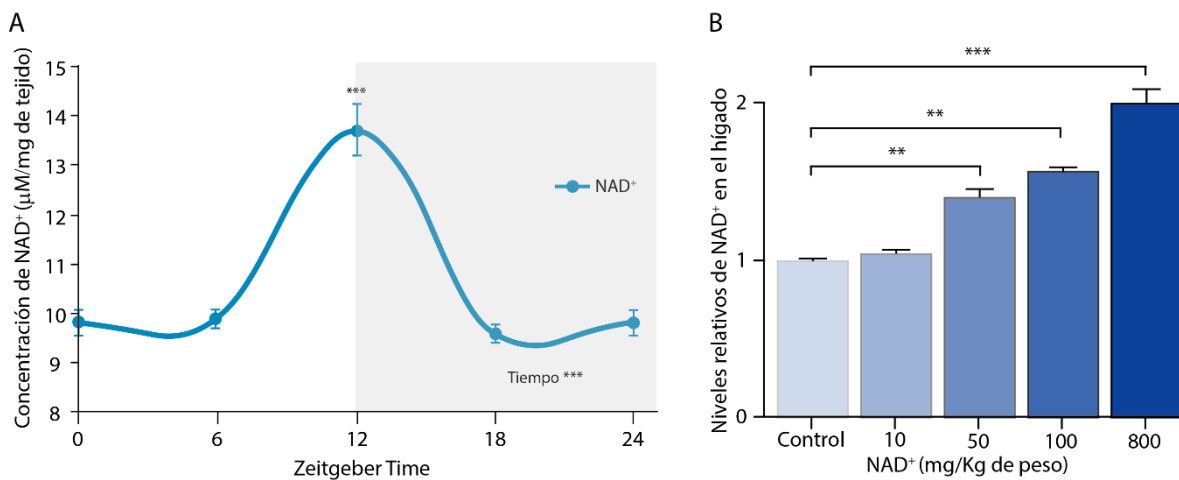


Figura 13 . Concentraciones hepáticas de NAD⁺ en las pruebas de estandarización.

(A) Niveles circadianos de NAD⁺ a lo largo de un periodo de 24 horas (Por cada ZT N = 4 replicados biológicos N = 3 replicados técnicos). (B) Aumento de las concentraciones hepáticas de NAD⁺ tras el suministro de diferentes dosis con dicho metabolito (N = 2 replicados biológicos, N = 3 replicados técnicos por dosis). Las barras de error representan el error estándar. Los datos fueron analizados con ANOVA de una vía con el post hoc test de Dunnett para comparaciones múltiples ($\alpha=0.05$). *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

Se detectó un aumento estadísticamente significativo de la concentración de NAD⁺ hepático al ZT 12 con respecto al resto de los ZT en los que existen concentraciones basales de éste metabolito (~10 µM/mg de tejido) durante el resto del día, ubicando su acrofase al inicio del periodo nocturno. Observamos que el perfil de oscilación de los niveles de concentración de NAD⁺ que determinamos a lo largo de un ciclo circadiano, es compatible con reportes previos de la literatura [111]. De esta manera, la detección por HPLC de los niveles circadianos de NAD⁺ en hígados de ratón tuvo la resolución necesaria para su cuantificación.

Al momento en el que se comenzó la ejecución de este proyecto, no existían reportes previos que nos sirvieran de antecedente para establecer la dosis de NAD⁺ a administrar. Con el fin de determinar la dosis adecuada a aplicar en la cronoterapia, se suministró NAD⁺ vía I.P. en concentraciones de 800, 100, 50 y 10 mg/Kg de peso a una cohorte de 10 individuos. Adicionalmente se suministró con solución salina a un individuo para ser utilizado como control. La dosis de 10 mg/Kg de peso no posee diferencias estadísticamente significativas con respecto a la concentración de NAD⁺ cuantificada en el control (Figura 13B). En los individuos que recibieron dosis de 800, 100 y 50 mg/Kg de peso, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control, por lo que se seleccionó la dosis de 50 mg/Kg de peso por ser la concentración más baja que causó un aumento estadísticamente significativo en los niveles de NAD⁺ hepático, por lo que la dosis de 50 mg/Kg de peso de NAD⁺ fue la seleccionada para incorporarse en el esquema cronoterapéutico.

8.2. La cronoterapia con NAD⁺ al ZT 11 restituye la ritmicidad circadiana de este metabolito en el hígado de animales alimentados con dieta hipercalórica.

La pérdida de la oscilación circadiana en las concentraciones de NAD⁺ provocada por el consumo de una dieta hipercalórica, ha sido asociada a diferentes patologías hepáticas [181, 213]. Con la finalidad de evaluar los posibles efectos benéficos que tiene la restructuración de las oscilaciones circadianas en la biodisponibilidad de este metabolito, se evaluó el efecto de la cronoterapia en los niveles hepáticos de NAD⁺ por medio de su cuantificación en HPLC a los ZT 0, 6, 12 y 18. Como se esperaba, el grupo CD muestra la oscilación típica en las concentraciones de NAD⁺ con un pico máximo al ZT 12 [111, 219, 229] (Figura 14A), contrastando dicho perfil con el obtenido para el grupo HF, en donde se observan niveles por arriba de lo normal en ZT 0 y 24, así como una baja en las concentraciones de este metabolito al ZT 12, encontrándose en todos los casos mencionados diferencias estadísticamente significativas. El tratamiento con NAD⁺ a ZT 11 en los animales obesos logró elevar los niveles de NAD⁺ hepáticos de manera significativa en el ZT 12.

Adicionalmente se determinó la presencia de ritmicidad circadiana en el patrón de concentraciones diarias de NAD⁺, observándose la oscilación de este metabolito en el grupo CD y la pérdida de esta en el grupo HF como consecuencia del consumo de HFD. Interesantemente, el suministro de NAD⁺ al ZT 11 rescata la oscilación circadiana de este metabolito, reestableciendo su acrofase al ZT 12 en el grupo HFN (Figura 14B).

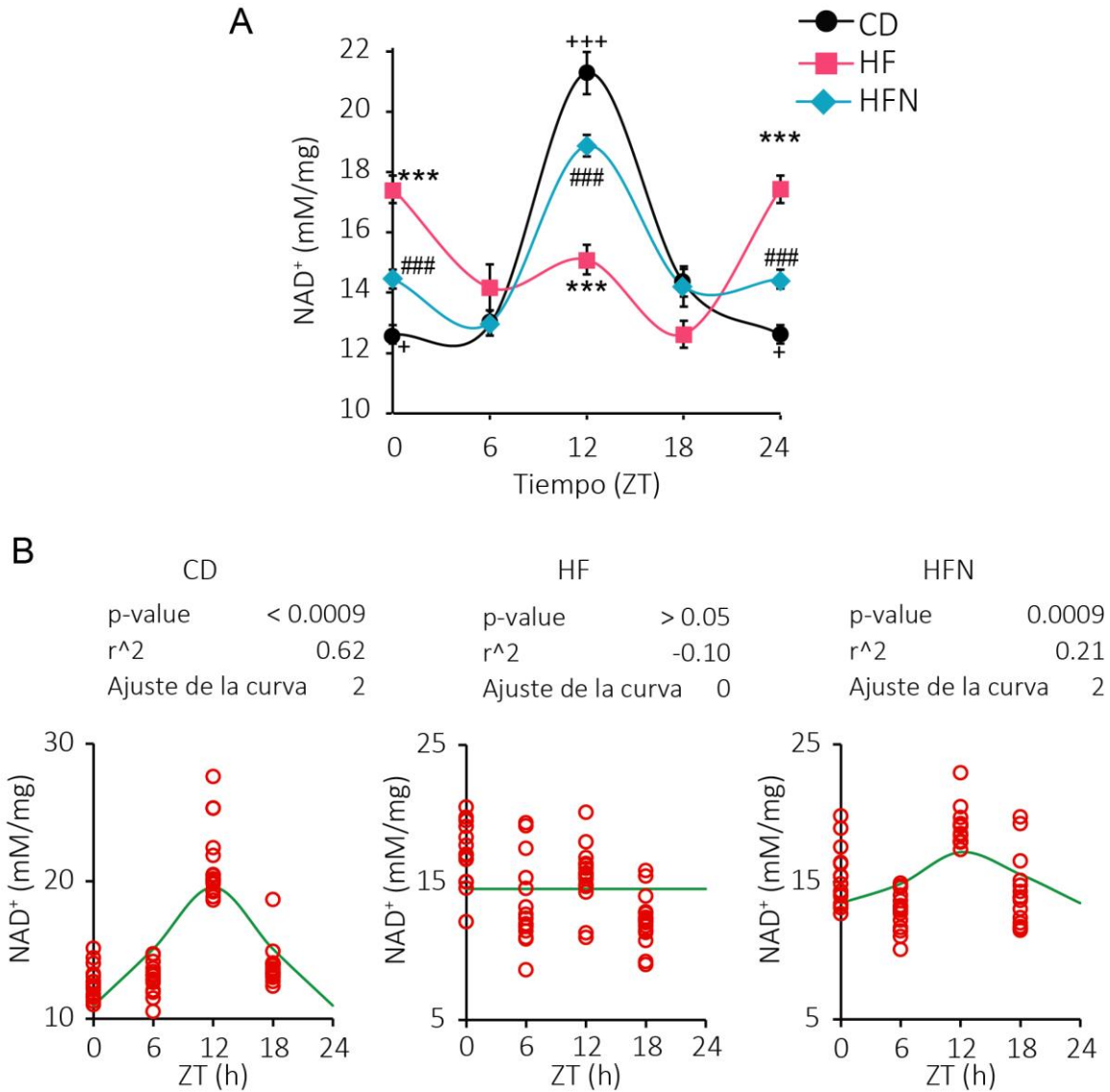


Figura 14. La inyección de NAD⁺ a ZT11 en animales obesos restituye la oscilación diurna hepática de este metabolito a patrones comparables con los controles.

(A) Concentraciones de NAD⁺ hepático al ZT 0, 6, 12, 18 y 24 correspondientes a los grupos CD, HF y HFN medidas por HPLC. (B) Análisis estadístico de oscilación con circawave sobre la concentración de NAD⁺ hepático de los grupos Cd, HF y HFN. Los datos se extrajeron de tres repeticiones técnicas provenientes de 5 individuos por cada ZT (N = 20 ratones por grupo). Los datos representan el promedio +SEM. El análisis estadístico corresponde a una ANOVA de dos vías con post hoc test de Tukey para comparaciones múltiples ($\alpha=0.05$). *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001. *diferencia estadística entre CD y HFN, * Diferencia estadística entre CD y HF, + diferencia estadística entre CD y HFN, # diferencia estadística entre HF y HFN. Los parámetros circadianos que se reportan fueron calculados usando el software CircWave V 1.4.

8.3. La cronoterapia con NAD⁺ revierte la ganancia de peso sin alterar el consumo energético en individuos alimentados con dieta alta en grasa

Se trabajó con una cohorte de 60 ratones machos de la cepa C57BL/6J con 8 semanas de edad expuestos a ciclos de luz y oscuridad de 12:12 horas, de la cual se formaron tres grupos de 20 individuos cada uno. Cada grupo fue sometido a un régimen de dieta ad libitum específico durante

11 semanas. El grupo identificado como CD fue alimentado con una dieta normocalórica; el grupo identificado como HF fue alimentado con una dieta alta en grasa al igual que los individuos del grupo identificado como HFN, a los que adicionalmente se les suministraron vía intraperitoneal 50mg/Kg de peso de NAD⁺ cada 24 horas a partir de la semana 8 hasta finalizada la semana 11 siguiendo un protocolo estandarizado de cronoterapia (Figura 15A).

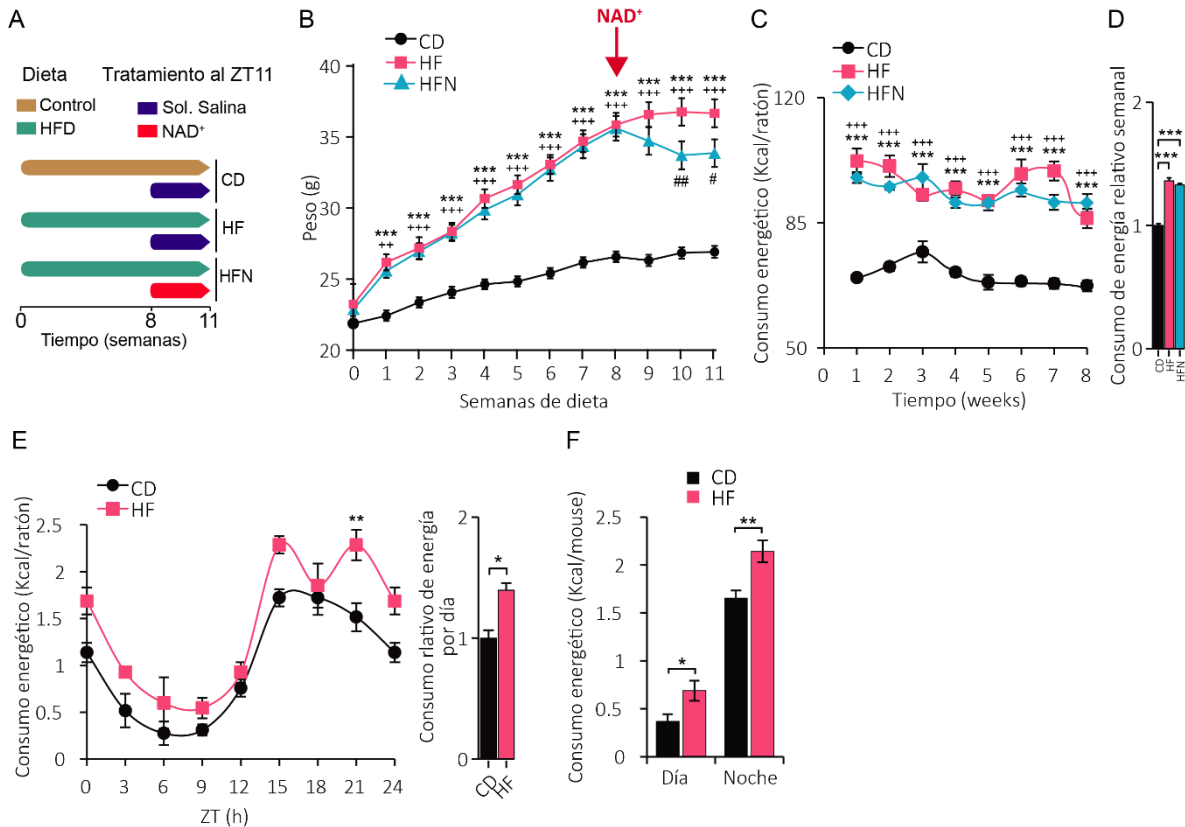


Figura 15. Ratones alimentados con HFD pierden peso tras el suministro de NAD⁺ sin disminuir su consumo energético.

(A) Durante 10 semanas se alimentó con dieta normocalórica al grupo CD e hiper-calórica a los grupos HF y HFN. (B) Peso de los grupos CD, HF y HFN, se indica con una flecha el inicio de la cronoterapia con NAD⁺. (C) Consumo de Kcal semanal previo al suministro de NAD⁺. (D) Consumo energético promedio semanal normalizado con los valores del control. (E) Consumo calórico registrado cada 3 horas en animales alimentados con dieta normocalórica e hiper-calórica junto al consumo energético promedio consumido al día. (F) Consumo energético consumido durante el periodo diurno y nocturno. Los datos representan el promedio +SEM (n=20). HFD: *High fat diet*. El análisis estadístico corresponde a una ANOVA de una vía en el caso de los histogramas y de dos vías en las gráficas de dispersión, con post hoc test de Tukey para comparaciones múltiples ($\alpha=0.05$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. * Diferencia estadística entre CD y HF, + diferencia estadística entre CD y HFN, # diferencia estadística entre HF y HFN.

Por medio de pesajes semanales, se determinó el efecto de suministrar NAD⁺ al ZT 11 sobre el aumento de masa corporal en un contexto de obesidad (Figura 15B). No existieron diferencias estadísticamente significativas en el peso inicial de los tres grupos (día 0). A partir de la semana uno del suministro de los regímenes correspondientes de dieta y hasta la semana 11, las diferencias de peso entre el grupo control y los grupos alimentados con dieta hiper-calórica, fueron estadísticamente significativas ($P < 0.05$), finalizando el estudio con un peso promedio de $26.92g \pm$

0.4, $36.68g \pm 0.9$ y $33.87g \pm 0.9$ para los animales del grupo CD, HF y HFN respectivamente (Figura 15 B). Así, posterior al inicio de la cronoterapia a la semana 8, se observó pérdida de peso en los individuos a los que se les otorgó NAD⁺, siendo esta significativa a las semanas 10 y 11, mostrando que el suministro de este metabolito al ZT 11, protegió del aumento de peso inducido por el consumo de una dieta alta en grasa que se observó en los individuos obesos a los que se les negó el tratamiento.

Para definir la homogeneidad del consumo energético en los grupos alimentados con dieta hipercalórica se cuantificó el consumo de kcal hasta la semana previa al tratamiento con NAD⁻. Ambos grupos de individuos alimentados con dieta rica en grasa consumen una cantidad mayor de kcal con respecto al grupo control a lo largo de las 8 semanas en las que se recabaron estos datos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de individuos obesos que recibió cronoterapia y los que no la recibieron (Figura 15C). De modo similar, el consumo promedio semanal de kcal no arrojó diferencias entre los grupos HF y HFN, que si superan el consumo energético de los individuos alimentados con dieta control (Figura 15D).

Debido a que el alimento es un potente sincronizador de los ritmos circadianos hepáticos, se registró el patrón de consumo energético en ratones C57BL/6J alimentados *ad libitum* con dieta normocalórica y dieta rica en grasa cada 3 horas a lo largo de un ciclo circadiano, para determinar si la dieta hipercalórica induce algún tipo de remodelación en el patrón circadiano de consumo energético a tomar en cuenta. Ambos grupos mostraron ritmos diurnos en su ayuno y nocturnos en su ingesta comparables entre sí (Figura 15E). Al ZT 15 se encuentra el pico máximo de consumo de Kcal de los animales alimentados con dieta normocalórica, mientras que los individuos alimentados con HFD lo alargan hasta el ZT 21, obteniéndose así diferencias estadísticamente significativas en ese punto. El consumo energético total que se consume al día, es mayor en los individuos alimentados con HFD (figura 15E).

Durante el día los individuos suministrados con ambos esquemas de dieta, consumen una menor cantidad de alimento que durante la noche; sin embargo, se observan diferencias estadísticamente significativas que indican un mayor consumo energético por parte de los individuos alimentados con HFD tanto en el día como en la noche, lo que induce el aumento de peso observado en este modelo (Figura 15F).

8.4. La cronoterapia con NAD⁺ aumenta la tolerancia a la glucosa y disminuye la resistencia a la insulina en ratones obesos

Con el objetivo de evaluar el efecto de suministrar NAD⁺ al ZT 11 sobre la intolerancia a la glucosa asociada al consumo de dietas altas en grasa, los distintos grupos de animales, fueron valorados con la prueba de tolerancia a la glucosa (GTT) previamente, a los 10 días y al término de la cronoterapia (20 días) (Figura 19). El GTT fue realizado durante el periodo de ayuno (ZT 4) y alimentación (ZT 16), ya que las respuestas metabólicas ante la glucosa difieren dependiendo de las necesidades energéticas específicas que se presentan en cada uno de estos momentos del día [230].

Como se esperaba, previamente a la intervención farmacológica, los niveles de glucosa en los individuos control fueron menores con respecto a los individuos alimentados con dieta hipercalórica a los dos ZT evaluados (Figura 16A, 16B; Día1), mientras que no se reportaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de individuos obesos. Interesantemente, la tolerancia a la glucosa mejora significativamente tras 10 días de tratamiento con NAD⁺ al ZT 11 (Figura 16A, 16B; Día10).

Al final del tratamiento con NAD⁺ los regímenes de dieta específicos, los animales obesos tratados con NAD⁺ a ZT11 (HFN) mostraron una recuperación total de la tolerancia a la glucosa, mostrando perfiles comparables a los animales sanos (CD), y significativamente mejorados respecto de los animales obesos no tratados (HFN) (Figura 16A, 16B; Día 20). En este sentido observamos que el NAD⁺ aplicado al final del periodo diurno protege de la intolerancia a la glucosa provocada por el consumo de una dieta alta en grasa.

Con el objetivo de evaluar el efecto de suministrar NAD⁺ al ZT 11 sobre la resistencia a la insulina asociada al consumo de dietas altas en grasa, se aplicó la prueba de tolerancia a insulina (ITT) previo a la cronoterapia (Día 1), y a los 10 y 20 días de suministro con NAD⁺ en los grupos CD, HF y HFN, durante el periodo de ayuno y alimentación al ZT 4 y 16 (Figura 17A, 17B). De acuerdo con lo esperado, se observó gran diferencia entre los individuos alimentados con la dieta control y los alimentados con dieta obesogénica antes del periodo de suministro con NAD⁺, presentándose una respuesta a la insulina pobre por parte de los ratones alimentados con HFD (Figura 17A, 17B; Día 1).

Transcurridos 10 días de tratamiento con NAD⁺, se observó un decremento en la resistencia a la insulina en el grupo de animales que recibieron la cronoterapia, notándose un descenso

significativo de la concentración de glucosa sérica por debajo del grupo de animales obesos al que no se le otorgó tratamiento, (Figura 17A, 17B; Día10).

A los 20 días de aplicada la cronoterapia, no se presentaron diferencias en el ITT aplicado a ambos ZT 4 y ZT 16, como se observa en el AUC (Figura 17A, 17B; Día 20), entre el grupo control y el suministrado con NAD⁺, reportándose así, una sensibilización a la insulina por parte del grupo HFN al concluir el tratamiento, en contraste con la resistencia a la insulina que se observa en los individuos obesos del grupo HF (Figura 17).

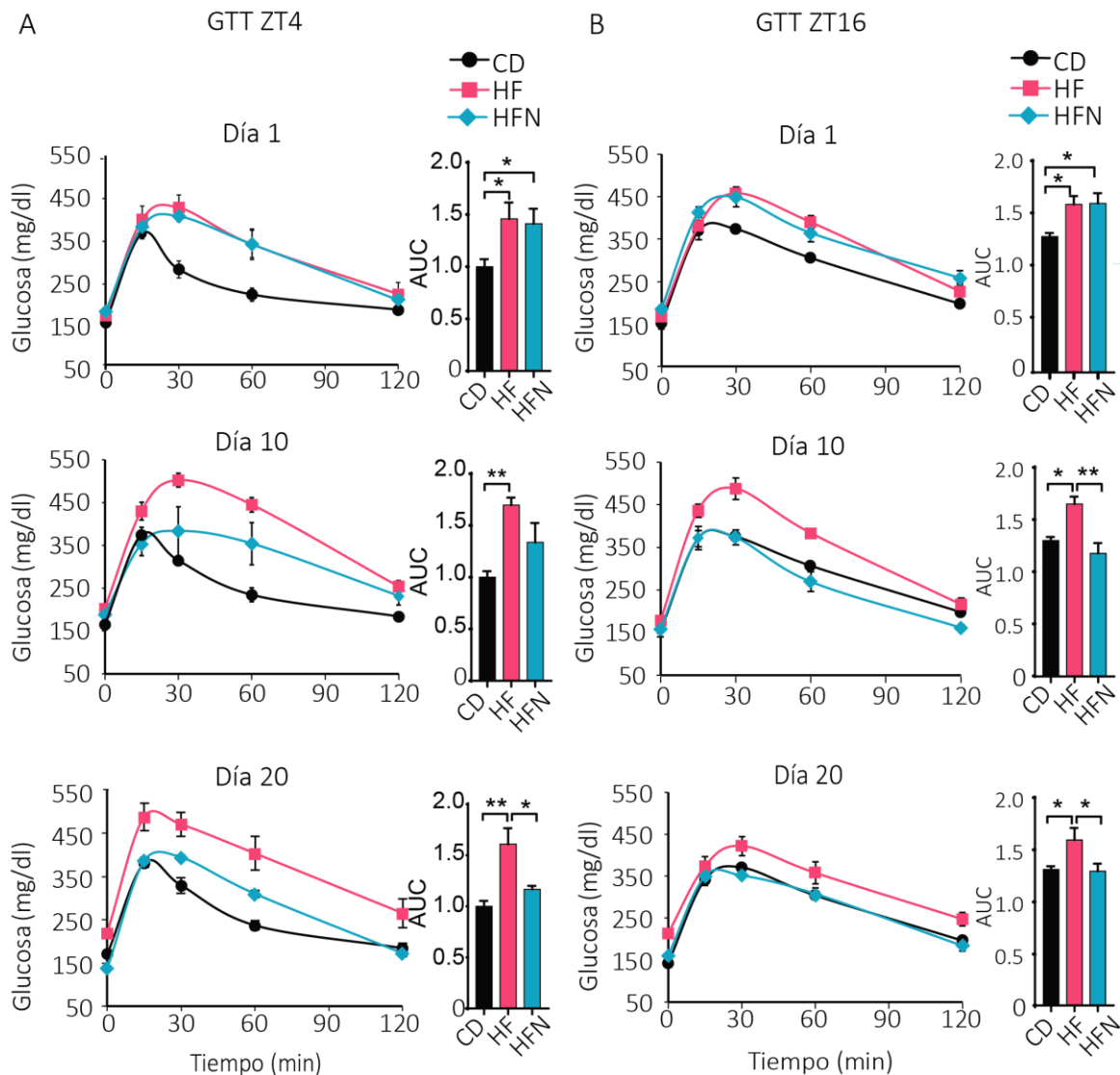


Figura 16. Pruebas de tolerancia a glucosa.

Se aplicó la prueba GTT en el ZT 4 y ZT 16 previo a la cronoterapia, y a los 10 y 20 días de su aplicación en el grupo HFN. Los datos representan el promedio +/- SEM (N = 5). El análisis estadístico corresponde a una ANOVA de dos vías con post hoc test de Tukey para comparaciones múltiples ($\alpha=0.05$). *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001. *. AUC: Área bajo la curva

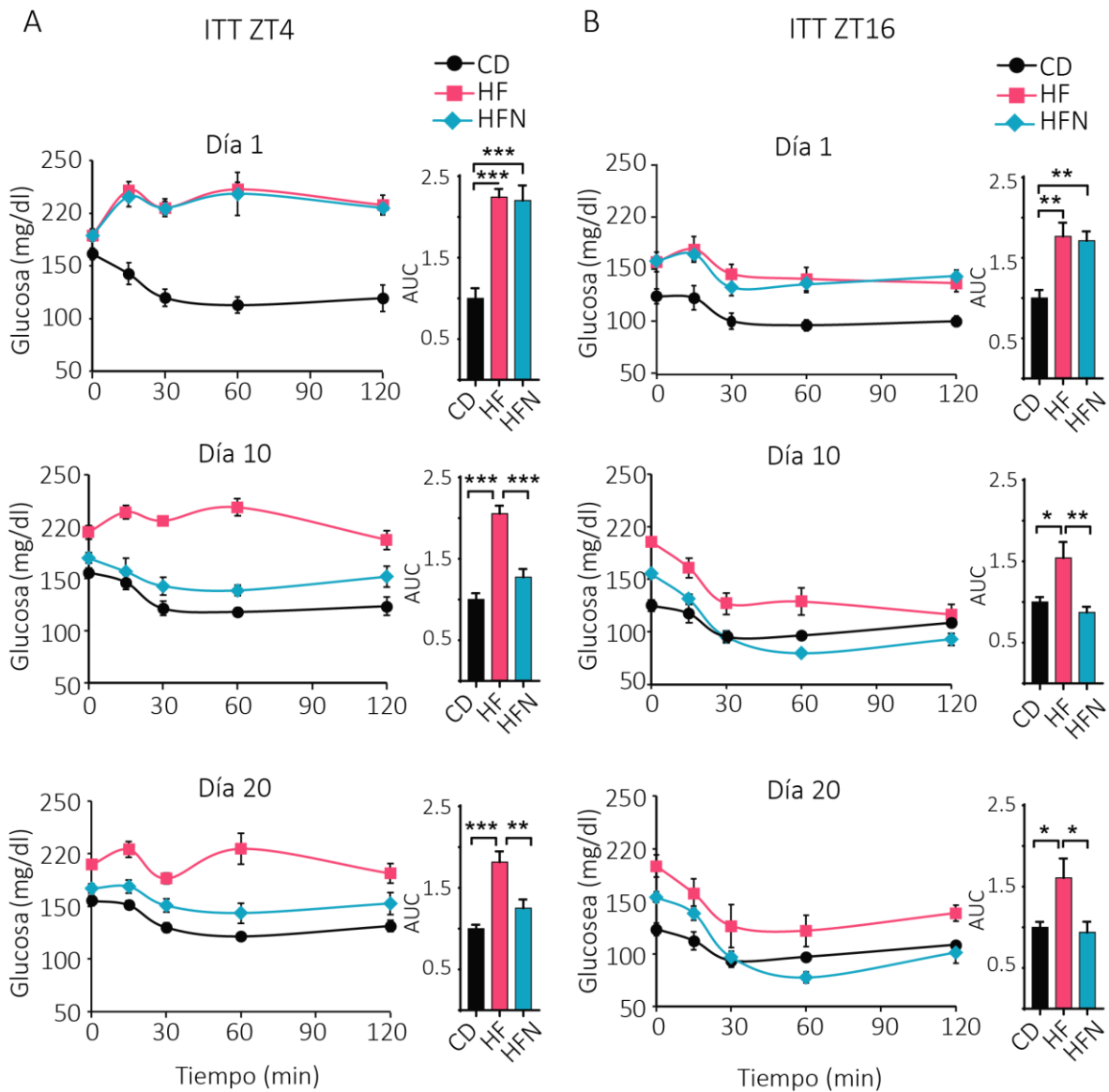


Figura 17. Prueba de resistencia a la insulina.

Se aplicó la prueba de resistencia a insulina en el ZT 4 y ZT 16, antes, durante y posterior a las tres semanas de suministro con 50 mg/Kg de peso de NAD⁺ al grupo HFN. Los datos representan el promedio +SEM (N = 5-6). El análisis estadístico corresponde a una ANOVA de dos vías con post hoc test de Tukey para comparaciones múltiples ($\alpha=0.05$). *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001. AUC:Área bajo la curva

8.5. El suministro de NAD⁺ al ZT 11 disminuye la concentración sérica de hormonas cuyo incremento predispone al desarrollo de síndrome metabólico

La hiperinsulinemia está asociada a la resistencia a la insulina (IR) que se presenta a consecuencia del consumo de una dieta hipercalórica, además es un signo que predispone a la DT2 y el síndrome metabólico, por lo que el registro de este factor de riesgo posterior al suministro de

NAD⁺ al ZT 11, es necesario para caracterizar los efectos de la restitución circadiana en la biodisponibilidad del NAD⁺ que, en experimentos anteriores, asociamos a una reducción de la IR.

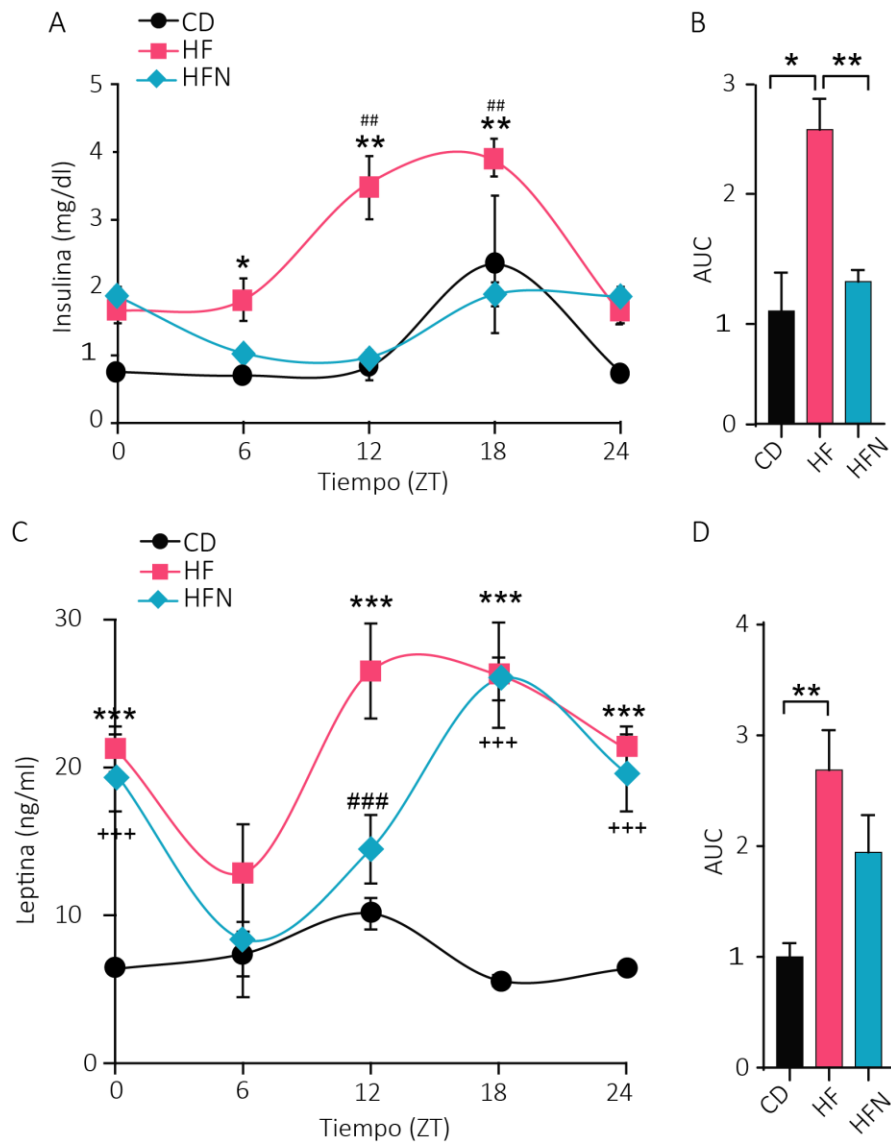


Figura 18. Concentración de insulina y leptina en suero.

(A) Concentración de insulina a lo largo del ciclo circadiano en animales con dieta control. (B) Área bajo la curva de las concentraciones de insulina. (C) Concentración de leptina a lo largo de un ciclo circadiano. (D) Área bajo la curva de las concentraciones de leptina. Los datos representan el promedio +SEM (N = 4). El análisis estadístico corresponde a una ANOVA de dos vías con post hoc test de Tukey para comparaciones múltiples ($\alpha=0.05$) en el caso de A y ANOVA de una vía con post hoc test de Tukey para comparaciones múltiples ($\alpha=0.05$) en el caso de B. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001. *diferencia estadística entre CD y HFN, * Diferencia estadística entre CD y HF, + diferencia estadística entre CD y HFN, # diferencia estadística entre HF y HFN. AUC: Área bajo la curva.

Se cuantificaron los niveles de insulina sérica de los grupos CD, HF y HFN a los ZT 0, 6, 12 y 18, determinándose una disminución estadísticamente significativa en la concentración de insulina al ZT 12 entre el grupo control y los individuos obesos que recibieron la cronoterapia, con respecto al grupo que no la recibió (Figura 18A), alcanzando este último, su máximo pico de concentración

de insulina al ZT 18. El perfil de concentraciones de insulina a lo largo del día no presenta diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y los animales a los que se les suministró NAD⁺ al ZT 11, determinándose concentraciones de insulina globales menores con respecto al grupo de individuos obesos sin cronoterapia (Figura 18B). Por tanto, se observó una clara disminución de la insulina circulante como producto del tratamiento con NAD⁺ aplicado al final del periodo diurno.

Debido a que los niveles de Leptina en suero también son indicadores de alteraciones metabólicas sufridas como consecuencia de la alimentación con una dieta rica en grasa, y además que esta hormona oscila de manera circadiana [231], se realizó la cuantificación de leptina circulante en todos los grupos a los ZT 0, 6, 12 y 18 (Figura 18C y 18D).

Se observó el comportamiento esperado de los individuos control, con un pico máximo en la concentración de leptina de ~10 ng/mL al ZT 12 (Figura 18C). Tanto los individuos obesos suministrados con NAD⁺ al ZT 11, como el grupo no tratado tuvieron niveles elevados de leptina con respecto al control, excepto en el ZT 6. Sin embargo, se observa un cambio de fase en el grupo HFN en donde se muestra una disminución estadísticamente significativa de los niveles de leptina al ZT 12 con respecto al grupo HF.

Al realizar el análisis del área bajo la curva (Figura 18D), no se determinaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos CD y HFN ($P = 0.09$). Sin embargo, sí se determinaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de animales obesos que no fueron suministrados con NAD⁺ al ZT 11 con respecto al grupo control

8.6. La acumulación de lípidos hepáticos disminuye como efecto de la cronoterapia al ZT 11

La acumulación de lípidos en el hígado es un signo de la alteración metabólica asociado a la obesidad [232]. Para evaluarla, se utilizó la tinción con rojo oleoso (ORO). El nivel de tinción con rojo oleoso en los individuos control fue menor con respecto a la encontrada en las secciones de hígado de los grupos HF y HFN (Figura 19A); sin embargo, se observó una reducción significativa de gotas lipídicas en los individuos suministrados con cronoterapia de NAD⁺ al ZT 11 en comparación con los que no la recibieron (Figura 19A, 19B).

Además, la longitud de las gotas lipídicas observadas en el grupo HFN son 4.5 veces más grandes que las detectadas en el hígado de los individuos control, sin que se reportaran diferencias

estadísticamente significativas. Sin embargo, las gotas cuantificadas en hígados de animales obesos sin tratamiento, mostraron diámetros 57.7 veces mayores a los reportados por el grupo CD, siendo también significativamente mayores a los de los ratones que recibieron cronoterapia con NAD⁺ (Figura 19C). En conjunto estos resultados indicaron que el suministro de NAD⁺ al ZT 11 en animales obesos, podría reducir el riesgo de desarrollar esteatosis hepática no alcohólica, incluso cuando los individuos siguen siendo alimentados con HFD.

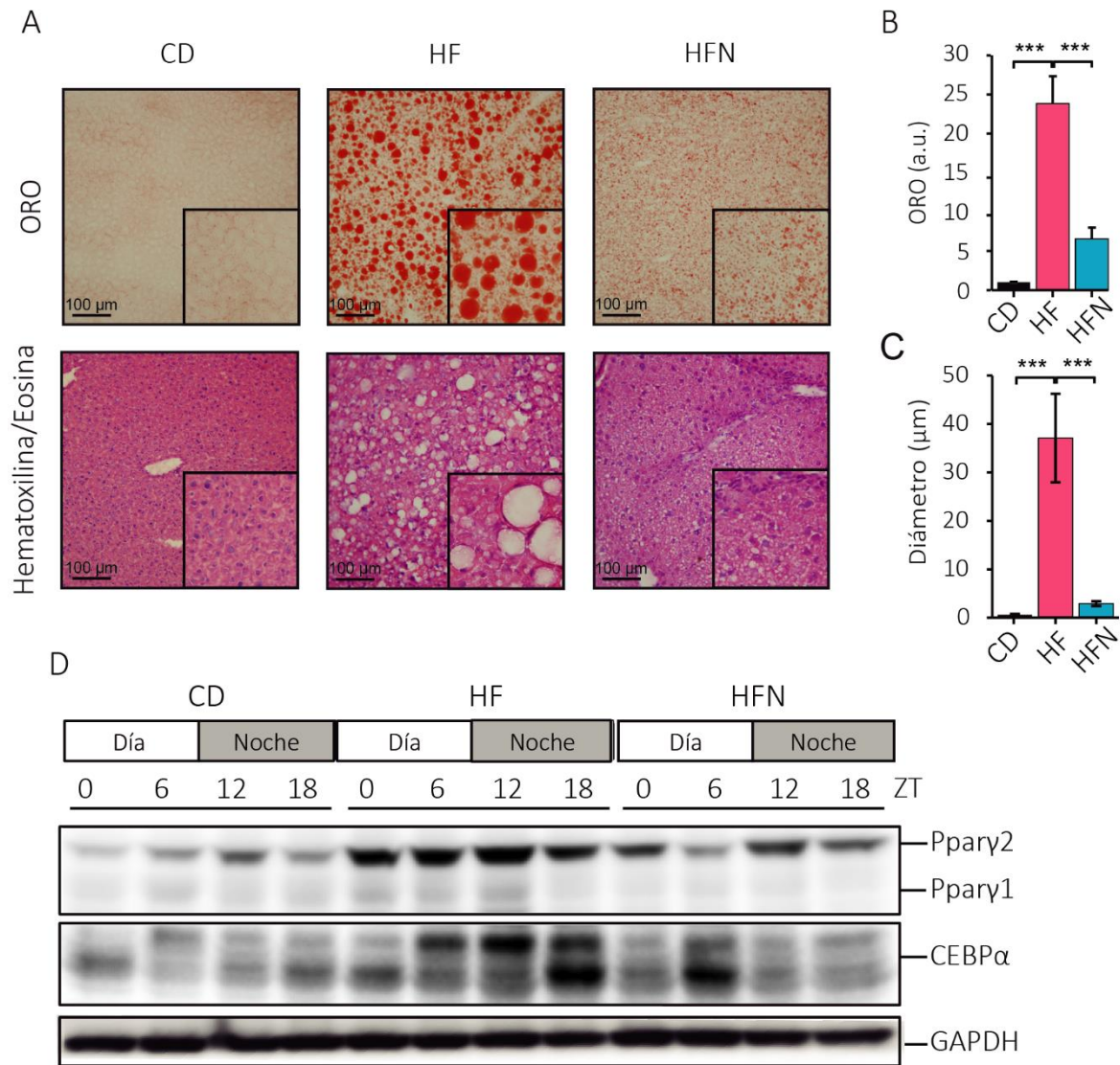


Figura 19. Cuantificación de lípidos neutros detectados con ORO y proteínas lipogénicas de hígado de ratones CD, HF, HFN.

(A) Tinción con ORO y Hematoxilina contra-teñida con Eosina. La escala de las barras es de 100 μm y el aumento es de 20x. Dentro de cada imagen se muestra una sección con el objetivo de 100x. (B) Cuantificación de la señal total de ORO (C). Cuantificación de la longitud máxima de las gotas lipídicas teñidas con ORO. a.u., unidades arbitrarias; normalizadas para la cuantificación obtenida para los datos control = 1. Las imágenes son representativas de 3 réplicas experimentales y 3 replicados técnicos. (D) Western Blot contra las proteínas Pparγ1, Pparγ2 y CEBPα. Se muestra la imagen representativa de 8 geles en los que se muestreó cada ZT con una N=4. El análisis estadístico corresponde a una ANOVA de dos vías con post hoc test de Tukey para comparaciones múltiples ($\alpha=0.05$), en el caso del histograma se presenta una ANOVA de una vía con post hoc test de Tukey para comparaciones múltiples ($\alpha=0.05$) *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001. * Diferencia estadística entre CD y HF, + diferencia estadística entre CD y HFN, # diferencia estadística entre HF y HFN. a.u.: unidades arbitrarias.

Debido a que el tratamiento con NAD⁺ aplicado al ZT 11 provocó una baja en la acumulación hepática de lípidos, resultó interesante evaluar los niveles proteicos de factores de transcripción reguladores del procesos de lipogénesis, como es el caso de PPAR γ y CEBP α , quienes tienen la capacidad de inducir mutuamente su expresión y cooperar de manera sinérgica en la activación de genes clave que promueven la síntesis de lípidos [233]. De manera relevante, se sabe que el aumento de estos TF está asociado al desarrollo de hígado graso no alcohólico [234, 235].

Existen dos isoformas de la proteína PPAR γ , la 1 y la 2; ambas fueron detectadas en nuestros extractos proteicos. En general la banda que corresponde a Ppar γ 1 fue difícil de observar en todos los tratamientos, sin embargo, Ppar γ 2 se encuentra sobre expresada en los individuos alimentados con una dieta rica en grasa (Figura 19D), con respecto a los controles y a los individuos que recibieron cronoterapia, en donde los niveles máximos de acumulación de la proteína se encontraron al ZT 12 al igual que en los individuos del grupo control.

El western blot (WB) contra CEBP α resultó en la detección de dos bandas correspondientes a dos isoformas (Figura 19D), las cuales se observaron con mayor intensidad en los individuos HF durante todos los ZT en comparación con los grupos control y HFN, llegando a un máximo de acumulación al ZT 18. Nuestras observaciones indican que el suministro con NAD⁺ redujo la expresión de PPAR γ y CEBP α a lo largo del ciclo circadiano, lo cual podría tener un impacto directo en la reducción de lípidos hepáticos observada en nuestros experimentos anteriores a través de la coordinación de respuestas transcripcionales.

8.6.1. El suministro de NAD⁺ al ZT 11 disminuye la concentración de triglicéridos en el hígado de ratones y reestablece su oscilación circadiana

La acumulación de triglicéridos en el hígado surge como resultado de una alimentación rica en grasa y predispone al desarrollo de esteatosis hepática no alcohólica. Debido a que observamos una reducción de lípidos, por medio de la tinción con ORO, a consecuencia del suministro con NAD⁺ al ZT 11, realizamos la cuantificación directa de triglicéridos en extractos de hígado provenientes de los grupos CD, HF y HFN a los ZT 0, 6, 12 y 18 (Figura 20).

Derivado de estas cuantificaciones, observamos cambios en la concentración de TG dependientes del ZT así como del tratamiento y el régimen de dieta (Figura 20A). De esta manera, los ratones alimentados con HFD poseen concentraciones de TG significativamente mayores a las del grupo alimentado con dieta normocalórica a lo largo del ciclo circadiano (Figura 20A). Sin embargo, al observar las concentraciones globales de TG en todos los individuos de cada grupo, se

evidenció una reducción en el contenido total de TG hepáticos en los ratones que recibieron el tratamiento con NAD⁺ al ZT 11 (\bar{x} = 47.3) con respecto a los animales obesos no tratados (\bar{x} = 54.6) (Figura 20B). Interesantemente, el ritmo circadiano de los TG que se observa en los animales control y se pierde como efecto de la dieta rica en grasa, fue recuperado tras la cronoterapia con NAD⁺ al ZT 11 (Figura 20C).

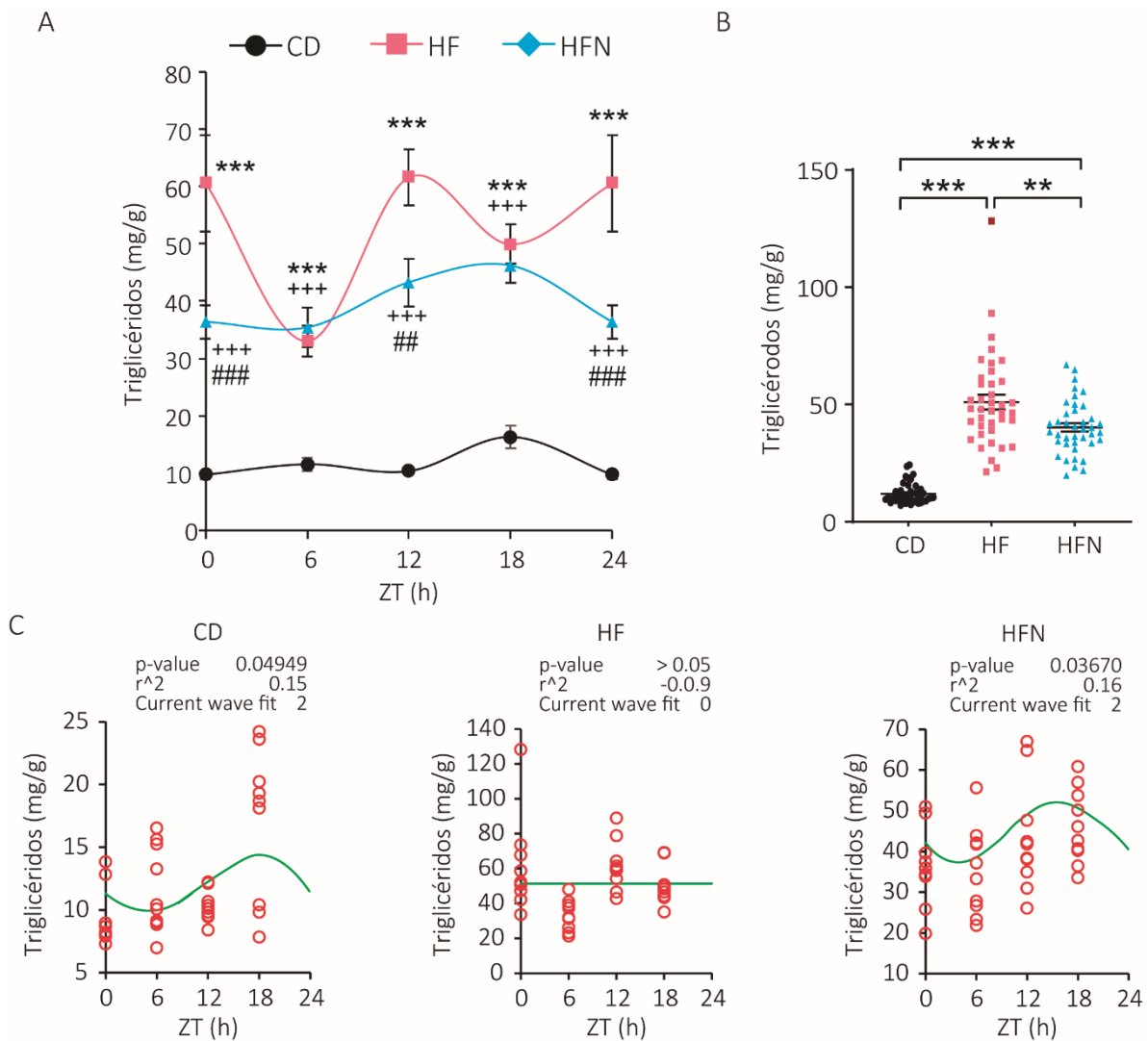


Figura 20. Los niveles de triglicéridos descienden y recuperan su oscilación circadiana tras el tratamiento con NAD⁺ al ZT 11.

(A) Perfil de concentraciones de triglicéridos hepáticos en los tres grupos de animales a lo largo del día. (B) Distribución global de los valores de TG de (A). (C) Determinación de la oscilación circadiana en la concentración de TG con el programa Circawave. Los datos representan el promedio \pm SEM (N = 9-10). El análisis estadístico corresponde a una ANOVA de dos vías con post hoc test de Tukey para comparaciones múltiples ($\alpha=0.05$) en el caso de A; ANOVA de una vía con post hoc test de Tukey para comparaciones múltiples ($\alpha=0.05$) en el caso de B. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001. y una prueba F en el caso de C* Diferencia estadística entre CD y HF, + diferencia estadística entre CD y HFN, # diferencia estadística entre HF y HFN.

8.7. La cronoterapia al ZT 11 reestablece marcadores de estrés desregulados por la esteatohepatitis

La aparición de grupos carbonilo en las proteínas (PCO) representa una de las modificaciones más frecuente e irreversibles inducida por estrés oxidante [236]. Su derivatización con 2,4-dinitrofenilhidrazina es un método de cuantificación indirecto para determinar el grado de estrés oxidante presente en hígado. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de PCO en los ZT analizados (0, 6, 12 y 18) entre el grupo control y los individuos alimentados con dieta hipercalórica a los que se les suministró NAD⁺ (Figura 21A). Sin embargo, se identificaron diferencias estadísticamente significativas en el ZT 0, entre el grupo control (CD) y los animales obesos a los que no se les otorgó tratamiento (HF); las cuales se presentan a los ZT 0 y 6 entre los grupos HFN y HF. En la determinación del AUC, observamos un decremento en la concentración de proteínas carboniladas en el grupo HFN, cuyo valor es comparable al observado en el grupo CD (Figura 21B), indicando que la cronoterapia con NAD⁺ al ZT 11 disminuye la concentración de PCO hepático, lo que podría conllevar a una reducción del estrés oxidante en los hepatocitos y con ello a la disminución del riesgo de generar patologías como hígado graso no alcohólico, al cual se le ha asociado de manera robusta con el aumento del estrés oxidante [237].

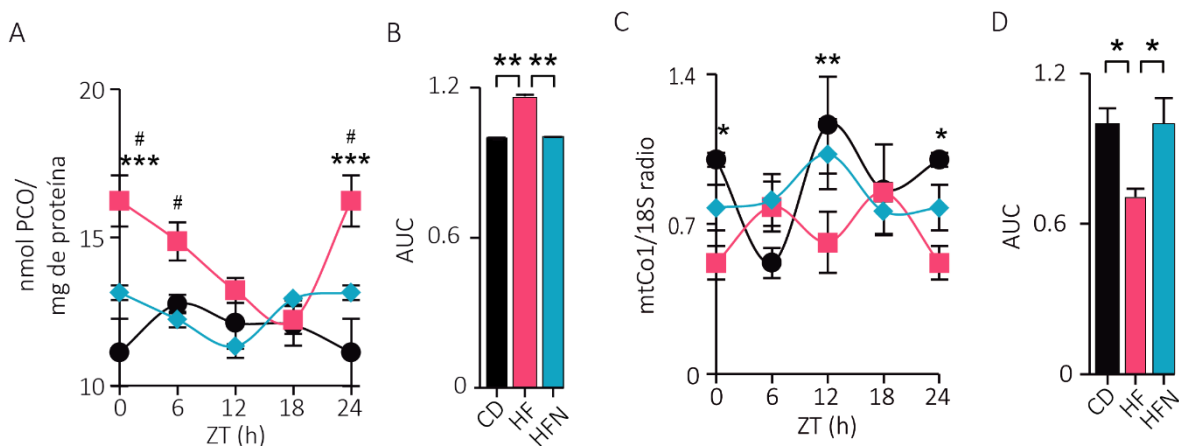


Figura 21. Concentración de PCO y mtDNA en tejido hepático

(A) Concentración de grupos carbonilo en proteínas a lo largo del ciclo circadiano. Los datos representan el promedio +SEM (N = 5) con dos replicados técnicos por tratamiento. (B) Área bajo la curva de concentraciones de PCO. (C) Cuantificación de mtDNA a los ZT 0, 6, 12 y 18. Los datos representan el promedio +SEM (N = 4). El análisis estadístico corresponde a una ANOVA de dos vías con post hoc test de Tukey para comparaciones múltiples ($\alpha=0.05$) en el caso de A y C y ANOVA de una vía con post hoc test de Tukey para comparaciones múltiples ($\alpha=0.05$) en el caso de B y D. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001. * Diferencia estadística entre CD y HF, + diferencia estadística entre CD y HFN, # diferencia estadística entre HF y HFN.

La disminución en el número de mitocondrias ha sido asociada con diversas enfermedades metabólicas como el cáncer y la diabetes tipo II [238], por lo que resulta importante para este proyecto su cuantificación relativa, obtenida a partir de la relación mtDNA/nDNA hepático (Figura 21C y 21D). Se observó que a ZT12, existen más mitocondrias en los hígados de ratones sanos (CD) que en los obesos no tratados (HF), pero comparables a los datos obtenidos para ratones obesos tratados con NAD⁺ (HFN) (Figura 21C). En la determinación del área bajo la curva (Figura 21D) diferencias estadísticamente significativas se obtuvieron entre el grupo de individuos obesos no tratados (HF), con respecto al grupo control y a los individuos a los que se les suministró NAD⁺ al ZT 11 (HFN) haciendo evidente que la cantidad de mitocondrias se restituyó parcialmente con el tratamiento a niveles comparables a los del control.

8.8. La cronoterapia con NAD⁺ reprograma el transcriptoma hepático

En la caracterización fisiológica que realizamos para determinar los efectos de suministrar NAD⁺ al ZT 11 en un contexto de obesidad, observamos cambios en el metabolismo de glucosa, insulina, en la acumulación de lípidos séricos y hepáticos, así como en el comportamiento de las hormonas leptina e insulina a lo largo del ciclo circadiano, e incluso en la biogénesis mitocondrial. Lo que es más importante, la dinámica de expresión de factores de transcripción maestros también se vio muy alterada. Esto podría ser indicativo de una amplia reprogramación transcripcional, por ello procedimos a analizar el transcriptoma hepático.

8.8.1 La cronoterapia con NAD⁺ al ZT 11 no altera la dinámica de expresión de los genes que codifican al reloj circadiano.

Se evaluó la expresión de los genes que presentaran cambios de expresión dependientes del ZT. Realizamos una selección de los datos provenientes de los microarreglos mediante dos valores de astringencia: 1) El cambio en la expresión de los genes entre el ZT 6 y 18 debía ser significativo ($P < 0.05$); y 2) debía observarse un *fold change* > 1.3 . En base a estos conjuntos de datos, se elaboró un diagrama de Venn (Figura 22A) en el que podemos observar: genes que oscilan dependientes de la condición de estudio (CD 322 genes, HF 1327 genes y HFN 306 genes), genes que oscilan en dos condiciones (CD/HF 95 genes, CD/HFN 31 genes, ó HF/HFN 186 genes) y genes que oscilan en las tres condiciones de estudio (76 genes) (Figura 22A, 22B). Nótese también que una en las condiciones CD y HFN aproximadamente el 12% de los transcritos se expresan diferencialmente entre los ZT estudiados, mientras que esta proporción es mayor para el grupo HF (Figura 22B), lo que podría indicar que los ratones obesos suministrados con NAD⁺ pierden las oscilaciones *de novo*,

que se sabe aparecen en la transcripción de ciertos genes como consecuencia del consumo de una dieta alta en grasa [111].

Aunado al análisis anterior, se realizó el agrupamiento jerárquico con los 76 genes que se expresan diferencialmente entre el día y la noche en todos los grupos estudiados (Figura. 28C), en el que se observaron dos clústeres principales. El clúster 1 posee genes expresados preferentemente durante el día, mientras que el clúster 2, agrupa a genes expresados durante el periodo nocturno. Interesantemente, algunos de los genes que controlan la maquinaria del reloj molecular, como *Clock*, *Arntl*, *Cry1*, *Per3*, *Nr1d2* y *Rorc* tuvieron una expresión diferencial entre el ZT 6 y 18 que esta conservada en nuestros tres grupos de estudio (Figura 22C y 22D), lo que indica que la transcripción diferencial entre el día y la noche de los genes que controlan el reloj moelcular, no se ve alterado con el suministro de NAD⁺ al ZT 11. El resto de transcritos fueron principalmente relacionados con procesos metabólicos, según un análisis funcional elaborado con los 76 genes dispuestos en el análisis de agrupamiento jerárquico (Figura 22D).

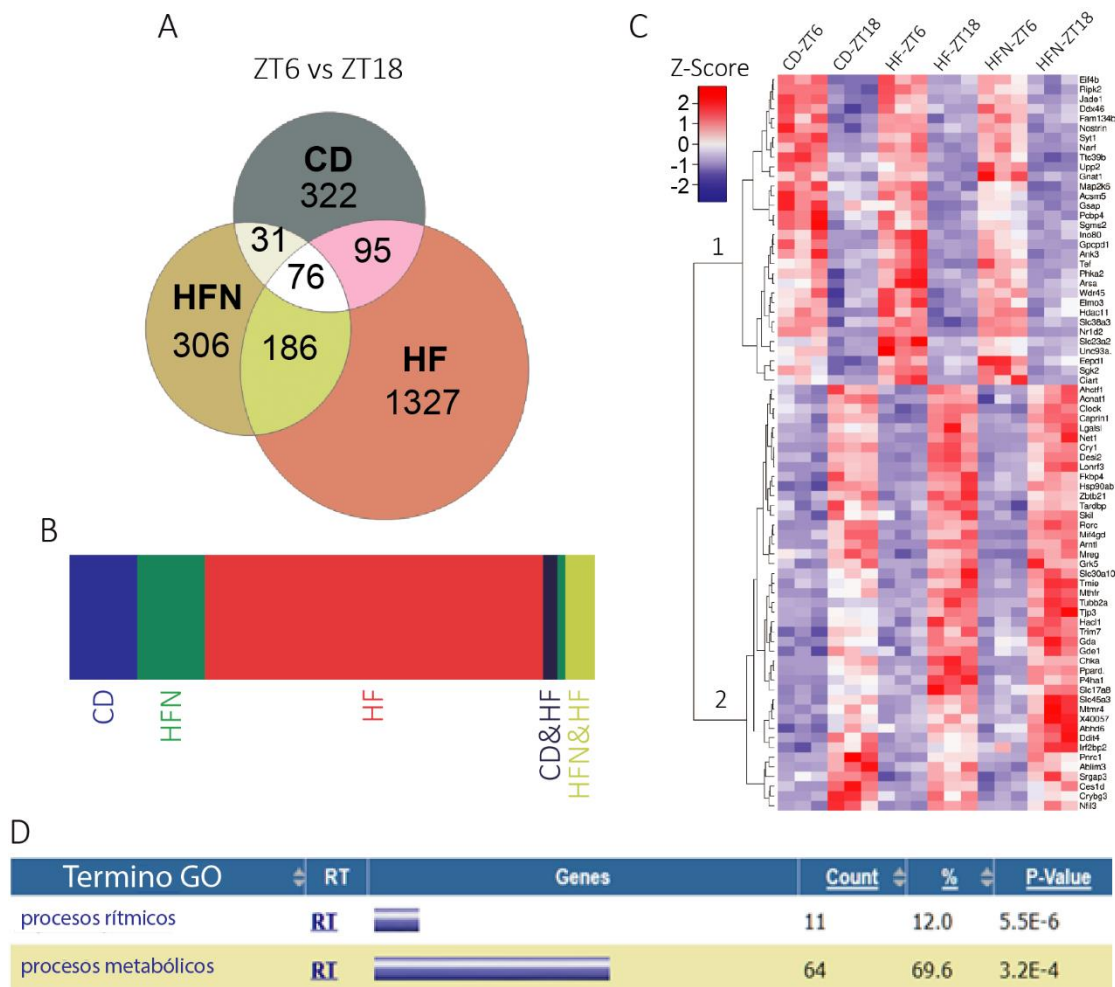


Figura 22. Genes diferencialmente expresados entre el ZT 6 y 18.

(A) Diagrama de Venn construido con los genes diferencialmente expresados entre el ZT 6 y 18 en los grupos CD, HF y HFN, en el que se representan los genes que oscilan en más de una condición, así como los que oscilan en condiciones únicas. (B) Gráfica de caja construida con los genes diferencialmente expresados en todas las condiciones. (C) Mapa de calor en el que se detectan dos clústeres principales, agrupados dependiente de la expresión diurna o nocturna de los genes. (D) Procesos moleculares en los que participan los 76 genes diferencialmente expresados en todas las condiciones. El análisis de *Gen Ontology* fue realizado en el servidor DAVID.

8.8.2. La dinámica de acumulación de las proteínas del reloj no se altera cuando se suministra NAD⁺ al ZT 11.

Para estudiar la dinámica de las proteínas codificadas por los genes del reloj comunes para todos los grupos que detectamos diferencialmente expresados (DE) entre el día y la noche, se analizaron por medio de WB a BMAL1, CRY1, PER2 y REV-ERB α .

El anticuerpo utilizado para detectar la proteína BMAL1 reconoce la forma fosforilada (P-BMAL1) y total de BMAL1, que se relacionan con la actividad de la proteína (Figura 23A). En los individuos control, se presentó una mayor acumulación de la forma desfosforilada de la proteína al inicio del periodo diurno y una acumulación de P-BMAL1 conforme avanzó el día hasta llegar a su acumulación máxima durante el ZT 12 (Figura 23A). Posteriormente se detectó una transición a la forma desfosforilada en el ZT 18 que dirigió a su enriquecimiento en el ZT 0. Se observó el mismo patrón en los grupos de individuos alimentados con dieta alta en grasa (HF y HFN). Interesantemente no observamos un efecto en esta dinámica como consecuencia del suministro con NAD⁺, ya que los perfiles de los grupos HF y HFN mostraron el mismo patrón. (Figura 23B).

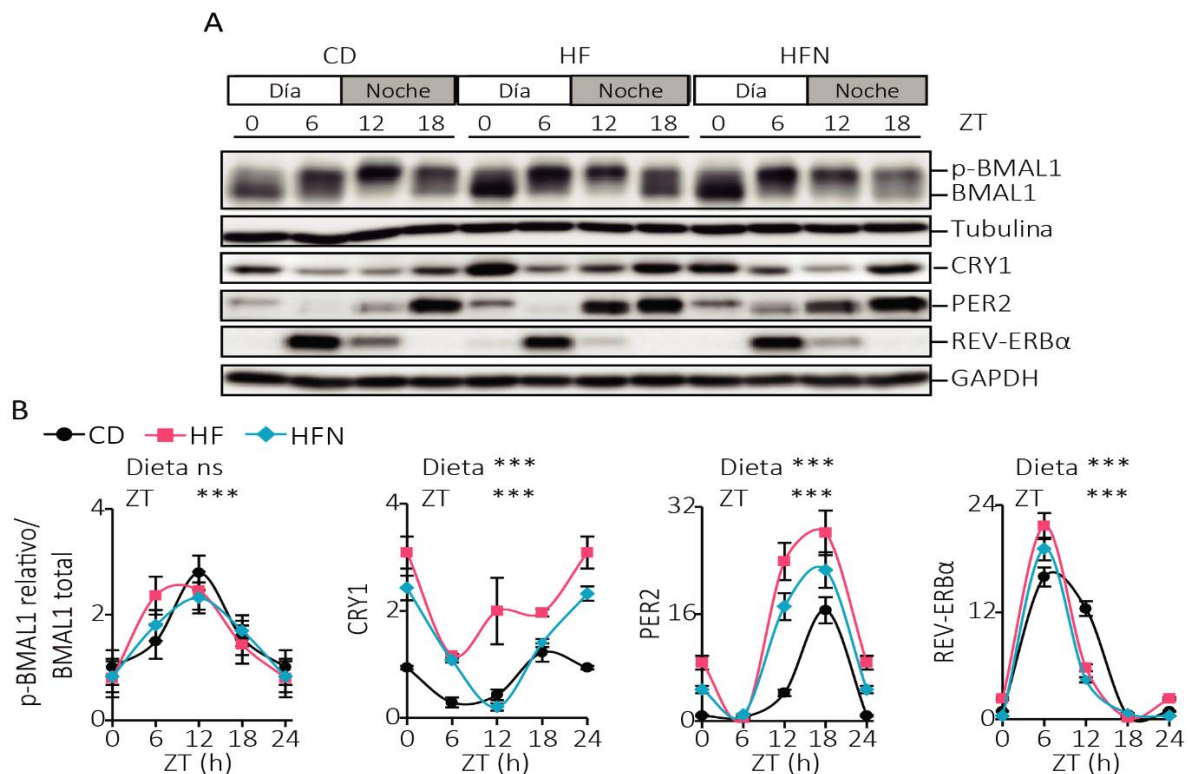


Figura 23. La dinámica de las proteínas del reloj no se ve globalmente alterada por el suministro con NAD⁺ al ZT 11.

(A) Detección de la forma fosforilada y desfosforilada de BMAL1 por WB y de las proteínas totales CRY1, PER2 y REV-ERB α . (B) Cuantificación por densitometría. Las muestras de cada panel fueron corridas en el mismo gel, junto con el control de carga correspondiente, colocado en la parte inferior. Se muestra la imagen representativa de 4 geles en los que se muestreó cada ZT con una N=4. Los datos representan el promedio \pm SEM (N = 4). El análisis estadístico corresponde a una ANOVA de dos vías con post hoc test de Tukey para comparaciones múltiples ($\alpha=0.05$. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001. * Diferencia estadística entre CD y HF, + diferencia estadística entre CD y HFN, # diferencia estadística entre HF y HFN. Ver también Apéndice E.

En el grupo control, la proteína CRY1 presentó sus acrofase al ZT 18, mientras que en los individuos obesos presentaron una mayor acumulación de esta proteína a los ZT 0 y 18 (Figura 23A y 23B). Interesantemente, a ZT12 los niveles de CRY disminuyeron significativamente en el grupo HFN respecto del HF.

En todos los grupos, la máxima acumulación de la señal de PER2 fue detectada al ZT 18, mientras que sus niveles mínimos se observaron al ZT 6 (Figura 23A y 23B).

Por otro lado, la proteína REV-ERB α mostró su acrofase al ZT 6 en todos los grupos (Figura 23A y 23B).

En conjunto, estos análisis indican que el tratamiento con NAD⁺ aplicado al ZT 11 conserva la dinámica de acumulación de las proteínas del reloj.

8.8.3. La expresión diferencial de transcritos entre el ZT 6 y 18 está sujeta a reprogramación dependiente de la dieta y el suministro de NAD⁺

La dieta alta en grasa provoca una reorganización del transcriptoma circadiano, que está asociada al desbalance metabólico observado en condiciones de obesidad [111]. Con el objetivo de evaluar la reorganización de los genes DE entre el ZT 6 y 18, se identificaron los genes exclusivos de cada condición. De este modo se detectaron 524 genes DE entre el ZT 6 y 18 exclusivamente en el grupo control, 1984 genes DE exclusivos del grupo HF, de los cuales la mayor parte están expresados durante el día, e interesantemente, 599 transcritos se encontraron DE ente el día y la noche solamente en el grupo HFN, mayormente expresados durante el periodo nocturno (Figura 24A).

El análisis funcional realizado en los tres grupos de genes diferencialmente expresados exclusivos de cada condición reveló que muchos de estos genes participaron en procesos biológicos compartidos necesarios para el mantenimiento de la homeostasis celular, como el transporte intracelular, procesos metabólicos y la respuesta al oxígeno (Figura 24B).

Los genes implicados en el metabolismo de los lípidos en ratones alimentados con HFD tratados o no con NAD⁺ mostraron un alto grado de expresión diferencial entre el día y la noche, asociado probablemente a los ciclos de ayuno y alimentación con dieta rica en grasa (Figura 24C, Lipid Metabolic Process). Interesantemente, un conjunto de genes relacionados funcionalmente con los procesos del sistema inmunológico apareció significativamente enriquecido entre los genes

DE entre el día y la noche exclusivamente en el grupo HF, el cuál no fue detectado en el grupo HFN (Figura 24C). Por otro lado, el suministro cronoterapéutico de NAD⁺ al ZT 11 impuso fluctuaciones transcripcionales nuevas y específicas de día a noche en genes relacionados funcionalmente con la respuesta al estrés y el ayuno (Figura 24C; Regulation of Response to Stress, Response to Starvation). Tomando en cuenta estos resultados, podemos deducir que una respuesta transcripcional específica desencadenada por la restitución circadiana en la biodisponibilidad del NAD⁺ pudo haber configurado ciertos programas de expresión génica que podrían ser responsable de los efectos beneficiosos observados en la fisiología del grupo HFN.

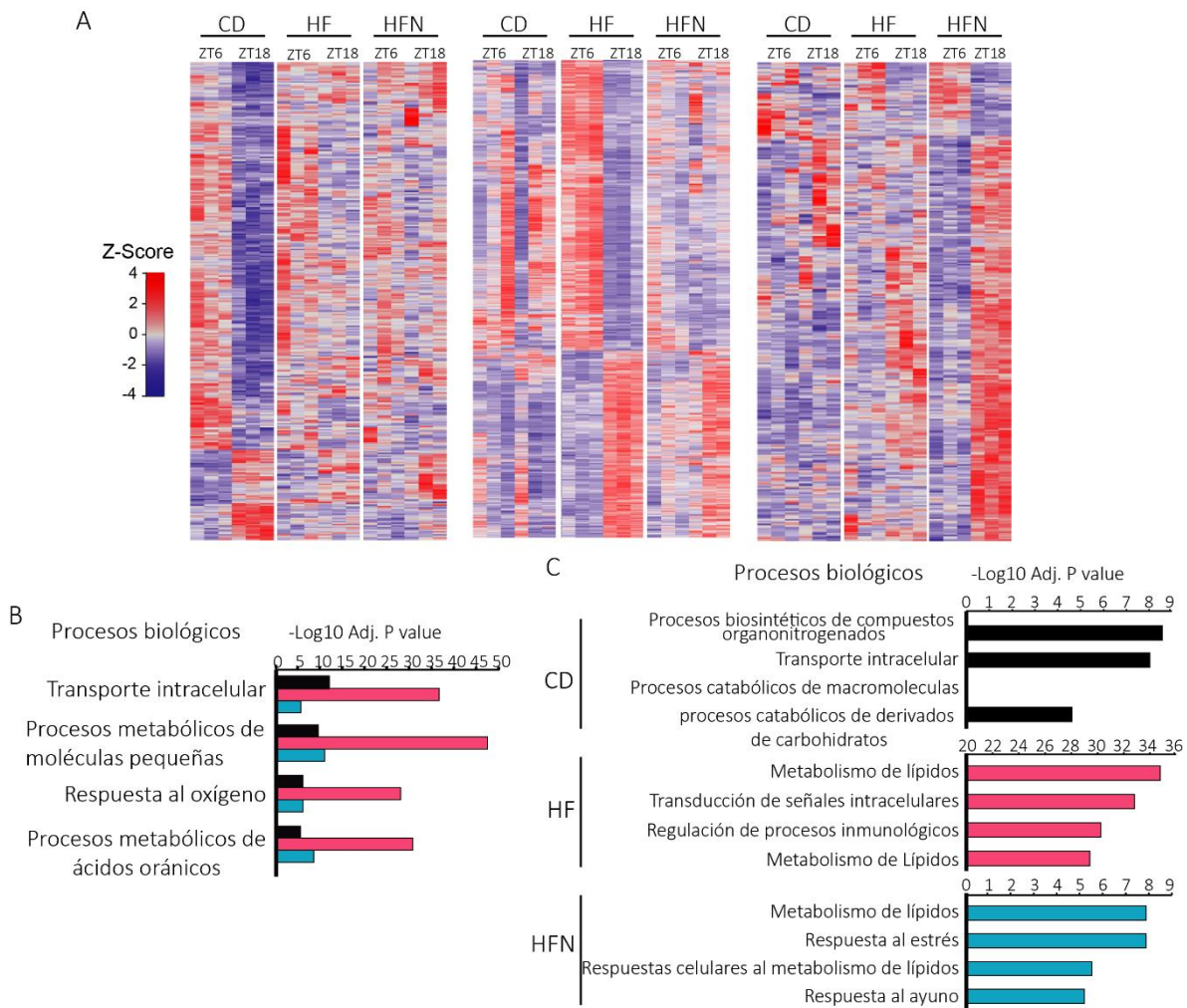


Figura 24. Transcriptoma y análisis funcional de los genes diferencialmente expresados durante el día y la noche.

(A) Análisis de agrupamiento jerárquico de clústeres construidos con los genes que potencialmente oscilan en el control y en los grupos alimentados con dieta alta en grasa sin y con suministro de NAD⁺ al ZT 11 . (B) Análisis funcional de los genes diferencialmente expresados en las tres condiciones. (C) Análisis funcional de los genes exclusivamente diferenciados en cada condición. Los análisis funcionales fueron realizados con la paquetería HOMER.

8.9. La cronoterapia con NAD⁺ al ZT 11 promueve rutas metabólicas que protegen en contra de la fisiopatología inducida por una dieta rica en grasa

Con el objetivo de identificar los genes expresados diferencialmente que nos ayudaran a explicar los distintos fenotipos metabólicos en los tres grupos de estudio, primero , se seleccionaron genes que cumplían los criterios: 1) El gen estaba expresado diferencialmente en el grupo HF en al menos un 10% (fold change > 1.1) y 2) esta diferencia fue estadísticamente significativa según una prueba t de Student (P < 0.05). Así, quisimos identificar los genes que se expresaron diferencialmente (DE) durante el periodo diurno (ZT 6) y nocturno (ZT 18) como consecuencia del consumo de una dieta alta en grasa únicamente en animales no tratados.

8.9.1. La cronoterapia con NAD⁺ al ZT 11 corrige la expresión anormal de genes y rutas metabólicas clave en enfermedades hepáticas relacionadas a la obesidad

Como se muestra en el diagrama de Venn (Figura 25A), a ZT6 existen 182 genes DE en el grupo HF con respecto a los grupos CD y HFN. Se observó que la mayor parte de estos 182 genes están sobre expresados (Figura 25B). Interesantemente, los animales obesos a los que se le suministró NAD⁺ al ZT 11 (HFN) restituyen los niveles de expresión de estos genes a niveles comparables con el grupo control (CD) en el hígado.

Debido a que los mensajeros DE únicamente en los animales alimentados con dieta rica en grasa podían arrojar información sobre las redes génicas que mantienen el fenotipo de disfunción metabólica, estos 182 genes fueron utilizados para realizar un análisis funcional utilizando HOMER (Figura 25C). Este análisis funcional arrojó un conjunto de términos GO relacionados con la regulación positiva del sistema inmunológico (activación del complejo mayor de histocompatibilidad de la clase II); procesos biológicos relacionados con el metabolismo incluyendo la activación de genes relacionados con diabetes mellitus y el almacenamiento de lípidos; y en su mayoría, términos que refieren a rutas de señalización como las de mTOR y NF-kappaB, que convergen con otras vías también reportadas en éste análisis, como la ruta de señalización de TLR, ERK 1/2, VEGFA, AKT, la vía de señalización de las MAPK y la proteína cinasa D (PKD) y cuya regulación se restituye en los individuos tratados con el suministro de NAD⁺ a ZT11 (Figura 25C).

Se realizó un análisis comparativo siguiendo la misma estrategia descrita para el ZT 6, con los resultados de los micro arreglos a ZT 18. En este caso, se encontraron 118 genes DE en los animales alimentados con una dieta rica en grasa (HF), con respecto a los grupos CD y HFN (Figura 25D). Mediante el método de agrupamiento jerárquico se observaron tres grupos principales de

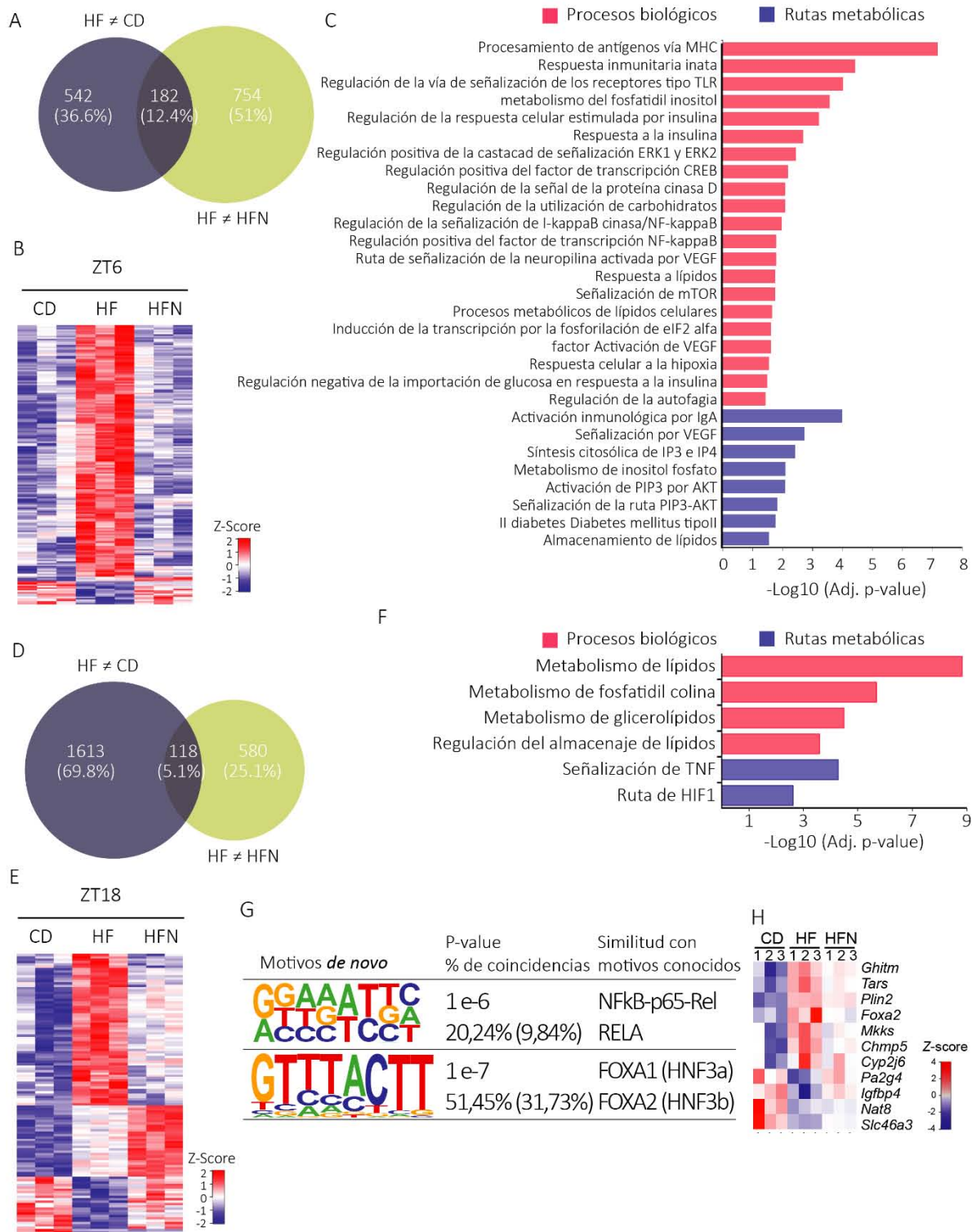


Figura 25. Programas transcripcionales restituidos a consecuencia de la cronoterapia al ZT 11

(A) El diagrama de Venn muestra el subconjunto de genes diferencialmente expresados en el grupo HF con respecto a los grupos CD y HFN al ZT 6. (B) Heatmap construido en base a genes del grupo HF con un F.C de 1.1 y $P < 0.05$ con respecto a los grupos CD y HFN al ZT 6, (C). Términos GO con un P-value < 0.05 que fueron determinados como resultado de la búsqueda utilizando los genes sobre expresados en la HF al ZT 6. (D) El diagrama de Venn muestra el subconjunto de genes diferencialmente expresados en el grupo HF con respecto a los grupos CD y HFN al ZT 18. (E) Heatmap construido en base a genes del grupo HF con un F.C de 1.1 y $P < 0.05$ con respecto a los grupos CD y HFN al ZT 18, (F) Términos GO con un P-value < 0.05 que fueron determinados como resultado de la búsqueda utilizando los genes sobre expresados en la HF al ZT 18. (G) Búsqueda *de novo* de motivos sobrerregulados en el grupo HF que fueron restituidos como

producto de la cronoterapia con NAD⁺. (H) Mapa de calor compuesto por genes regulados por FOXA2 y subregulados en los individuos tratados con NAD⁺ al ZT 11. El análisis de *Gen Ontology* y la búsqueda de motivos se realizó en HOMER.

genes: El primer grupo está conformado por genes sobreexpresados en los individuos HF con respecto a los grupos CD y HFN (Figura 25E, parte superior del *heatmap*). En el segundo grupo se situaron los genes que tuvieron un nivel bajo de expresión en el grupo control, se sobreexpresan en el grupo HF y aumentan su expresión todavía más en el grupo suministrado con cronoterapia (Figura 25E, parte intermedia del *heatmap*). Finalmente, en un tercer grupo se observaron genes que mostraron menor expresión en los animales obesos no tratados, con respecto a los tratados con NAD⁺ a ZT11 y al grupo control (Figura 25E, parte inferior del *heatmap*). Interesantemente, los genes DE al ZT 18 en el grupo HF que participan en procesos biológicos relacionados con el almacenamiento de lípidos (Figura 25F, *Lipid metabolic process*) y las rutas metabólicas que controlan procesos inflamatorios (Figura 25F, *TNF signaling*), se restauran tras la restitución farmacológica de los niveles de NAD⁺ hepáticos, sugiriendo que este tratamiento protege al hígado de estos efectos adversos provocados por el consumo de una dieta hipercalórica.

Para dilucidar los factores de transcripción responsables de la reprogramación metabólica sufrida a consecuencia del consumo de una dieta alta en grasa, cuyo efecto se corrigió tras el suministro cronoterapéutico de NAD⁺, se realizó el descubrimiento de motivos *de novo* en los promotores de genes diferencialmente expresados en el grupo HF, cuya expresión se restableció después de recuperar las oscilaciones de NAD⁺. Este grupo de genes reportó secuencias, posicionadas río arriba del sitio de inicio de la transcripción, con fuertes similitudes a los sitios de unión de NFkB-p65 / RELA y FOXA1 / FOXA2 (HNF α / HNF3 β) (Figura 25G). Cabe resaltar que 11 (13%) de los 83 transcritos restituidos al ZT 18 con el suministro de NAD⁺ al ZT 11, a niveles equivalentes a los que se observan en ratones alimentados con dieta normocalórica, son blancos previamente reportados de FOXA2 [239] (Figura 25H). Interesantemente, FOXA2 es un regulador clave del metabolismo de los lípidos que se desregula en el hígado de ratones expuestos a dietas altas en grasa que desarrollan diabetes y resistencia a la insulina [240].

8.9.2. La cronoterapia con NAD⁺ al ZT 11 induce la expresión de programas transcripcionales que protegen de enfermedades relacionadas al síndrome metabólico

Por medio del análisis de los transcritos DE al ZT 6 en los animales alimentados con dieta rica en grasa que fueron tratados con cronoterapia con respecto a los grupos control y los animales alimentados con dieta rica en grasa a los que no se les aplicó NAD⁺; se identificaron 862 transcritos

DE en el grupo HFN con respecto a los individuos obesos (HFN \neq HF) (Figura 26A). Por otro lado, 490 transcritos se identificaron DE entre los grupos HFN y control (HFN \neq CD). Tan solo 74 genes se encontraron compartidos entre ambos grupos (Figura 26A, 26B). En el ZT 6, observamos un grupo de genes que tienen una expresión basal con respecto a los grupos HF y CD (Figura 26B, parte superior del *hetmap*), alrededor de un 60% de genes se sobre expresó en el grupo de animales tratados con NAD⁺ con respecto a los otros dos grupos (Figura 26B, parte superior del *hetmap*), mientras que el resto se silenciaron en respuesta al tratamiento (Figura 26B, parte inferior del *hetmap*).

Un análisis funcional con estos 74 genes identificó enriquecimiento en procesos biológicos que controlan el metabolismo energético (Figura 26C), incluyendo la beta oxidación de ácidos grasos, biosíntesis de colesterol, metabolismo de la Acetil CoA y el ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Por otro lado, se identificaron vías que se encargan del transporte de ácidos grasos de cadena larga y su llegada hacia los peroxisomas. De forma interesante, rutas metabólicas que tienen que ver con la biogénesis mitocondrial como la ruta de señalización de los factores de transcripción tipo PPAR, se encontraron desreguladas en los individuos HFN y en este mismo sentido, también se detectaron rutas que tienen que ver específicamente con la expresión de genes mitocondriales (Figura 26C).

Con respecto a la reorganización de membranas, se hallaron términos que se refieren a elementos de regulación en la distribución de lípidos membranales, a la invaginación de las mismas y a la reorganización del retículo endoplásmico. Finalmente, algunos de los genes sobre expresados como consecuencia del tratamiento con NAD⁺ aparecieron implicados en la regulación negativa del sistema inmunológico y de señales que conducen a la apoptosis (Figura 26C).

Al ZT 18 se determinó que un total de 196 transcritos se encontraban DE en el grupo que recibió cronoterapia (HFN) con respecto a ambos, el grupo control (CD) y el obeso (HF) (Figura 26D). De estos 196 transcritos, la mayor parte estuvieron sobreexpresados, mientras que un grupo menor de genes disminuyeron su expresión en el grupo HFN respecto del grupo HF, sin alcanzar los bajos niveles del grupo CD. Finalmente, unos pocos genes se observaron significativamente menos expresados en el grupo HFN con respecto a los grupos CD y HF (Figura 26E).

El análisis funcional con los 196 genes DE, identificó un enriquecimiento en procesos biológicos relacionados con el transporte de electrones en la mitocondria, procesos en los que participa el NAD⁺, catabolismo de lípidos y regulación negativa de la respuesta inmune (Figura 26F). Por otro lado, las rutas metabólicas enriquecidas hacen referencia a la regulación negativa de procesos apoptóticos y a la respuesta inmunitaria mediada por el interferón de tipo 1.

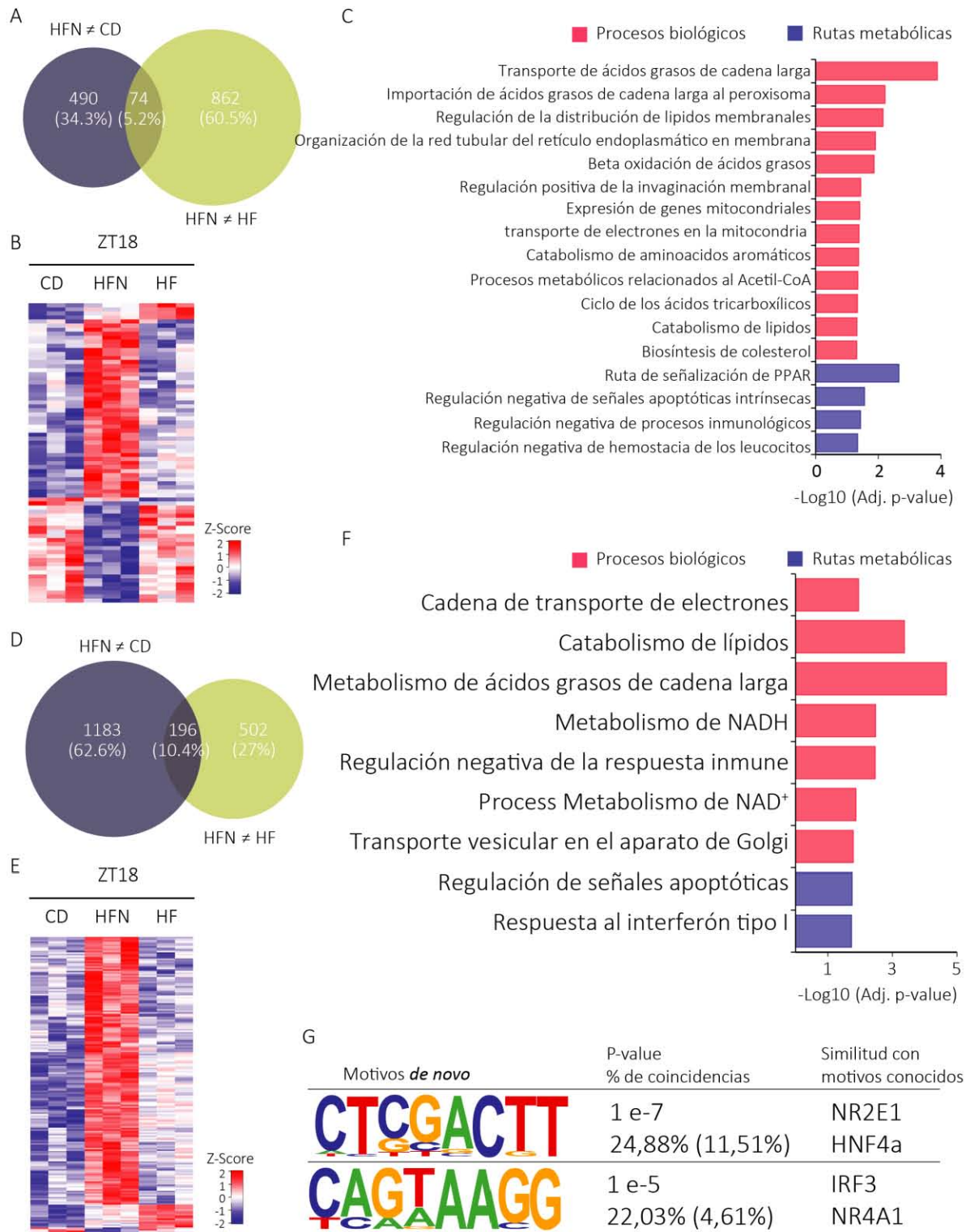


Figura 26. Programas transcripcionales expresados diferencialmente a consecuencia de la cronoterapia al ZT 11

(A) El diagrama de Venn muestra el subconjunto de genes diferencialmente expresados en el grupo HFN con respecto a los grupos CD y HF al ZT 6. (B) Heatmap construido en base a genes del grupo HFN con un F.C de 1.1 y $P < 0.05$ con respecto a los grupos CD y HF al ZT 6, (C). Términos GO con un P-value < 0.05 que fueron determinados como resultado de la búsqueda utilizando los genes DE a consecuencia de la cronoterapia con NAD⁺ al ZT 6. (D) El diagrama de Venn muestra el subconjunto de genes diferencialmente expresados en el grupo HFN con respecto a los grupos CD y HF al ZT 18. (E) Heatmap construido en base a genes del grupo HFN con un F.C de 1.1 y $P < 0.05$ con

respecto a los grupos CD y HF al ZT 18, (F) Términos GO con un P-value < 0.05 que fueron determinados como resultado de la búsqueda utilizando los genes DE a consecuencia de la cronoterapia con NAD⁺ al ZT 18. (G) Búsqueda *de novo* de motivos sobrerregulados en el grupo HFN como producto de la cronoterapia con NAD⁺. El análisis de *Gen Ontology* y la búsqueda de motivos se realizó en HOMER.

En conjunto estas observaciones sugieren la activación de procesos específicos tras el suministro con NAD⁺ al ZT 11, que son benéficos y que podrían ser responsables de la protección de los efectos adversos desencadenados por el consumo de una dieta alta en grasa.

La búsqueda de enriquecimiento de motivos *de novo* realizada en los promotores de los genes DE específicamente en el grupo tratado con NAD⁺ con respecto al grupo control y los individuos obesos no tratados al ZT 18, produjo matrices con alta similitud a los sitios de unión para NR2E1 (TLX) y HNF4 α , ambos implicados en el mantenimiento de la homeostasis lipídica en el hígado [241, 242]. Además, un motivo reconocido por IRF3 y NR4A1 (Nur77) (Figura 26G) apareció significativamente enriquecido (P = 1e-5). Interesantemente, se ha demostrado que Nur77 regula el transporte citoplásmico de LKB1, fosforilando y activando AMPK. Estos datos indican que la restitución de la ritmicidad circadiana en las concentraciones de NAD⁺ favorecen programas hepáticos de expresión génica relacionados con procesos metabólicos que restituyen la homeostasis energética en un contexto de alimentación con dieta alta en grasa.

8.9.3. Rutas metabólicas relacionadas con la respuesta inmune y la homeostasis de nutrientes, están restituidas en los animales obesos tratados con NAD⁺

Debido a que los patrones de expresión entre los individuos obesos tratados y no tratados con cronoterapia variaron significativamente provocando una reestructuración del transcriptoma, se realizó un análisis de expresión diferencial para determinar las rutas metabólicas diferencialmente reguladas como efecto de la restitución circadiana del NAD⁺. El análisis de enriquecimiento de grupos de genes (GSEA) realizado entre los grupos HF y HFN, mostró una sobrerregulación de las rutas metabólicas controladas por IL6/JAK/STAT3 y TGF β al ZT 6 en los individuos obesos (HF), (Figura 27A), reflejada en la sobreexpresión de genes que intervienen en mecanismos inflamatorios en el hígado de los animales HF, tales como *Stat3*, *Stat6*, *Tgfb1*, *Il1r1*, *Il6st*, *Tnfrsf1a*, *Tnfrsf1b*, *Smad3* y *Smad6* (Figura 27B).

El análisis de GSEA entre los transcriptomas de los grupos HF y HFN a ZT 18, mostró la sobrerregulación en el grupo HF de las vías de homeostasis del colesterol (Figura 27C), características de individuos obesos [243], y un aumento en la expresión de genes que participan en la vía de mTOR (Figura 38C), como *Hmgcr*, *Hmgcs1*, *Sqle*, *Acss2*, *Lss* or *Stard4*, *Acaca*, *Acly*, *Me1*, *Adipor2*, *Pasma3*, *Pasma4*, *Psmid14* y *Psmc6* (Figura 27D), la cual en individuos obesos se encuentra

sobrerregulada promoviendo la activación de marcadores de inflamación [244]. De esta manera observamos que la sobrerregulación de genes relacionados con el procesamiento del colesterol y procesos inflamatorios, no se detectó después del tratamiento con NAD⁺ al ZT 11.

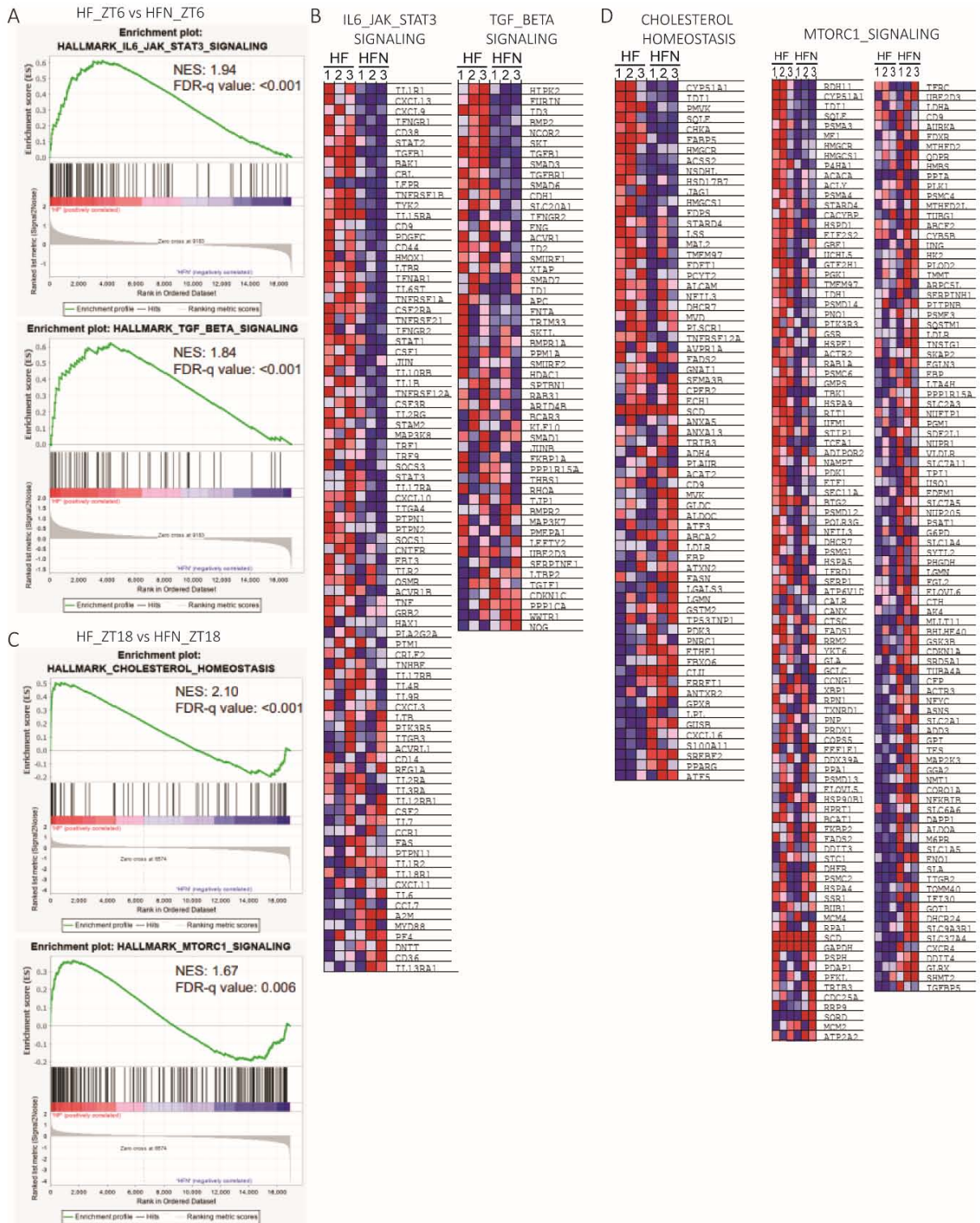


Figura 27. La cronoterapia con NAD⁺ regula a la baja procesos de inflamación y el metabolismo de colesterol inducido por la HFD.

(A) Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA), curvas de puntuación de la expresión génica diferencial en las vías de señalización de IL6-JAK-STAT3 y TGF β (eje x: HF vs HFN) (B) Mapa de calor con los genes que más contribuyen a la IL6 enriquecida Vías de señalización JAK-STAT3 y TGF β . (C) Curvas de puntuación GSEA de expresión génica diferencial en la homeostasis del colesterol y vías de señalización de mTORC1 (eje x: HF vs HFN) (D) Mapa de calor con los genes que más contribuyen a la homeostasis del colesterol enriquecido y vías de señalización de mTORC1. En las curvas de puntuación de la expresión génica, los genes con mayor regulación positiva se muestran en el lado izquierdo (rojo), mientras que los genes con mayor regulación se muestran en el lado derecho (azul). Las barras negras representan las posiciones de los genes de firma regulados al alza de HF frente a HFN en la lista clasificada. La puntuación de enriquecimiento (ES, eje Y) refleja el grado en que los genes están sobrerepresentados. El enriquecimiento de genes característicos en la parte superior de la lista clasificada da como resultado una gran desviación positiva de la ES de cero. NES, puntuación de enriquecimiento normalizado; FDR, valor q ajustado por tasa de descubrimiento falso.

8.10. La detección de nutrientes y la señalización de insulina, son reestablecidas en animales obesos cuando la oscilación del NAD⁺ se recupera farmacológicamente

A partir de tejido hepático extraído de ratones CD, HF y HFN sacrificados cada 6 horas (ZT 0, 6, 12 y 18), se analizaron los niveles de proteína total, y en algunos casos modificaciones postraduccionales involucradas en la modulación de la actividad de un grupo de proteínas relevantes en la regulación del metabolismo energético. Éstas fueron seleccionadas en base a los resultados obtenidos en nuestro análisis de microarreglos.

Derivado de los análisis funcionales en los que se determinó que la ruta de señalización de la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR) se encuentra sobre regulada en los individuos obesos no tratados. Por ello, decidimos estudiar su activación en el hígado de nuestros tres grupos de animales, por medio de la abundancia de proteína total y fosforilada del propio mTOR y de dos de sus efectores principales corriente abajo, las proteínas 4EBP1 y P70S6K quienes son fosforiladas directamente por mTOR; ya que se sabe que cambios en la fosforilación de dichas proteínas es crucial para el control de esta ruta [245]. La señalización de dicha vía resulta interesante dentro de nuestro sistema de estudio ya que el complejo mTORC1 es un regulador maestro del metabolismo de lípidos y glucosa [246, 247]. Los niveles de mTOR(Total) no mostraron variabilidad significativa entre ZTs, ni entre tratamientos, manteniéndose una señal constante (Figura 28A y 28B). La fosforilación de la Ser2448 de mTOR, indicadora de su activación, en hígados de animales sanos (CD) incrementó a partir del ZT 0, mostrando su acrofase a ZT 12, coincidiendo con lo descrito anteriormente [248] (Figura 39A y Apéndice F), mientras que en los individuos obesos no tratados (HF), esta señal se mantuvo elevada durante todo el día, perdiendo su patrón de oscilación circadiana. Interesantemente, los individuos obesos tratados con NAD⁺ a ZT11, mostraron los niveles más bajos de mTOR fosforilado al ZT 12, mientras que esta señal incrementó en el resto de los ZT estudiados, sugiriendo un efecto farmacológico directo del NAD⁺ sobre la fosforilación de mTOR.

La activación de la proteína S6K depende de su fosforilación directa por parte de mTOR en el residuo Thr389, por lo que este cambio postranscripcional es un indicativo claro de la actividad de esta ruta. Debido a ello, se caracterizó la dinámica de esta modificación postraduccional. S6K fosforilada en el residuo Thr389 mostró una clara ritmicidad en los hígados controles, observándose sus niveles más bajos durante el periodo diurno y aumentando durante el periodo nocturno (Figura 28A y 28B), como se reportó previamente [249]. En general, se observó una mayor presencia de esta marca a lo largo de todo el ciclo circadiano en el hígado de los ratones obesos (HF). Interesantemente, en los individuos que recibieron el tratamiento con NAD⁺ al ZT 11 se observó una restitución en la oscilación de la fosforilación de la Thr389 de S6K, mostrando sus niveles mínimos durante el periodo diurno y sus niveles máximos durante la noche, al igual que en los individuos control (Figura 28A y 28B).

La fosforilación de los residuos de Thr37/46 de la proteína 4E-BP1, que también pueden ser usados como indicadores de la actividad de la vía de mTOR, ya que son fosforilados directamente por el complejo mTORC1, se observó un aumento gradual de esta marca desde el ZT 0 hasta el ZT 18 en los individuos control, como se ha reportado anteriormente [250] (Figura 28A y 28B). La señal correspondiente a los individuos HF, mostró una baja global de esta marca, entre el ZT 0 y el ZT 12, con una señal máxima al ZT 18; mientras que en el grupo HFN, se observó este mismo comportamiento, excepto por un descenso estadísticamente significativo de esta marca al ZT 0 (Figura 28A y 28B), lo que sugiere una pérdida en la actividad de mTOR provocado por el suministro de NAD⁺ al ZT 11.

Cabe mencionar que 4E-BP1 es fosforilada adicionalmente en los residuos Thr70 y Ser75 por el complejo mTORC1 [251], por lo que para evidenciar su hiperfosforilación en un contexto de obesidad provocada por la dieta, con respecto a los individuos alimentados con dieta normocalórica, se requirieron determinar los niveles de fosforilación de todos los residuos blancos de mTORC1 en ésta proteína [252]. Sin embargo, para los fines de este estudio, baste con ver una reducción estadísticamente significativa en la fosforilación de los residuos Thr37/46 al ZT 0 en el grupo HFN como producto del suministro de NAD⁺ al ZT 11, para sugerir una disminución en la actividad de mTOR.

La proteína cinasa B (AKT) juega un rol muy importante en la señalización de diversos procesos celulares como la proliferación celular y la apoptosis; sin embargo, su participación en la regulación de la señalización de la insulina y consecuentemente, del metabolismo de la glucosa es de gran interés para el presente proyecto.

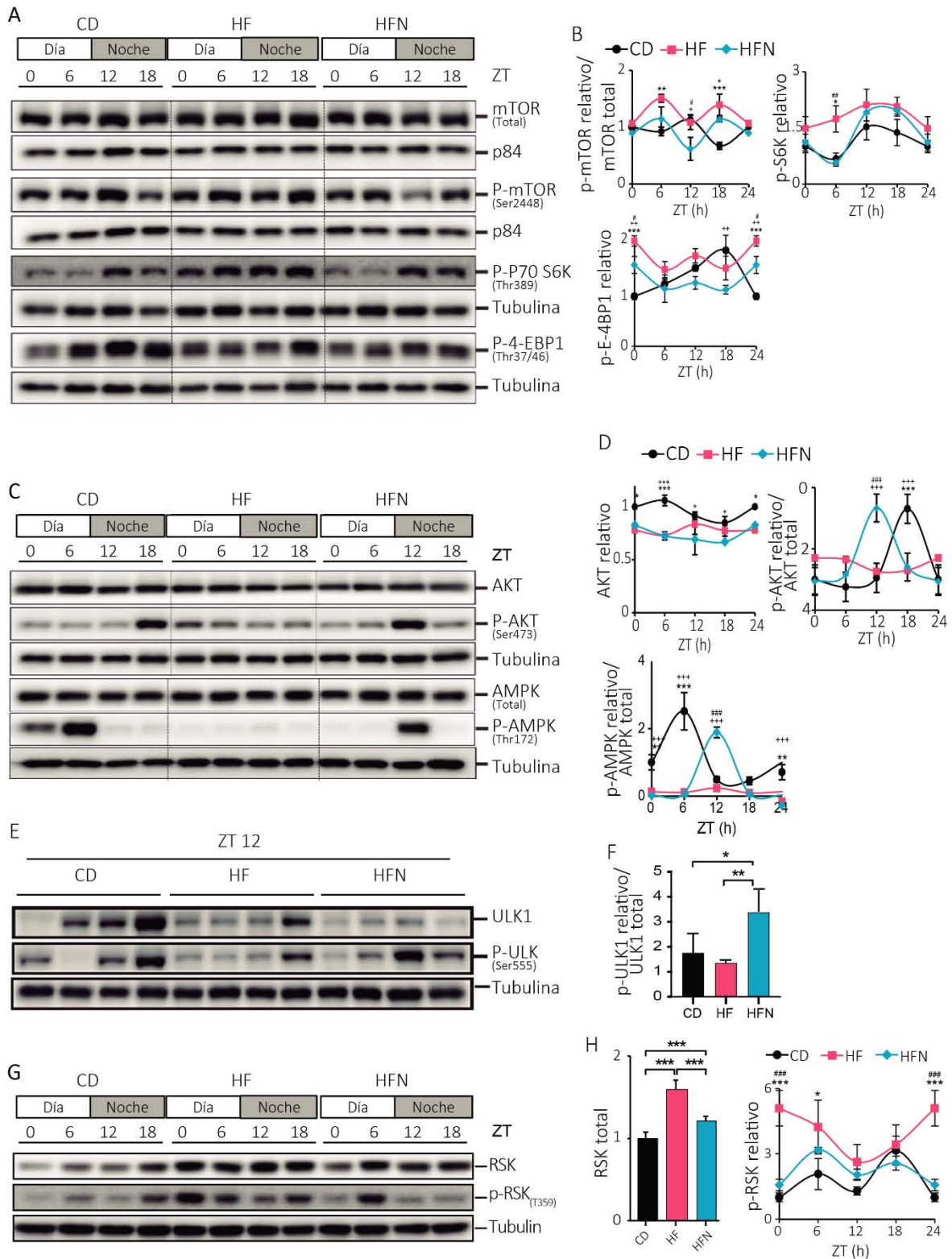


Figura 28. La cronoterapia con NAD⁺ reestituye la expresión de proteínas que actúan como sensores metabólicos.

(A) Niveles totales de mTOR, fosforilación de la Ser2448 de mTOR, Thr389 de S6K y fosforilación de la Thr37/46 de 4E-BP1, junto a (B) sus densitometrías. (C) WB a lo largo del ciclo circadiano de AKT, P-AKT^(Ser473), AMPK y P-AMPK^(Thr172) junto a (D) sus densitometrías. (E) Niveles totales de ULK1 y fosforilación de la Ser55 de ULK1 al ZT 12(F) Cuantificación del WB contra p-ULK1/ULK1. (G) WB contra p90RSK y P-RSK^(Ser359). (H) Densitometría que cuantifica la suma de todos los ZT para la proteína RSK total y a lo largo del ciclo circadiano en el caso de

p-RSK. Se muestra la imagen representativa de 16 geles en los que se muestreó cada ZT con una N=4. Las muestras de cada panel fueron corridas en el mismo gel, junto con el control de carga p84 ó Tubulina, según el caso. El análisis estadístico corresponde a una ANOVA de dos vías con post hoc test de Tukey para comparaciones múltiples ($\alpha=0.05$). *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001. * Diferencia estadística entre CD y HF, + diferencia estadística entre CD y HFN, # diferencia estadística entre HF y HFN.

Al evaluar la expresión de la proteína total en hígado, AKT no mostró cambios significativos entre los grupos, ni entre los ZT evaluados (Figura 28C y 28D). Sin embargo, la fosforilación de AKT en su residuo de Ser473, que se sabe estrictamente necesario para su activación en la vía de señalización de la insulina en hígado [261]; mostró cambios evidentes entre los diferentes tratamientos. En los hígados de los ratones control, alcanzó sus niveles máximos al ZT 18 (Figura 28C y 28D), mientras que no se observó señal en ninguno de los ZT evaluados en los ratones HF. Contrariamente, en los ratones obesos tratados con NAD⁺, la fosforilación de la Ser473 mostró sus niveles de acumulación máxima al ZT 12, una hora después del suministro de NAD⁺, sugiriendo la activación farmacológica de AKT a consecuencia del suministro de este metabolito al ZT 11 en un contexto de obesidad.

La proteína cinasa activada por AMP (AMPK) es considerada como un sensor de energía celular debido a su capacidad para señalar la disminución de ATP dentro de la célula, lo que le permite desplegar procesos de producción energética que incluyen a la glucólisis y la oxidación de lípidos [253]. Se ha reportado que en contextos de inflamación, obesidad y DT2 su actividad descende [254] e interesantemente en hígado, el restablecimiento de su actividad ha sido utilizado como una estrategia terapéutica que reduce la esteatosis hepática no alcohólica inducida por la dieta [255-257]. Tomando en cuenta estos antecedentes, se evaluaron los niveles totales de AMPK, así como su fosforilación en el residuo Thr172 que es un indicador de su actividad [258].

Observamos que los niveles de AMPK(Total), permanecen constantes a lo largo del ciclo circadiano en los tres grupos de estudio (Figura 28C, 28D y Apéndice F). De acuerdo a lo esperado, la fosforilación en el residuo de Treonina 172 mostró un incremento de la señal al ZT 0 con un máximo durante el ZT 6 en los hígados de individuos control. No se observó fosforilación a lo largo del ciclo circadiano en los individuos obesos que no recibieron tratamiento (Figura 28C y 28D); interesantemente detectamos la señal de AMPK fosforilado al ZT 12 en los ratones HFN, lo que sugiere la activación farmacológica de esta proteína inducida por el suministro de NAD⁺ al ZT 11.

Debido a que observamos la activación de AMPK como consecuencia de nuestro tratamiento, evaluamos la fosforilación de unos de sus blancos al ZT 12. La proteína ULK1 es activada por AMPK a través de la fosforilación de su residuo Ser555 y está implicada en el control de la autofagia y el trágico de vesículas desde el aparato de Golgi [259], este último, proceso biológico que apareció representado en los términos GO realizados a partir de los genes DE en el

grupo de individuos obesos tratados con NAD⁺ al ZT 11 (HFN) con respecto a los grupos CD y HF (Figura 26F, *Golgi vesicle transport*).

Por medio de un WB realizado al ZT 12 en extractos de hígado de 4 individuos de cada grupo (Figura 28E y 28F), observamos una acumulación significativamente mayor de la proteína ULK fosforilada en el residuo Ser555 en los individuos del grupo HFN con respecto a los individuos control y a los ratones obesos no tratados (Figura 28E y 28F). Así, este resultado robustece la posibilidad de que AMPK esté siendo activada como consecuencia del suministro de NAD⁺ al ZT 11.

Las cinasas de la subunidad 6 ribosomal (p90RSK) están involucradas en la regulación de la maquinaria traduccional, además de fosforilar proteínas y factores de transcripción que aparecen sobre expresados en nuestros individuos sometidos a dieta alta en grasa, como el factor de transcripción NF-κB [260].

Los niveles de las proteínas p90RSK1-3 tuvieron un nivel máximo de expresión al ZT 18 en los individuos control (Figura 28G y 28H), mientras que los animales del grupo HF, expresaron niveles altos de proteína a lo largo del día. Interesantemente, por medio de la cuantificación de los niveles totales de RSK a lo largo del día, se observa una disminución estadísticamente significativa en el grupo de individuos obesos tratados con NAD⁺ al ZT 11 (HFN).

La fosforilación de p90RSK en el residuo Thr359 es un indicativo de su actividad, cuya máxima acumulación se dio al ZT 18 en los individuos control, mientras que observamos una disminución significativa de esta marca como consecuencia del tratamiento con NAD⁺ en el grupo HFN con respecto a los individuos obesos no tratados (HF) (Figura 28G y 28H). Estos resultados refuerzan la idea de que que las vías de señalización en la que participa p90RSK, como la vía de mTOR y la activación de la respuesta inmune, que se encuentran sobrerreguladas en los individuos alimentados con dieta alta en grasa, son restauradas como efecto del suministro de NAD⁺ al ZT 11.

8.11. El NAD⁺ suministrado al ZT 11 es más efectivo que cuando se suministra al ZT 23 para contrarrestar la fisiopatología producida por el consumo de HF

En este proyecto, nos planteamos responder la pregunta: ¿Es importante la rítmicidad circadiana del NAD⁺, con su acrofase específicamente al ZT 12, para contrarrestar patologías relacionadas con la obesidad, o simplemente elevar los niveles del metabolito, independientemente de la hora del día, es suficiente? Con los datos ya descritos sabemos que el NAD⁺ restituye el fenotipo metabólico si se restauran sus oscilaciones circadianas en fase a lo que se observa en condiciones normales. Sin embargo, para completar la respuesta, fue necesario realizar el estudio suministrando NAD⁺ a una

hora del día cuya concentración es mínima en condiciones normales. Por ello, decidimos repetir nuestro paradigma experimental en ratones obesos, pero administrando el metabolito al ZT 23 (grupo HFN23) y evaluar su efectividad.

8.11.1. La cronoterapia aplicada al ZT 23 invirtió la acrofase del NAD⁺ hepático al ZT 24

Para determinar las concentraciones de NAD⁺ a lo largo de un ciclo circadiano, en los individuos suministrados con este metabolito al ZT 23, fueron cuantificados sus niveles por medio de HPLC a los ZT 0,6,12 y 18 en el grupo HFN23.

Observamos que el suministro de NAD⁺ al final del periodo nocturno, provoca que el pico máximo de concentración de este metabolito se encuentre al ZT 0, en antifase al que se indujo cuando el NAD⁺ fue suministrado al ZT 11 (Figura 29A), una hora antes de que se alcance la máxima concentración de este metabolito en el hígado de animales alimentados con dieta normocalórica [111].

Interesantemente, aunque las concentraciones de NAD⁺ se encuentran en antifase en los individuos del grupo HFN23, recuperan su oscilación circadiana (Figura 29B). De esta manera mostramos que el tiempo de suministro de NAD⁺ determina la temporalidad en la que se induce el máximo pico de concentraciones hepáticas de este metabolito a lo largo del ciclo circadiano, así como la acrofase inducida en la oscilación circadiana de este metabolito.

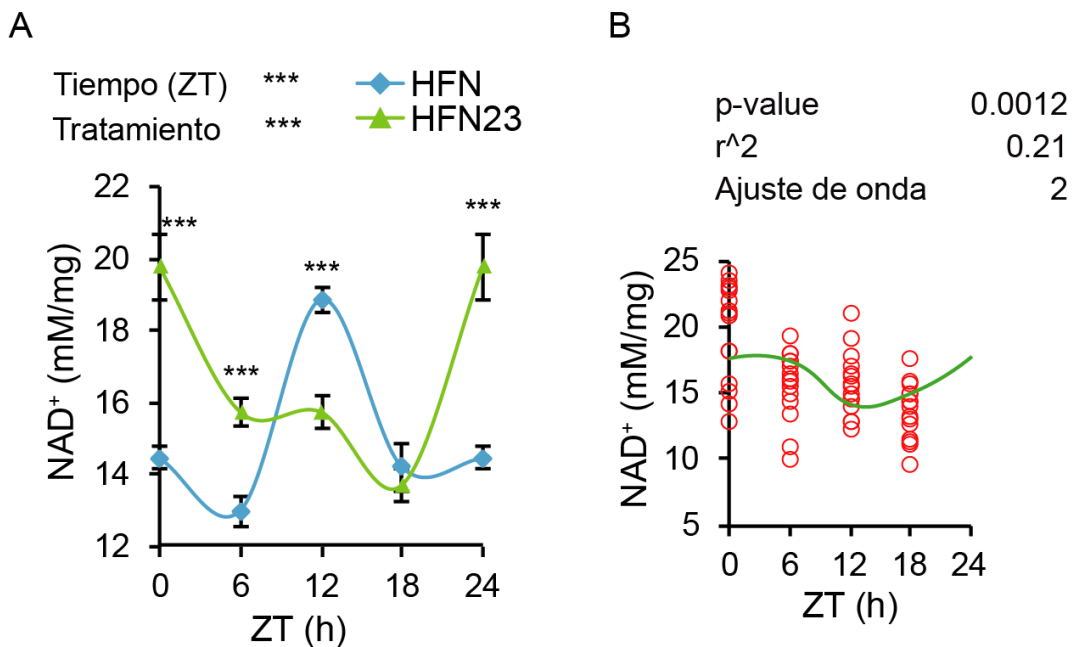


Figura 29. Concentraciones de NAD⁺ a lo largo de un ciclo circadiano en individuos inyectados con este metabolito al ZT 11 y ZT 23. (A) Concentraciones de NAD⁺ hepático al ZT 0, 6, 12, 18 y 24 correspondientes a los grupos HFN y HFN23 medidas por HPLC. (B) Análisis estadístico de oscilación con circawave sobre la concentración de NAD⁺ hepático del grupo HFN23. Los datos se extrajeron de tres repeticiones técnicas provenientes de 5 individuos por cada ZT (N = 20 ratones por grupo). Los datos representan el promedio +SEM. El análisis estadístico corresponde a una ANOVA de dos vías con post hoc test de Tukey para comparaciones múltiples ($\alpha=0.05$). *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001. Los parámetros circadianos que se reportan fueron calculados usando el software CircWave V 1.4.

8.11.2. La hora del día determina la eficacia de NAD⁺ como tratamiento para la disfunción metabólica inducida por la dieta

El peso de los individuos pertenecientes a los grupos CD, HF y HFN23 fue registrado semanalmente. Como era de esperarse, el peso de los individuos alimentados con HFD aumentó con respecto al grupo que fue alimentado con dieta normocalórica, observándose diferencias estadísticamente significativas a partir de la semana 3. No se registraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo HF el grupo suministrado con NAD⁺ al ZT 23 antes de la semana 8, ni tampoco después de iniciar el suministro del metabolito (Figura 30A).

En este contexto, se realizó una comparativa entre el peso de los individuos suministrados con NAD⁺ al ZT 11 y al ZT 23 por medio de la evaluación del porcentaje de cambio en el peso corporal. El peso registrado al inicio de la semana 8, previo al suministro de NAD⁺, es equivalente entre ambos esquemas de tratamiento, al igual que a la semana 9. Sin embargo, a la semana 10 y 11 se registra un porcentaje de cambio corporal en el peso de los individuos suministrados con NAD⁺ al ZT 11 mayor que en los ratones que recibieron el tratamiento en antifase (ZT 23). Interesantemente, observamos una tendencia al aumento de peso por parte del grupo HFN23 entre los valores registrados de la semana 10 a la 11 (menor porcentaje de cambio), lo cual no se observa cuando el metabolito se administra a ZT11 (Figura 30B). Tomando en cuenta estos datos, se observa una mayor eficacia de la terapia con NAD⁺ a ZT11 para contener el aumento de peso provocado por la dieta que cuando se suministra a ZT23.

Posteriormente, los individuos de cada grupo fueron sometidos a una determinación de niveles basales de glucosa al término de las 11 semanas de dieta y las tres semanas de cronoterapia. Dicha medición fue realizada al ZT 4 y ZT 16 después de un ayuno de 12 horas. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las glucosas basales grupos HFN y HFN23 (Figura 30C, 30D). De modo que en ambos ZT los niveles de glucosa basal se restituyeron a niveles comparables con el control tras el tratamiento con NAD⁺, independientemente de la hora del día en que se administrara (Figura 30C y 30D).

Sin embargo, se realizó la prueba de tolerancia a glucosa e insulina al ZT 4, a los animales obesos tratados al ZT 23, con el objetivo de comparar los beneficios sobre la tolerancia a la glucosa y las sensibilidad a la insulina entre los esquemas cronoterapéuticos de suministro de NAD⁺ al ZT 11 y 23. Como se describió anteriormente, el grupo HFN con suministro de NAD⁺ al ZT 11 mostró una clara mejora en el GTT a lo largo del tratamiento (Figura 30E). Las diferencias estadísticamente significativas se acentuaron entre el grupo HF y HFN desde los 10 días post tratamiento hasta

finalizar las tres semanas del mismo (Figura 30E). De manera interesante, no se encontró el mismo efecto en el grupo HF que fue suministrado con NAD⁺ al ZT 23 (HFN23), en donde no se observan diferencias estadísticamente significativas entre este grupo y los obesos no tratados (Figura 30E).

Como se vio anteriormente, los animales obesos tratados con NAD⁺ al ZT 11 (HFN) mostraron mejoras significativas con respecto a los animales obesos no tratados, conforme avanzan los días de suministro con el metabolito, hasta llegar a niveles comparables con el grupo control (Figura 17A y 17B). En cambio, a lo largo del paradigma experimental no se observaron mejoras en el ITT al ZT 4 en los animales obesos tratados con NAD⁺ al ZT 23 (Figura 30F). Interesantemente, nuestros resultados indican que el ZT al que se suministra NAD⁺ no tiene efecto en la de glucosa basal, y ésta disminuye independientemente de la hora en la que se suministra el tratamiento; pero las mejoras en los test de tolerancia a glucosa e insulina sí son dependiente del ZT al que se suministra el metabolito, ya que únicamente se observa una mejora gradual de la respuesta a estas pruebas en los animales tratados bajo un esquema de cronoterapia a ZT 11 y no a ZT 23.

Debido a que el suministro de NAD⁺ al ZT 11 provocó una disminución de los niveles de insulina sérica en animales obesos, replicamos esta cuantificación en los individuos suministrados con NAD⁺ al ZT 23. De esta manera, observamos un incremento estadísticamente significativo en la concentración de insulina sérica a lo largo del ciclo circadiano por parte de los grupos HF y HFN23 con respecto al grupo control (Figura 30G). En el análisis del área bajo la curva, no se observan diferencias significativas entre el grupo de animales obesos al que se le suministró NAD⁺ al ZT 23 (HFN23) y los obesos no tratados (HF), reportándose así, niveles séricos de insulina significativamente más altos en los animales alimentados con una dieta alta en grasa con respecto al grupo CD sin que el suministro con NAD⁺ al ZT 23 revirtiera este aumento (Figura 30H), lo cual sí se observó en los individuos inyectados con NAD⁺ al ZT 11 (Figura 18A).

Adicionalmente, se realizó el análisis comparativo entre los grupos HFN y HFN23 para cuantificar la esteatosis hepática. No se observan diferencias en la señal de ORO dependientes de la hora del suministro de NAD⁺ (Figura 30I). La determinación del porcentaje de área cubierta por la señal de rojo oleoso (Figura 30J) no arrojó diferencias entre los grupos HFN y HFN23, observándose así un decremento en la acumulación de lípidos hepáticos como efecto del suministro con el metabolito sin importar el tiempo al que se otorgó la terapia. Igualmente se determinó que la longitud de las gotas lipídicas observadas en los grupos HFN y HFN23 son 2.8 y 4.8 μm respectivamente; sin embargo, no se determinaron diferencias estadísticamente significativas referentes a este parámetro entre ambos grupos (Figura 30K).

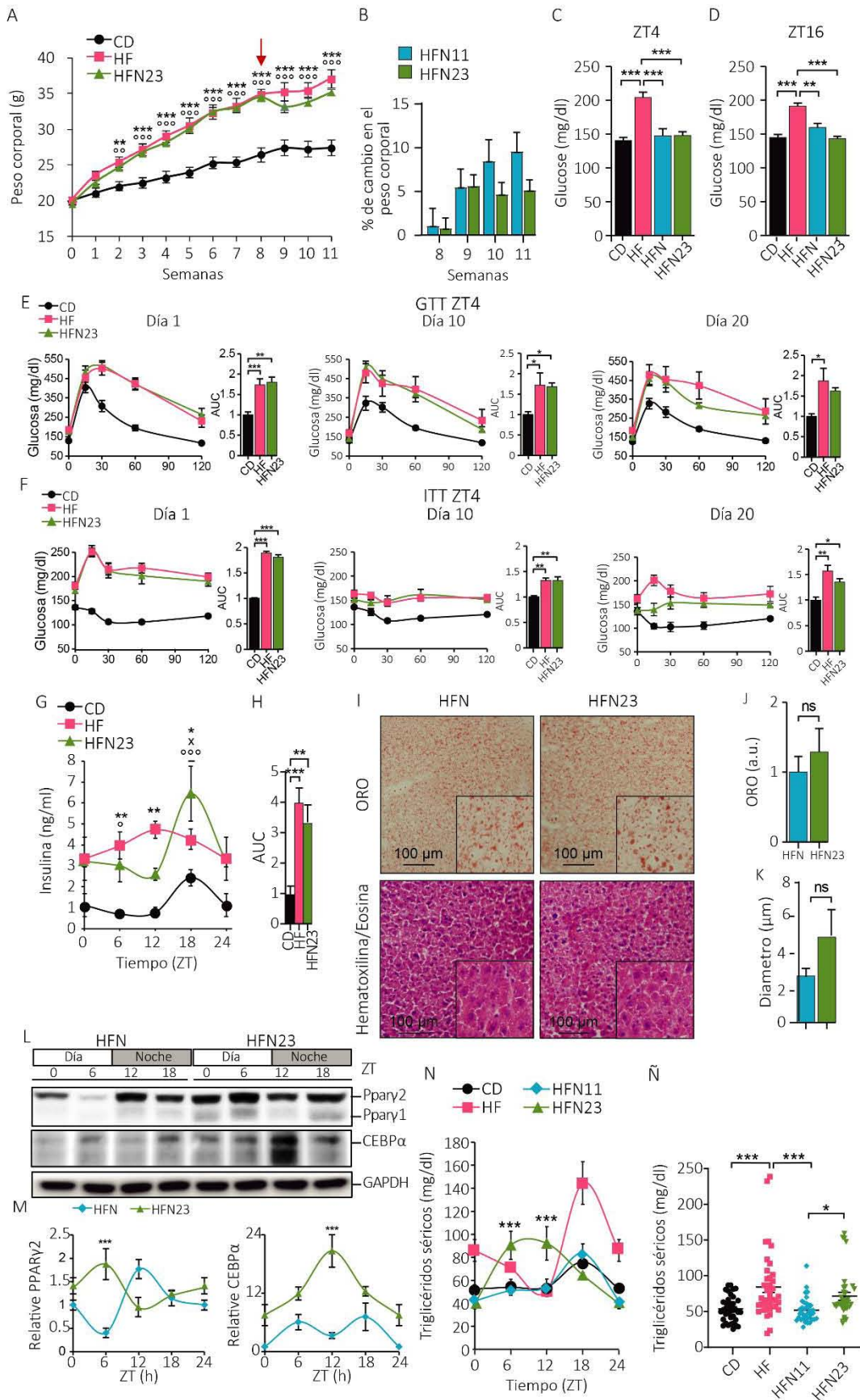


Figura 30. La protección contra la ganancia de peso inducida por la HFD fue más efectiva cuando el NAD⁺ se suministró al ZT 11

(A) Registro semanal del peso corporal (B) Porcentaje de cambio del peso corporal de los grupos HFN11 y HFN23 provenientes de los datos de la semana 8 a la 11. La glucosa basal fue medida a los (C) ZT 4 y (D) ZT 16 en los grupos CD, HF, HFN y HFN23. Los datos representan el promedio \pm SEM (N = 5). Prueba de (E) GTT e (F) ITT. (G) Concentración de insulina en suero a lo largo del ciclo circadiano. (H) Área bajo la curva de la cuantificación de insulina. (I) Tinción con ORO panel superior y, Hematoxilina contra-teñida con Eosina panel inferior. La escala de las barras es de 100 μ m y el aumento es de 20x. Dentro de cada imagen se muestra una sección con el objetivo de 40x. (J) Cuantificación de la señal total de ORO. a.u., unidades arbitrarias; normalizadas para la cuantificación obtenida para los datos control =1. (K) Cuantificación de la longitud de las gotas lipídicas teñidas con ORO. (L) WB de PPAR γ CEBP α (n=4 replicados biológicos y 8 replicados técnicos). (M) Cuantificación por densitometría del WB. (N) Contenido hepático de TG a lo largo de un ciclo circadiano (n = 5) réplicas biológicas por grupo y 2 réplicas experimentales por ZT. (Ñ) Distribución de la concentración hepática de triglicéridos por individuo (N = 40). El análisis estadístico corresponde a una ANOVA de dos vías con post hoc test de Tukey para comparaciones múltiples ($\alpha=0.05$) en el caso de A y ANOVA de una vía con post hoc test de Tukey para comparaciones múltiples ($\alpha=0.05$) en el caso de B. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001. E * Diferencia estadística entre CD y HF, + diferencia estadística entre CD y HFN, # diferencia estadística entre HF y HFN.

En relación a la acumulación de lípidos hepáticos, en el análisis de expresión de las proteínas PPAR γ 1/2, observamos la sobreexpresión de la isoforma PPAR γ 1 en el hígado de los ratones obesos tratados con NAD⁺ a ZT 23 (HFN23) con respecto a los tratados a ZT 11 (HFN) (Figura 30L). Por otro lado, los niveles proteicos de PPAR γ 2 disminuyeron en el grupo HFN, con respecto al grupo HFN23 (Figura 30L y M). Aunado a estos resultados, los niveles de CEBP α están aumentados en los ratones que recibieron la terapia al ZT 23 con respecto a los que la recibieron al ZT 11, en particular al ZT 12.

Interesantemente, se observó una inversión de la fase en la que se acumulan ambas proteínas, donde los puntos mínimos de la cuantificación por densitometría en el grupo HFN coincidieron con los niveles máximos cuantificados en grupo HFN23 (Figura 30M).

En relación a la distribución de lípidos extrahepáticos, la concentración de triglicéridos en suero es un rasgo adquirido por el consumo de dietas altas en grasa. Se cuantificaron los niveles de triglicéridos séricos a lo largo del día en los grupos CD, HF, HFN y HFN23. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control (CD) y los animales obesos tratados al ZT 11 (HFN); sin embargo, se reportaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo al que se suministró NAD⁺ al ZT 23 en comparación al suministrado al ZT 11, específicamente en la fase de descanso (ZT6-12) (Figura 30N). Así, el suministro al ZT 23 de NAD⁺ invirtió la fase de acumulación de TG con respecto al resto de los grupos que en general se encuentra dentro del periodo de actividad (ZT18-24) (Figura 30N).

Globalmente, observamos que las concentraciones de TG séricos de los animales obesos son significativamente mayores que las medidas en los grupos CD y HFN, como se esperaba (Figura 30Ñ). Interesantemente, pese a una tendencia a la baja, no se reportaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo suministrado con NAD⁺ al ZT 23 (HFN23) y los animales obesos (HF), mientras que el grupo HFN23 presentó una concentración significativamente mayor de TG séricos el grupo HFN (Figura 30Ñ). Estos datos sugieren que el tratamiento con NAD⁺

al final del periodo diurno (ZT 11) es más efectivo para reducir los TG séricos en un contexto de obesidad que si se administra al final del periodo nocturno (ZT 23).

8.11.3. La proteína mtCOX1 está subexpresada en los individuos del grupo HFN23

Por medio de la cuantificación de la relación *S18/mtCo1*, observamos un incremento del número de mitocondrias asociado al suministro de NAD⁺ al ZT 11. Debido a ello resultó interesante evaluar la respuesta en la abundancia mitocondrial cuando el tratamiento fue otorgado en antifase al ZT 23 por medio de la cuantificación de la Citocromo C oxidasa 1 (mtCOX1) que está codificada en el DNA mitocondrial y que participa como componente esencial de la cadena respiratoria dentro del complejo IV.

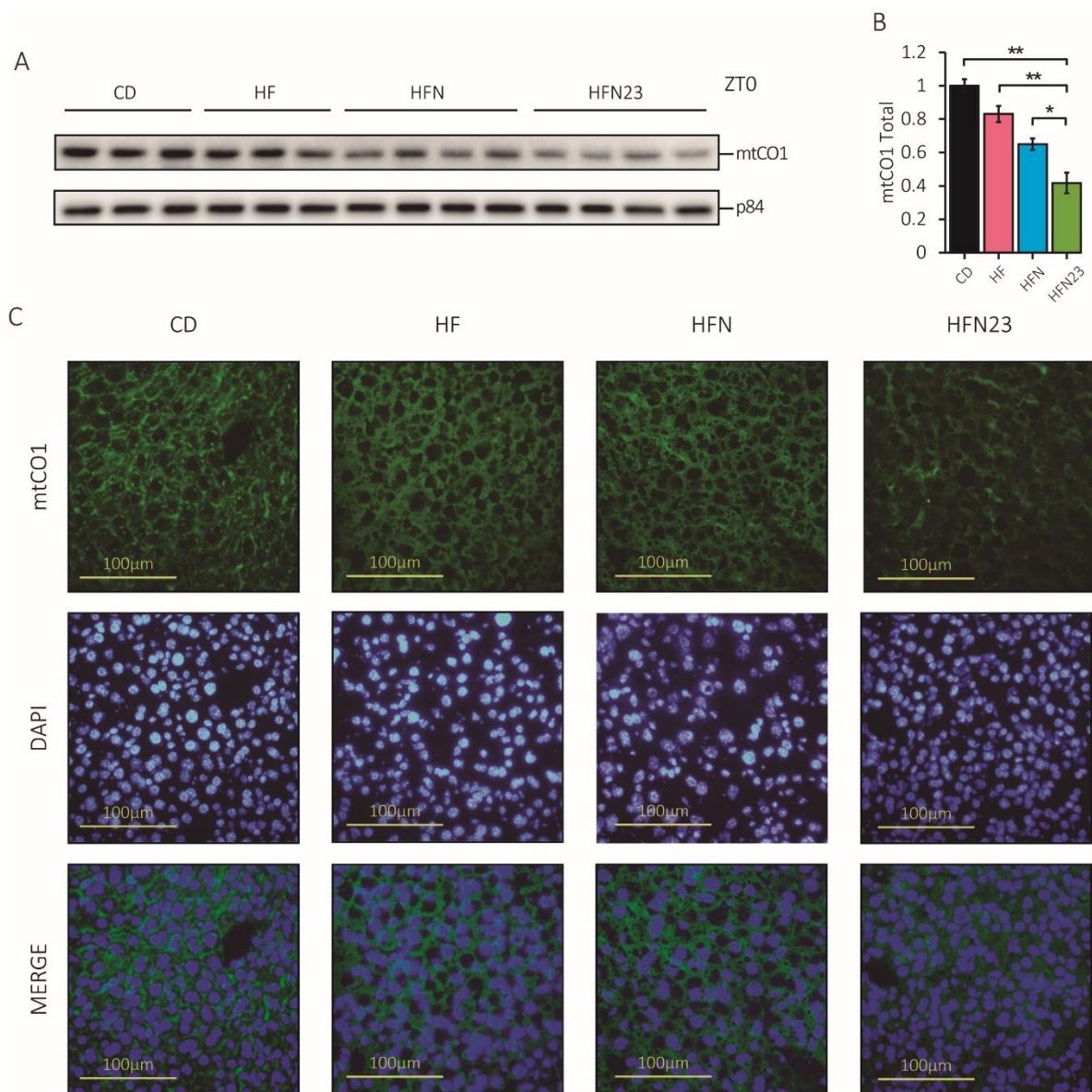


Figura 31. Abundancia de mtCOX1 en hígado de ratones obesos con tratamiento de NAD⁺ al ZT 11 y 23.

(A) WB contra mtCOX1 al ZT 0 y (B) cuantificación del WB (N = 3 ó 4). (C) Imágenes representativas de inmunofluorescencias con objetivo de 40X al ZT 0 y 12 (N = 3 repeticiones biológicas por ZT, N = 3 replicados técnicos) contra mtCOX1 en biopsias de hígado, la línea inferior muestra la escala en 100µm. ANOVA de una vía con post hoc test de Sidak ($\alpha=0.05$) *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

No observamos diferencias estadísticamente significativas entre la abundancia de mtCOX1 en extractos provenientes de hígado entre los grupos control (CD) y los grupos de animales obesos a los que se les negó (HF) o se les suministró con NAD⁺ al ZT 11 (HFN) (Figura 52A y B). Interesantemente los individuos del grupo que recibió el tratamiento al ZT 23 (HFN23) mostraron cantidades significativamente menores de mtCOX1 (Figuras 52A y B). Este resultado fue confirmado por medio de la detección de la Citocromo C oxidasa 1 en biopsias de hígado, en las que observamos una señal menor de esta proteína en el grupo HFN23 con respecto al resto de los grupos evaluados (Figura 52B). En conjunto estos resultados podrían indicar que elevar los niveles de NAD⁺ al ZT 23, al final del periodo de ingesta, desacopla la producción de NADH, que en condiciones normales se da posterior al aumento de la biodisponibilidad del NAD⁺ al ZT 12, lo que podría afectar la producción de mtCOX1 e incluso la abundancia mitocondrial.

8.11.4. Únicamente la cronoterapia al ZT 11 y no al ZT 23 restaura la dinámica de expresión de sensores metabólicos implicados en la regulación energética

En nuestros experimentos anteriores, observamos la reestructuración de diversas rutas y sensores metabólicos que surgen como producto de la cronoterapia con NAD⁺ aplicada al ZT 11 en ratones obesos, por lo que decidimos explorar su dinámica cuando el NAD⁺ se administra en antifase, a ZT23.

Los niveles de mTOR(Total) no mostraron variabilidad entre ZTs, ni entre tratamientos, manteniéndose una señal constante (Figura 53A y Apéndice F), y su fosforilación en la Ser2448 mostró un perfil global similar entre los animales a los que se les suministró NAD⁺ al ZT 11 y ZT 23 (Figura 32A y 32B). Interesantemente, la fosforilación de la Thr389 en la proteína S6K que se observó rítmica en el grupo HFN, con una hiperfosforilación en el periodo nocturno, se observó constitutivamente hiperfosforilada a lo largo de todo el ciclo circadiano en el grupo HFN23 (Figura 32A y 32B), sugiriendo que la ritmicidad en la actividad río abajo del complejo MTORC1, se restaura en el hígado de animales obesos cuando los niveles de NAD⁺ se elevan farmacológicamente al inicio de la fase activa (ZT11), pero no si lo hacen al inicio del periodo de descanso (ZT23).

Posteriormente, realizamos el análisis comparativo de la dinámica de acumulación a lo largo del ciclo circadiano de las cinasas de la subunidad 6 ribosomal (p90RSK), en donde observamos niveles mínimos de expresión al ZT 0 en los individuos suministrados con NAD⁺ al ZT 11 (Figura 32A), mientras que los animales del grupo al que se suministró el metabolito al ZT 23, no

muestran variaciones en la señal de p90RSK1-4 a lo largo del día (Figura 32A y Apéndice F). En cuanto a los niveles de fosforilación de p90RSK en la Thr359, asociados a su actividad, observamos su acumulación máxima al ZT 6 en los individuos tratados con NAD⁺ al ZT 11. Contrariamente, en los individuos obesos tratados con NAD⁺ al ZT 23, se observa una mayor fosforilación durante todo el ciclo, con peculiar abundancia al ZT 0 y 12 (Figura 32A y 32B); sugiriendo que las vías dependientes de RSK están más activas en los individuos del grupo HFN23.

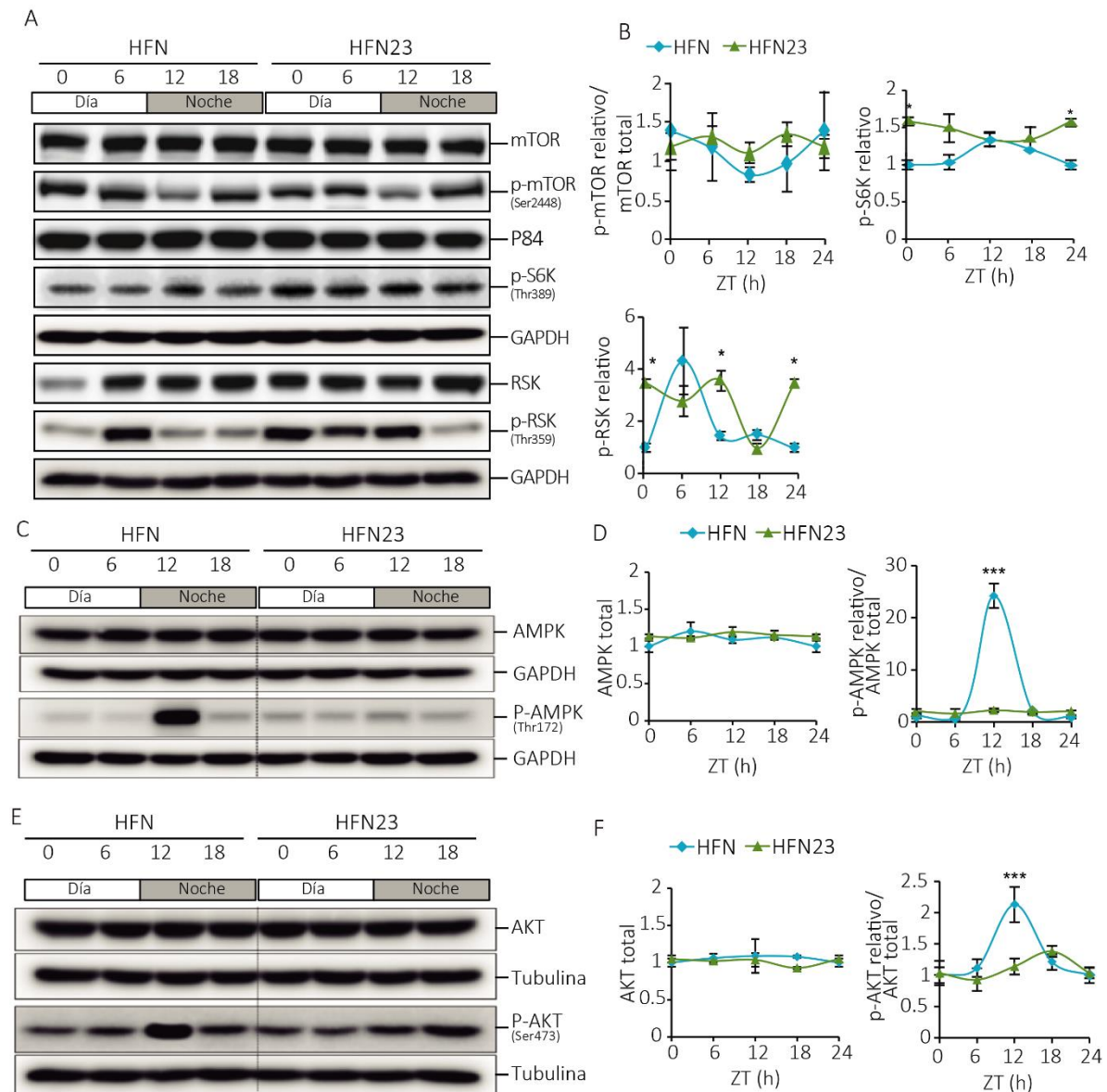


Figura 32. Dinámica de acumulación de proteínas y sus PTMs que participan en la ruta de mTOR.

(A) WB de proteínas que participan en la ruta de mTOR y su (B) densitometría. (C) WB de AMPK y p-AMPK junto a su (D) densitometría. (E) Western blot pcontra AKT y pAKT en hígados de ratones obesos tratados con cronoterapia a ZT 11 (HFN) o a ZT 23 (HFN23), junto a su (F) densitometría. Se utilizó p84 o Tubulina como *house keeping*. Las muestras de cada panel fueron corridas en el mismo gel, junto con el control de carga correspondiente, colocado en la parte inferior. Se muestra la imagen representativa de 6 gels en los que se inspeccionó cada ZT con una N=4. El análisis estadístico corresponde a una ANOVA de dos vías con post hoc test de Tukey para comparaciones múltiples ($\alpha=0.05$). *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001. E

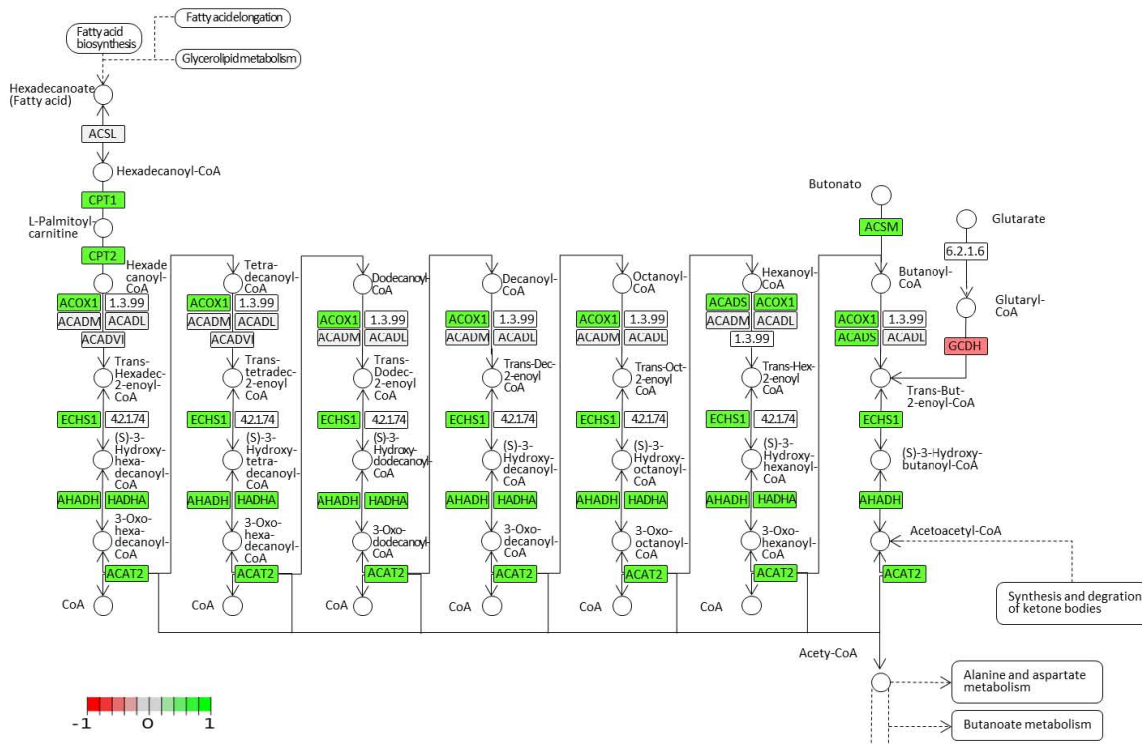
Debido a que observamos la activación del sensor metabólico AMPK a consecuencia del suministro de NAD⁺ al ZT 11, evaluamos su respuesta en los animales tratados al ZT 23. Como se observa en la figura 54, los niveles de AMPK(Total), permanecen constantes a lo largo de los tiempos estudiados y tampoco se observan diferencias entre ambos tratamientos. Sin embargo, la fosforilación en el residuo T172 que aumentó al ZT 12 en los individuos obesos suministrados con NAD⁺ al ZT 11, no se observó a lo largo del ciclo circadiano en los individuos obesos que recibieron terapia con NAD⁺ al ZT 23 (Figura 31C y 31D), sugiriendo que es necesario el aumento de la biodisponibilidad del NAD⁺ al ZT 12 para provocar la activación de AMPK.

Por medio del suministro de NAD⁺ al ZT 11, se indujo la activación de la proteína AKT, sin embargo, para dilucidar si esta activación es dependiente del punto circadiano al que se suministra este metabolito, evaluamos su respuesta en los individuos tratados al ZT 23. Así, observamos que AKT total permanece constante a lo largo del ciclo circadiano independientemente del tratamiento aplicado (Figura 31E y F). Sin embargo, la fosforilación en el residuo de Ser473 muestra dinámicas diferentes entre los tratamientos, mostrando niveles máximos al ZT 12 en los individuos obesos suministrados al ZT 11, mientras que en los tratados a ZT 23, AKT fosforilada no se acumula de forma tan significativa en ninguno de los ZT evaluados (Figura 31E y F), lo que sugiere que el aumento de la biodisponibilidad del NAD⁺ al ZT 12, potencia la activación de AKT, en comparación a cuando se inducen concentraciones altas de NAD⁺ al ZT 23.

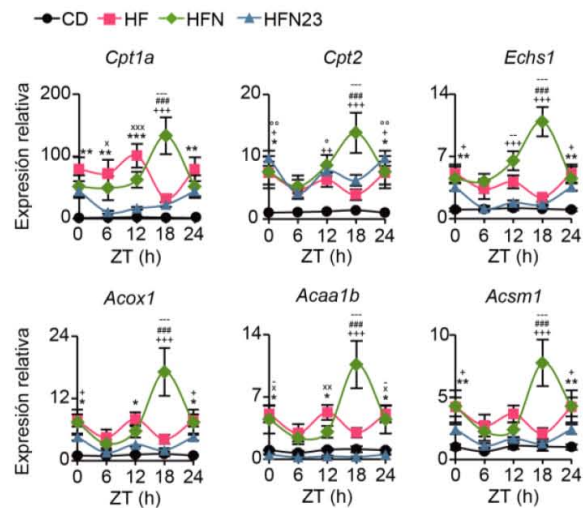
8.11.5. El NAD⁺ promueve la sobreexpresión de genes que controlan la oxidación de ácidos grasos al ZT 18 cuando es suministrado al ZT 11

La β -oxidación depende de un grupo de enzimas que tienen por propósito la degradación de ácidos grasos a través de descarboxilaciones sucesivas llevadas a cabo por un conjunto de proteínas mitocondriales, entre las que se encuentran la Acyl-CoA Oxidasa 1 (ACOX1), Enoil-CoA hidratasa (ECHS1), Hidrxiacil-CoA deshidrogenasa (HADH), Hidrxiacil-CoA deshidrogenasa subunidad α (HADHA), Acetil-CoA Acetiltransferasa 2 (ACAT2) y la Acetil-CoA deshidrogenasa de cadena corta (ACADS) [262]. El sustrato de estas enzimas, ácidos grasos de cadena sencilla, son introducidos desde el exterior de la mitocondria hasta la matriz por medio de la Carnitina-palmitoiltransferasa 1 y 2, quienes son las enzimas limitantes de la β -oxidación [262]. Según los datos de nuestros microarreglos, los genes que codifican las proteínas que participan en dicha ruta catabólica se encuentran sobreexpresados en los individuos obesos que fueron tratados con NAD⁺ al ZT 11 específicamente durante el ZT 18 con respecto a los individuos a los que no se les otorgó el tratamiento (Figura 33A).

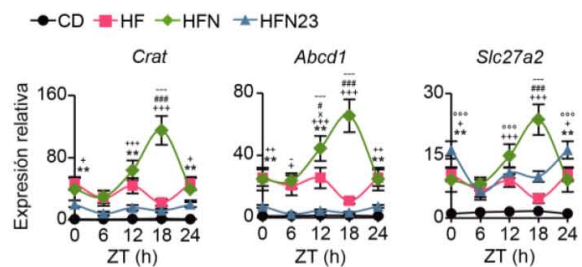
A



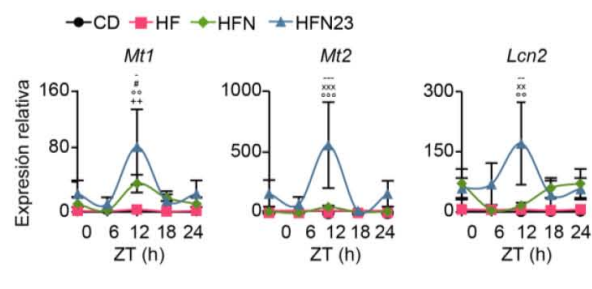
B Genes que participan en la β -oxidación



C Genes que participan en la α -oxidación



E Genes que ofrecen protección contra la obesidad



D Genes que participan en la ω -oxidación

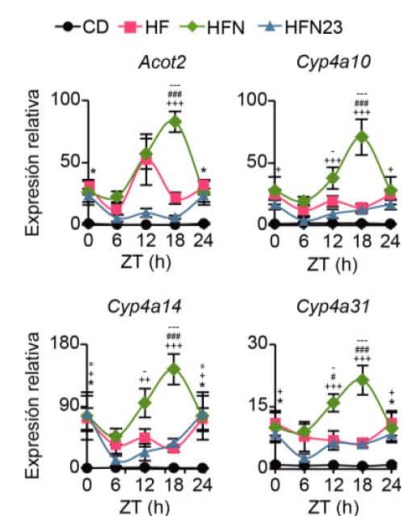


Figura 33. Sobreexpresión de genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos a consecuencia del tratamiento con NAD^+ al ZT 11.

(A) En color verde se muestran los genes sobreexpresados en la condición HFD comparados con su expresión en los animales obesos que no recibieron tratamiento (grupo HF). (B) Expresión de genes involucrados en la β -oxidación. (C) Enzimas que participan en α -oxidación (D) Cuantificación por qPCR de los genes *Cyp4a10*, *Cyp4a14*, *Cyp4a31* y *Acot3* implicados en la ω -oxidación. (E) Expresión los genes *Mt1*, *Mt2* y *Lcn2*. Los datos de expresión (N = 3) fueron introducidos al servidor pathview [263]. En las qPCR se utilizó una N = 5. El análisis estadístico corresponde a una ANOVA de dos vías con post hoc test de Tukey para comparaciones múltiples ($\alpha=0.05$), *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001. *diferencia estadística entre CD y HFN, ●diferencia estadística entre HF y HFN, # diferencia estadística entre CD y HFN23, • diferencia estadística entre CD vs HF, \$ diferencia estadística entre HFN vs HFN23, % diferencia estadística entre HF y HFN23.

Con el propósito de evaluar el efecto de la cronoterapia otorgada al ZT23, se evaluó por medio de qPCR la expresión de una batería de genes involucrada en la oxidación de ácidos grasos en los grupos CD, HF, HFN y HFN23. La expresión de los genes fue determinada al ZT 0, 6, 12 y 18. La expresión de los genes *Cpt1a*, *Cpt2*, *Acox1*, *Acaa1b*, *Echs1* y *Acsm1*, involucrados en la β -oxidación, es menor en el grupo CD en todos los ZT estudiados con respecto al resto de los tratamientos, con excepción del gen *Acaa1b*, cuya expresión es menor en el grupo HFN23 (Figura 33B). En la condición HF, los genes estudiados de la β -oxidación están sobreexpresados con respecto al control como efecto de la alimentación con una dieta rica en grasa. Interesantemente, la expresión de estos genes se ve incrementada al ZT 18 al aumentar la biodisponibilidad del NAD^+ al ZT 12. Sin embargo, cuando el NAD^+ es administrado en la fase inversa en el grupo HFN23, cuantificamos los niveles más altos de transcritos del conjunto de genes estudiados al ZT 24, una hora después del suministro del metabolito. A pesar de ello, este aumento es estadísticamente menor que el presentado al ZT 18 como producto de la inyección intraperitoneal al ZT 11 (Figura 33B).

En el caso de las proteínas acil-CoA sintetasa de ácidos grasos de cadena larga y muy larga (SLC27A2) que cataliza la formación de acil-CoA y de la proteína ABCD1 que es un transportador de membrana que importa ácidos grasos y acil-CoA de cadena larga a través de la membrana del peroxisoma, que suministran el sustrato a las enzimas que catabolizan ácidos grasos a través de la α -oxidación como la carnitina O-aciltransferasa (CRAT) (Figura 33C), también fueron analizadas en este estudio. La expresión de los genes que codifican estas enzimas mostró un nivel menor en el grupo CD con respecto al resto de los tratamientos (Figura 33C). Los genes *Slc27a2*, *Abcd1* y *Crat* presentaron un aumento significativo de su expresión al ZT 18 específicamente en el grupo HFN. El suministro de NAD^+ al ZT 23 no aumentó la expresión de los genes que participan en el catabolismo de ácidos grasos a través del peroxisoma con la misma intensidad conseguida en el grupo HFN; sin embargo, los niveles de mRNA de estos genes poseen su máxima expresión al ZT 24, una hora después del suministro con NAD^+ en el grupo HFN23. También se observó una disminución en los niveles globales de los transcritos *Abcd1* y *Crat* como efecto del suministro de NAD^+ al ZT 23 con respecto a los animales obesos.

Por otro lado, los citocromos P450 son un grupo de monooxigenasas involucradas en el transporte de electrones dependientes de NADPH, a través de estas reacciones las enzimas P450 A10, P450 4A14 y P450 4A31 participan en la oxidación de ácidos que tiene lugar en los microsomas [265]. Los niveles de transcripción de estas monooxigenasas y de la acetil CoA-tioesterasa 2 (ACOT2), que cataliza la hidrólisis de acil-CoA al ácido graso libre y la coenzima A (CoASH) para proporcionar sustratos a la beta-oxidación de ácidos grasos [266], fueron menores en el grupo alimentado con dieta normocalórica con respecto al resto de los grupos de nuestro estudio (Figura 33D).

Los hígados de los ratones obesos sin tratamiento (HF) mostraron un aumento generalizado en la transcripción de *Cyp4a31* y *CYP4a14*. Sin embargo, la cronoterapia con NAD⁺ al ZT 11 indujo un aumento estadísticamente significativo con respecto a todos los grupos en la transcripción de los genes *Cyp4a10*, *Cyp4a14*, *Cyp4a31* y *Acot2* al ZT 18. Interesantemente, los individuos a los que se les suministró NAD⁺ al ZT 23, mostraron su máxima acumulación de transcritos una hora después del suministro del metabolito al ZT 24, la cual no obstante fue menor que en el grupo HFN en todos los puntos circadianos evaluados (Figura 33D).

Dentro de este estudio cabe mencionar a los genes que codifican a las metaloproteínas 1/2 y *Lcn2*, que han sido asociados con un efecto protector ante ciertas patologías relacionadas al suministro de una dieta alta en grasa [267, 268]. Interesantemente, como efecto del tratamiento con NAD⁺, observamos un incremento en sus transcritos en ambos grupos suministrados (HFN y HFN23). Sin embargo, el suministro del tratamiento al ZT 23 provocó una sobreexpresión mayor de su transcripción en comparación a cuando el metabolito fue suministrado al ZT 11 (Figura 33E), lo que sugiere la activación de programas transcripcionales dependientes de la hora de suministro con NAD⁺, que en este caso favoreció a los genes antes mencionados cuando la cronoterapia se otorgó al ZT 23.

Conjuntando estos datos, podemos observar que la cronoterapia otorgada al ZT 11 aumenta la expresión de los genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos, no así cuando se suministra al ZT 23. Sin embargo, la expresión de algunos genes que protegen contra la obesidad como *Mt1*, *Mt2* y *Lcn2*, es estimulada por el NAD⁺ en particular, cuando es suministrado al ZT 23.

8.12. La biodisponibilidad del NAD⁺ determina la fase en la que se expresan los genes y proteínas del reloj circadiano, así como la expresión de los genes que controlan

Existen antecedentes en la literatura que indican la existencia de un diálogo entre NAD⁺/NAMPT y SIRT1/BMAL1:CLOCK, en ellos se plantea que las concentraciones de NAD⁺ podrían reconfigurar la transcripción de los CCG's a través de la modulación en la actividad de BMAL1:CLOCK al menos en parte a través de SIRT1. Interesantemente, cuando los individuos obesos fueron suministrados con la terapia al ZT 23, observamos un patrón inverso de acumulación de las proteínas del reloj a lo largo del ciclo circadiano al descrito para el grupo HFN (Figura 34A). En los hígados del grupo HFN23, la señal de P-BMAL1 apareció al inicio del periodo diurno (ZT0), mientras que la acumulación máxima de la forma desfosforilada se vio a ZT12. Este patrón es exactamente antifásico al que se observó en los hígados del grupo HFN, tratados con NAD⁺ al ZT 11 (Figura 34A y 34B).

El análisis de la proteína CRY1 reveló que el suministro de NAD⁺ al ZT 23 provocó una reducción de sus niveles al ZT 0, alcanzando su acumulación máxima al ZT 18. Esta dinámica también se observó inversa a la del grupo HFN (Figura 34A y 34B). Algo similar sucede con PER2, que en el grupo HFN23 se acumula durante el periodo diurno, mientras que en los individuos en el grupo HFN se acumula durante el nocturno. (Figura 34A y 34B). Finalmente, la proteína REV-ERB α en los hígados de los ratones del grupo HFN mostró su máximo de acumulación al ZT 6 el cual disminuye a una señal menor pero visible al ZT 12. Igualmente, la acumulación de esta proteína se observa inversa, a los ZT 18 y 0, en los individuos obesos tratados con NAD⁺ al ZT 23 (Figura 34A y 34B).

Debido a que observamos una reconfiguración en la dinámica de acumulación de las proteínas del reloj provocada por el suministro de NAD⁺ al ZT 23, cuantificamos la transcripción a lo largo del ciclo circadiano de los genes que codifican su maquinaria. Interesantemente, la fase en la que se expresan *Bmal1*, *Clock*, *Cry1*, *Per1*, *Per2* y *Rev-erba* se invirtió como efecto del aumento en la biodisponibilidad del NAD⁺ a ZT23, en antifase al pico de máxima biodisponibilidad conocido en hígado (ZT 12) (Figura 34C). El cambio de fase en la expresión de estos transcritos en el hígado se reportó con CircWave en alrededor de 12 horas (Figura 34D).

En relación a lo anterior, la transcripción circadiana de genes es controlada por la maquinaria transcripcional del reloj [269], por lo que la reprogramación que sufrió este sistema a

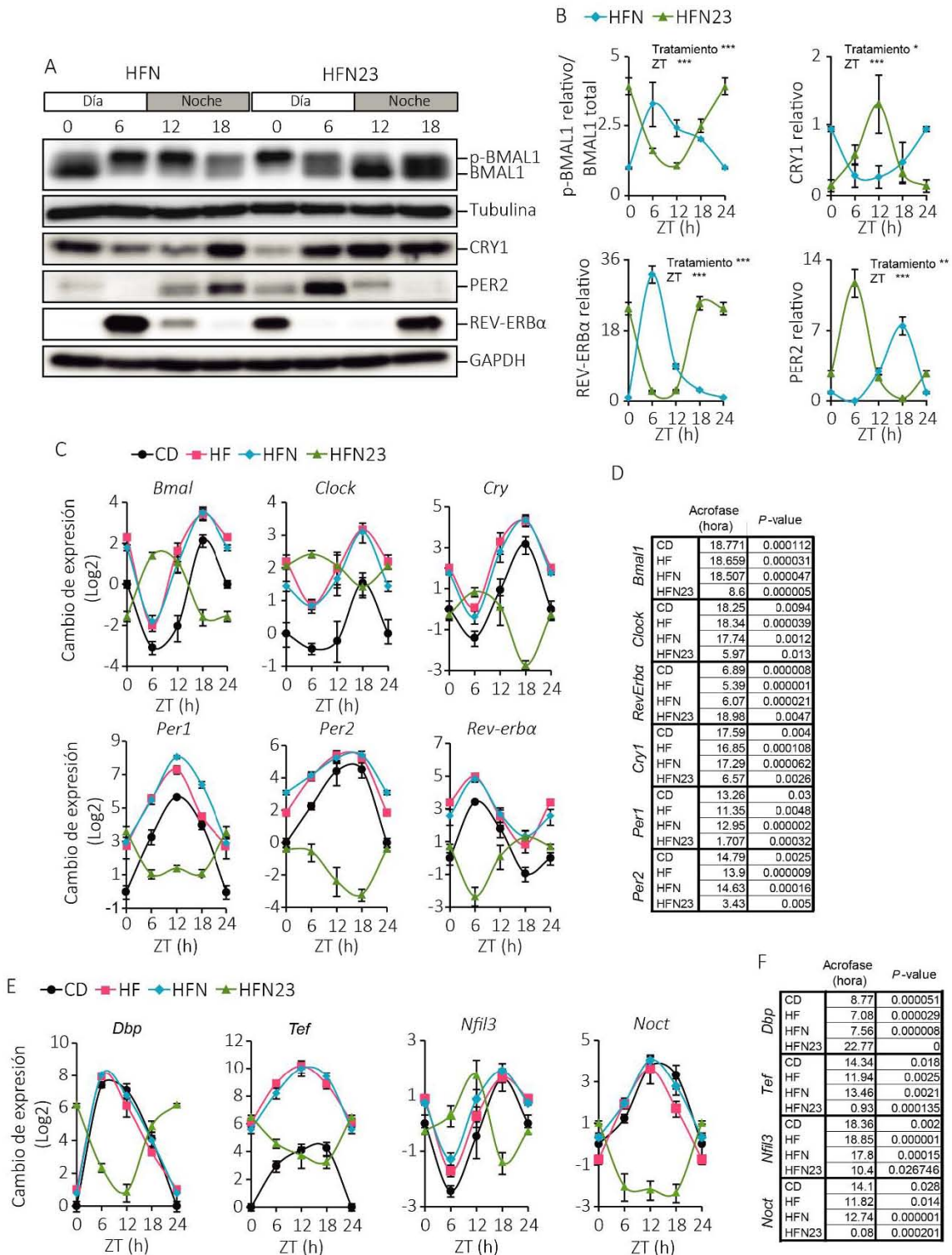


Figura 34. La dinámica de acumulación de las proteínas que controlan el reloj circadiano se invierte como consecuencia de suministrar NAD^+ al ZT 23, al igual que los genes a los que controlan.

(A) Western blot de BMAL1, p-BMAL1, CRY1, PER2 y REV-ERB α junto a su (B) densitometría. (C) RTqPCR de los genes que controlan el reloj circadiano en hígado. (D) Acrofase y p-value de la detección de ritmos circadianos ($P < 0.05$) de los genes del reloj en hígado determinados por el programa Circ Wave. (E) Cuantificación de CCG en hígado por qPCR. (F) Acrofase y p-value de la detección de ritmos

circadianos ($P < 0.05$) de los genes del reloj en hígado determinado por el programa Circ Wave. Las muestras de cada panel fueron corridas en el mismo gel, junto con el control de carga correspondiente, colocado en la parte inferior. Se muestra la imagen representativa de 4 geles en los que se muestreó cada ZT con una $N=4$. El análisis estadístico corresponde a una ANOVA de dos vías con post hoc test de Tukey para comparaciones múltiples ($\alpha=0.05$, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

consecuencia del suministro de NAD^+ al ZT 23, tentativamente pudo haber afectado la ritmicidad de los CCG. Por ello evaluamos la transcripción de algunos genes que son controlados directamente por la maquinaria del reloj y que son robustamente circadianos como *Dbp*, *Tef*, *Nfil3* y *Noct* (Figura 34E). Observamos que la fase de expresión de estos transcritos en el hígado se invirtió tras el suministro de NAD^+ al ZT 23, provocando un corrimiento de su acrofase de aproximadamente 12 horas con respecto al resto de grupos, y en particular a los hígados del grupo HFN (Figura 34E y 34F).

8.13. El suministro de NAD^+ al ZT 23 no reorganiza el reloj circadiano del Núcleo Supraquiasmático ni tampoco afecta eventos comportamentales o de conducta alimentaria

La reorganización de la maquinaria molecular del reloj circadiano que observamos en el hígado tras el suministro con NAD^+ al ZT 23, abrió la posibilidad de una reestructuración más amplia que incluso pudiese afectar el comportamiento de los individuos, debido a que el suministro del metabolito se realizó de forma sistémica, por lo que los núcleos cerebrales que controlan la conducta alimentaria como el arcuato, ventromedial y paraventricular [270-272] pudieran haber sido afectados y esto derivara en cambios en los patrones de ingesta que podrían influir los fenotipos descritos. Tomando en cuenta estos hechos, decidimos explorar el comportamiento, la conducta alimentaria de los individuos y finalmente la dinámica de expresión de los genes que controlan el reloj y los CCGs en el núcleo supraquiasmático, como indicadores de la posible reprogramación en el reloj central.

8.13.1. El NAD^+ suministrado a los ZT 11 y 23 mantiene de manera general los patrones de movimiento y alimentario en los individuos obesos a lo largo del ciclo circadiano.

El máximo consumo de alimento se dio durante el periodo nocturno en los tres grupos estudiados, como se ha reportado anteriormente para el caso de la conducta alimentaria en ratones (Figura 35A), evidenciando que el tratamiento con NAD^+ no reorganiza completamente los patrones de ingesta. Sin embargo, se observaron cambios puntuales dependientes del tiempo en el que fue aplicado el tratamiento con NAD^+ . En este sentido, observamos una disminución significativa del consumo de alimento durante el periodo de descanso, específicamente al ZT3, en el grupo

suministrado con NAD⁺ al ZT 11 (HFN 11) (Figura 35A). También se determinó un aumento significativo del consumo de alimento al inicio del periodo de actividad (ZT 12) en el grupo suministrado con NAD⁺ al ZT 23 HFN23 (Figura 35A). Por otro lado, al ZT 21 se observó una diferencia significativa entre el consumo de alimento en los grupos HFN y HFN23 (Figura 35A), sugiriendo un avance de fase en el patrón de ingesta del grupo HFN23. Estas diferencias puntuales podrían ser atribuidas a una señal que posiblemente aporta el NAD⁺ sobre la ingesta de alimento.

Por otro lado, no observamos diferencias significativas en la cantidad total de alimento que consumen los individuos de los grupos HF, HFN y HFN23 a lo largo del día (Figura 35A), por lo que la reducción significativa de peso que observamos después de suministrar NAD⁺ al ZT 11 en los animales obesos del grupo HFN, con respecto a los individuos de los grupos HF y HFN23, no se debe a una diferencia en la cantidad de alimento ingerido.

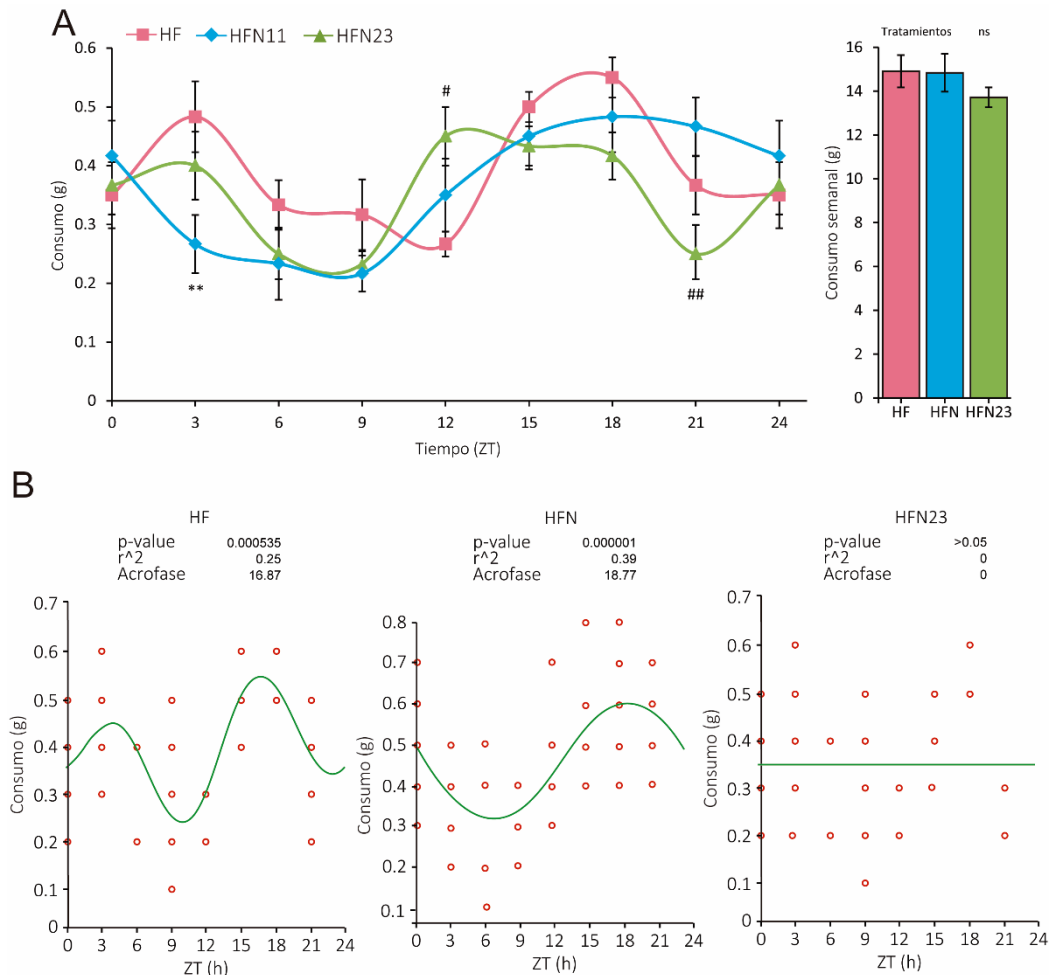


Figura 35. Consumo de alimento a lo largo del ciclo circadiano.

(A) Consumo de alimento cada 3 horas a lo largo del ciclo circadiano (N = 5 a 7) (B) Análisis de oscilación o ausencia de oscilación circadiana en el consumo de alimento de los grupos HF, HFN y HFN23. El análisis estadístico corresponde a una ANOVA de dos vías con *post hoc* test de Tukey ($\alpha=0.05$), *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001. *diferencia estadística entre HF y HFN, ° Diferencia estadística entre

HF y HFN23, # diferencia estadística entre HFN y HFN23. Los parámetros circadianos que se reportan fueron calculados usando el software CircWave V 1.4.

Interesantemente, por medio de un análisis para detectar oscilaciones circadianas, observamos que el suministro de NAD⁺ al ZT 23 provoca una pérdida del patrón de oscilación en la conducta alimentaria (Figura 35B), mientras que este se conserva en los animales suministrados con NAD⁺ al ZT 11 (Figura 35B). Probablemente esta pérdida de rítmicidad en la ingesta en los animales del grupo HFN23, se deba al desacoplamiento entre la concentración máxima de NAD⁺ y el inicio del periodo de alimentación.

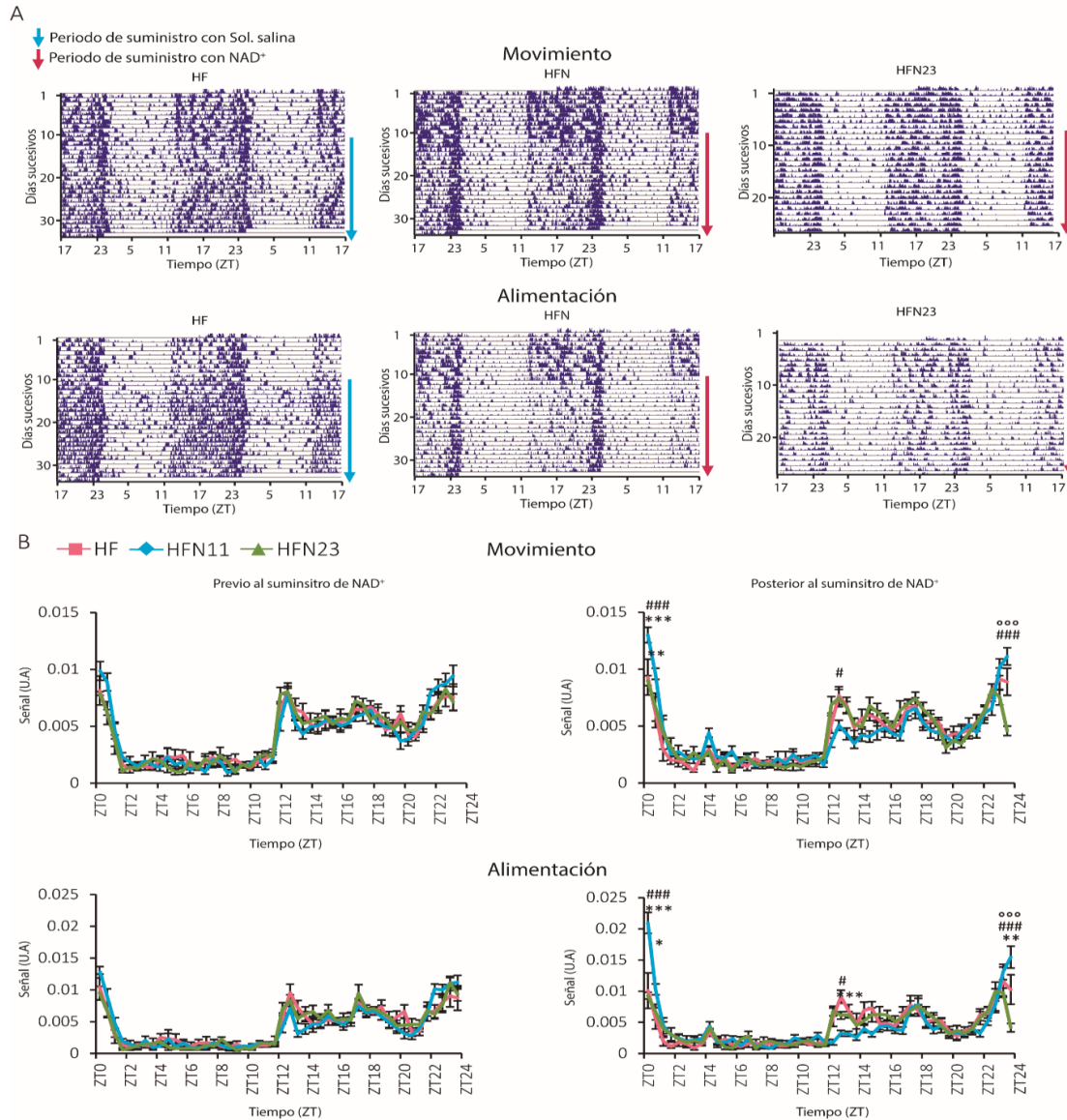


Figura 36. Perfiles de actividad motriz y alimentaria a lo largo del ciclo circadiano.

(A) Actogramas (B) Cuantificación de la actividad motriz y la conducta alimentaria (N = 7). Los datos fueron recabados con el programa OASPAD20, analizados y graficados con el programa RhythmicAlly. Las flechas azules y rojas indican el periodo de tratamiento con solución salina o NAD⁺. El análisis estadístico corresponde a una ANOVA de dos vías con post hoc test de Tukey ($\alpha=0.05$), *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001. *diferencia estadística entre HF y HFN, ° Diferencia estadística entre HF y HFN23, # diferencia estadística entre HFN y HFN23. La flecha azul (↓) indica el inicio del periodo de suministro vía I.P. de solución salina y la flecha roja (↓) indica el inicio del periodo de suministro vía I.P. con NAD⁺.

Debido a que el NAD⁺ provocó cambios puntuales en la ingesta, dependientes de la hora a la que fue suministrado, se decidió evaluar los perfiles de conducta locomotriz y alimentaria en los grupos HF, HFN y HFN23. Como se esperaba, todas las cohortes se comportan de manera comparable antes del tratamiento (Figura 36A, días 1-7, y 36B, “previo al suministro de NAD⁺”). Sin embargo, a partir de que se comienza con el tratamiento de NAD⁺ (Figura 36A, flecha roja), observamos un aumento de la actividad motriz y alimentaria alrededor al final del periodo de ingesta en el grupo HFN (Figura 36A, 36B, mientras que el grupo HFN23 mostró un aumento significativo en la actividad motriz y la ingesta al ZT 12, coincidiendo con lo observado para el consumo alimenticio (Figura 36A). Las causas de estas diferencias en la conducta de los grupos podrían radicar en el desacoplamiento de eventos regulados por el reloj circadiano, como los son el inicio del periodo de ingesta y el aumento de la concentración de NAD⁺, o en la influencia del NAD⁺ sobre el reloj molecular de los distintos núcleos hipotalámicos, similar a lo que sucedía en el hígado.

8.13.2. El suministro de NAD⁺ al ZT 23 no reorganiza el reloj circadiano del Núcleo Supraquiasmático.

Debido a que la cronoterapia con NAD⁺ reorganizó el reloj circadiano hepático cuando se aplicó al ZT 23, debe considerarse su efecto en el núcleo supraquiasmático (NSQ), en donde se halla el reloj central, debido a que el tratamiento fue aplicado de forma sistémica. Para abordar esta cuestión, se cuantificó la expresión al ZT 0 y 12 de genes de la maquinaria del reloj (*Clock*, *Bmal1* y *Per2*) y de un gen controlado por el reloj en la mayor parte de los tejidos (*Dbp*), en el NSQ de los grupos HF, HFN y HFN23. Interesantemente, no observamos diferencias estadísticamente significativas en la expresión de estos genes en el NSQ entre los grupos de estudio (Figura 37). Únicamente se observaron diferencias significativas en el nivel de expresión genética entre el ZT 0 y ZT 12 (Figura 37), como era de esperarse por la naturaleza circadiana de estos genes.

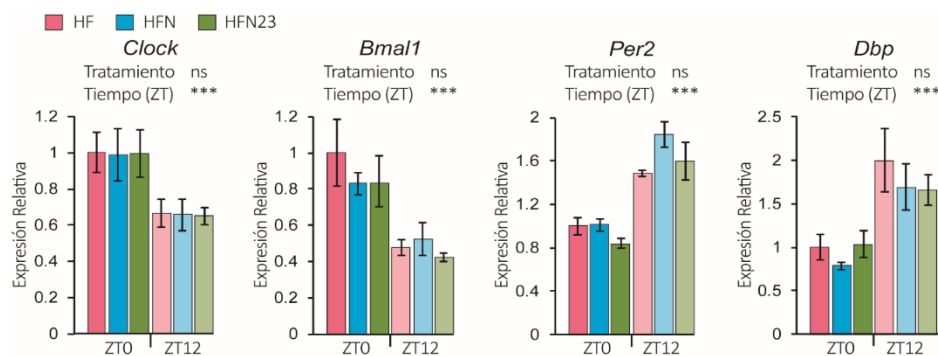


Figura 37. El suministro de NAD⁺ al ZT 23 no reorganiza la expresión genética de los componentes del reloj o de los genes controlados por el reloj.

Expresión relativa de *Clock*, *Bmal1*, *Per2* y *Dbp* a los ZT 0 y 12 (N = 3-4). El análisis estadístico corresponde a una ANOVA de dos vías con post hoc test de Tukey ($\alpha=0.05$), *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

Este análisis sugiere que la elevación antifásica en los niveles endógenos de NAD⁺, cuando este es suministrado de manera sistémica, posee la capacidad para reorganizar al reloj periférico hepático, sin alterar de manera significativa la ritmicidad del núcleo supraquiasmático, quien sigue conservando su propio ritmo circadiano.

8.14. La cronoterapia con Nicotinamida al ZT 11 y 23 induce las mismas respuestas en las pruebas de GTT, ITT y la reprogramación del reloj circadiano que se observan con el suministro de NAD⁺

La Nicotinamida (NAM) es un metabolito intermediario en la ruta de síntesis de la Nicotinamida adenin dinucleótido (Figura 8) que ha sido utilizado exitosamente para inducir un aumento en los niveles de NAD⁺ para promover mejoras fisiológicas en trastornos relacionados al síndrome metabólico [191, 192, 273-275]. Puesto que todo nuestro estudio se basó en el uso del NAD⁺, no queda claro si los efectos son debidos al uso específico de este fármaco o son extrapolables a otros tratamientos con precursores de NAD⁺, generalmente más utilizados en la literatura y ensayos clínicos. Con el propósito de dilucidar esta cuestión, se trataron dos grupos de animales con 200 mg/kg de peso de Nicotinamida vía intraperitoneal, a partir de la semana 8 de alimentación con dieta alta en grasa, siguiendo por tanto un paradigma similar a lo realizado con el NAD⁺. El tratamiento en los ratones obesos se continuó hasta la semana 12, igual a lo realizado para la terapia con NAD⁺. Igualmente, un grupo de animales fue suministrado con NAM al ZT 11 (NAM11) y otro al ZT 23 (NAM23).

Al finalizar el estudio, el grupo de animales suministrado con Nicotinamida al ZT11 mostró un porcentaje de cambio de peso negativo, lo que indicó una pérdida de peso estadísticamente significativa con respecto a los individuos suministrados con este metabolito al ZT23, quienes mostraron, al contrario, un aumento de masa corporal (Figura 38A).

Entre los grupos NAM11 y NAM23, no se vieron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de glucosa basal determinadas previo al suministro de NAM. Sin embargo, al finalizar los respectivos esquemas de tratamiento, el grupo suministrado al ZT 23 mostró un aumento estadísticamente significativo en los niveles de glucosa basal, en comparación con el grupo de animales obesos suministrados con Nicotinamida al ZT 11, en quienes se detuvo el aumento de la glucosa basal provocado por el suministro de una dieta alta en grasa (Figura 38B).

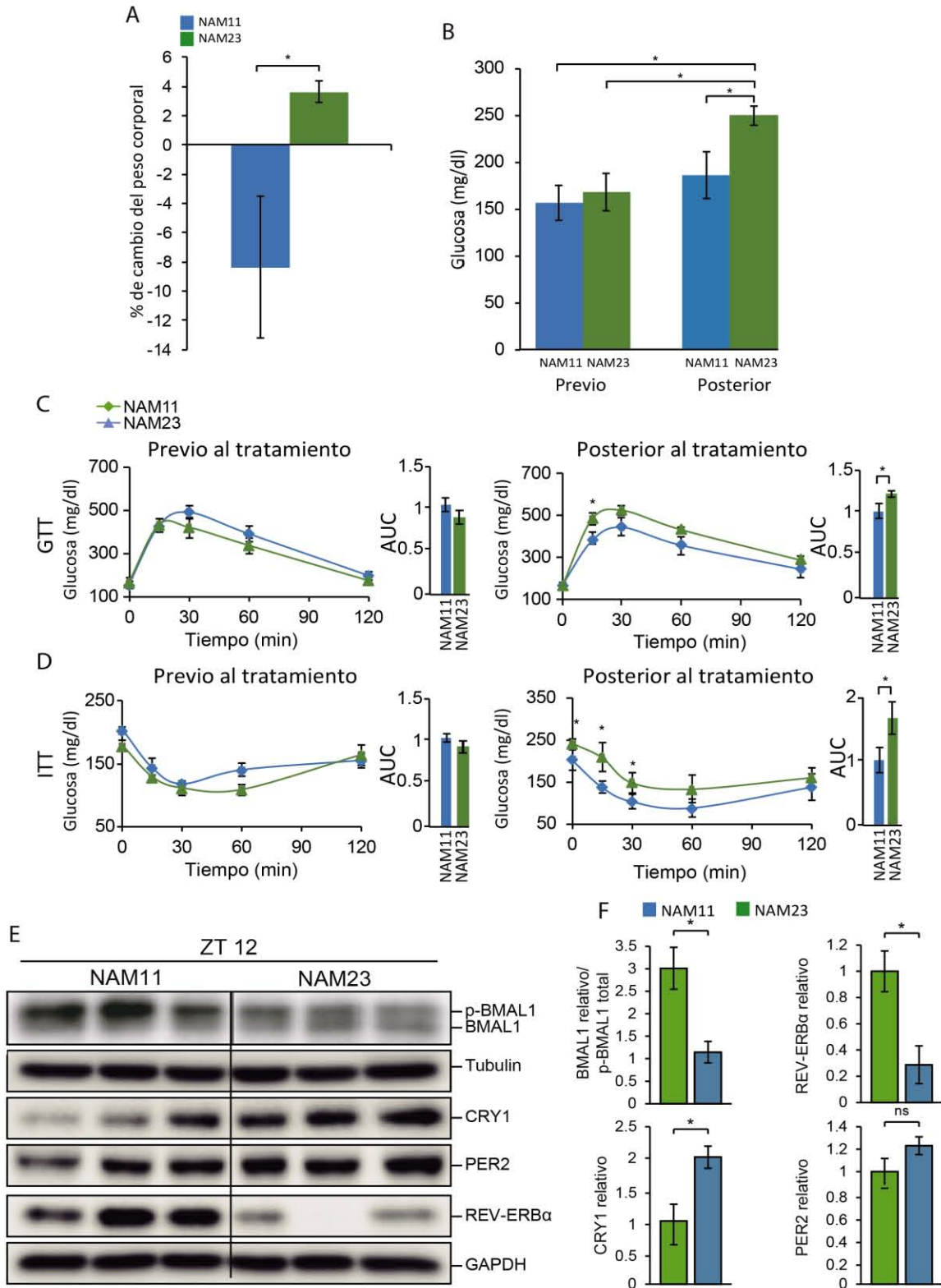


Figura 38. El suministro de Nicotinamida al ZT 11 detiene el aumento de peso y glucosa basal provocado por el suministro de una dieta rica en grasa.

(A) Porcentaje de cambio del peso corporal determinado entre la masa corporal de los individuos al inicio del suministro de la HFD y tras finalizar 12 semanas de este esquema alimenticio (N=3). (B) Niveles de glucosa basal previos al suministro de Nicotinamida y al finalizar el suministro de este metabolito en los grupos NAM11 y NAM23. (C) Prueba de tolerancia a la glucosa (GTT) y (D) prueba de tolerancia a la insulina (ITT) previos y posteriores al tratamiento con Nicotinamida al ZT 11 y ZT 23 (N = 4-3). AUC, área bajo la curva. (E) Western blot en

el que se detecta la forma fosforilada y desfosforilada de BMAL1, y totales de CRY1, PER2 y REV-ERB α al ZT 12 a partir de extractos de hígado junto a su (F) densitometría. Las muestras de cada panel fueron corridas en el mismo gel, junto con el control de carga correspondiente, colocado en la parte inferior. En A, D y F la estadística corresponde a una ANOVA de una vía con post hoc test de Sidak ($\alpha=0.05$) *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001. En B y D la estadística corresponde a una ANOVA de dos vías con post hoc test de Tukey ($\alpha=0.05$) *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

Los datos recabados en las pruebas de GTT e ITT, realizadas únicamente al ZT 4, mostraron una mejora en la tolerancia a la glucosa e insulina específicamente en el grupo de animales obesos suministrado con NAM al ZT 11 (figura 38C y 38D).

En conjunto, estos datos sugieren que los efectos de la Nicotinamida sobre el peso y el metabolismo de glucosa e insulina en los ratones obesos es dependiente del tiempo o momento del día en el que se suministra, siendo más eficaz su administración al ZT11, de manera análoga a lo observado para el NAD⁺.

Una de las observaciones más relevantes que logramos obtener en nuestros experimentos, fue el efecto del NAD⁺ como un reorganizador de la dinámica de acumulación de las proteínas del reloj. Con el propósito de determinar el suministro de Nicotinamida, precursor del NAD⁺, lograría la reorganización del reloj circadiano hepático, se analizó en el hígado la expresión proteica de la maquinaria molecular del reloj circadiano, a ZT12, en ratones tratados con NAM al ZT 11 y al ZT 23. Este estudio mostró que la proteína BMAL1 se encuentra fosforilada en los individuos NAM11, mientras que en el grupo NAM23, observamos una disminución en la fosforilación de BMAL1 (Figura 38E y 38F). La proteína CRY cuenta con un grado significativamente menor de acumulación en el grupo NAM11, en comparación con el grupo NAM23 (Figura 38E y 38F). En el caso de la proteína PER2 no se reportan diferencias estadísticamente significativas al ZT 12 entre los grupos NAM11 y NAM23 (Figura 38E y 38F), pero la proteína REV-ERB α , mostró una señal significativamente mayor en los animales obesos suministrados al ZT 11 con respecto a los suministrados al ZT 23 (Figura 38E y 38F). Estas observaciones realizadas al ZT 12, sugieren que el suministro de Nicotinamida es capaz de reorganizar las proteínas del reloj circadiano, probablemente a través de una inducción directa del aumento en las concentraciones intracelulares de NAD⁺, de manera comparable a lo observado para el tratamiento con NAD⁺.

9. Discusión

La prevención y mejora de la obesidad, son elementos que han adquirido relevancia en la sociedad moderna, y exigen urgentemente una contramedida efectiva debido al aumento de su recurrencia a nivel mundial. El aumento en los niveles de NAD^+ por medio de su suministro exógeno, ha mostrado su efectividad para menguar desordenes relacionados al SM [276-279]; sin embargo, no han sido esclarecidas las rutas metabólicas en las que se sustenta dicha mejora, ni tampoco su conexión con el sistema del reloj circadiano, por lo que la relevancia de los resultados obtenidos en este sentido, serán discutidos a continuación.

El hígado graso no alcohólico (NAFLD) es causado por la acumulación excesiva de grasa en este órgano, lo que lleva a otras afecciones graves, como la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) [280]. La progresión de hígado sano a esteatosis y NASH está relacionada con el estrés oxidante [281] reflejado en la reacción de carbonilación detectable en las proteínas hepáticas [282]. Por medio de la reacción con 2,4-dinitrofenilhidrazina, detectamos un aumento en la concentración de proteínas carboniladas en hígado a lo largo del ciclo circadiano en individuos alimentados con dieta hipercalórica y una reducción sustancial de la acumulación de proteínas carboniladas (PCO) después de otorgar tratamiento con NAD^+ al ZT 11 (Figura 21A). Estudios en la línea celular HepG2, demostraron que la mayoría de las proteínas carboniladas están asociadas con vías de NALFD [281]. Interesantemente, experimentos realizados en hígados de becerros, demuestran que la actividad y estabilidad de la Tiorredoxina, enzima que contribuye a reducir el número de PCO, aumenta cuando se agregan 0.24 mM de NAD^+ al ensayo de actividad [283]. Asociado a este hecho, observamos un descenso en la acumulación de lípidos hepáticos en ratones alimentados con HFD, posterior al suministro de 50 mg/Kg de NAD^+ (Figura 23A, B y C). Debido a ello, nuestros resultados sugieren que la cronoterapia con NAD^+ posee un efecto protector contra factores de riesgo asociados a NAFLD y NASH.

Por otro lado, la cuantificación de insulina indica una reducción de esta hormona en el suero de los individuos alimentados con dieta hipercalórica que fueron tratados con NAD^+ al ZT 11 (Figura 21). Interesantemente, los individuos a los que se les aplicó el tratamiento al ZT 23, conservaron niveles de insulina equivalentes a los ratones que no se les otorgó la cronoterapia (Figura 48); indicando que el suministro de NAD^+ una hora antes del pico de máxima biodisponibilidad detectado en hígado (ZT 12), potencializa sus efectos benéficos sobre la hiperinsulinemia provocada por el consumo de una dieta alta en grasa.

Nuestro análisis de *Gen Ontology*, sugirió que la ruta de señalización de PI3K/AKT podría estar sobre regulada como producto de la HFD (Figura 32). Tomando en cuenta dicha aproximación, determinamos los niveles proteicos de AKT fosforilada en la Ser473, su acumulación al ZT 18 en los ratones alimentados con dieta normocalórica, sugiere un aumento en la actividad de AKT durante la última fase del periodo nocturno, sincronizándose con el pico máximo de toma de alimento al ZT 18 (Figura 64), como se reporta en la literatura [284]. La fosforilación de la Ser473 en AKT es necesaria para llevar a cabo la cascada de señalización que inhibe la gluconeogénesis y activa la glucólisis y la lipogénesis en hígado como respuesta a las altas concentraciones de glucosa en suero tras la ingesta de alimento [285]. Su inhibición está relacionada con la expresión de fenotipos que pertenecen al espectro del SM [285-287]. Por ello, el decremento observado en los individuos obesos de la marca Ser473, sugiere un daño en la ruta de señalización de insulina, lo que podría explicar, en parte, el fenotipo observado en el grupo HF (Figura 43).

En nuestros experimentos, observamos que los niveles de fosforilación de la Ser473 de AKT fueron restituidos como consecuencia de la cronoterapia con NAD⁺ al ZT 11 (Figura 43), lo que puede interpretarse como una restauración de la vía de señalización de la insulina, que concuerda con la baja en sus niveles séricos (Figura 46), el aumento en la tolerancia a la glucosa y la disminución de la resistencia a la insulina (Figura 19 y 20). Adicionalmente, la restauración en la actividad de AKT podría contribuir a elevar la tasa de glucogenogénesis en el hígado de los animales tratados con NAD⁺, ya que AKT fosforila e inactiva a la glucógeno sintetasa cinasa (GSK3) en el hígado [288], por lo que la actividad de la GS podría verse restaurada durante el periodo de ingesta, contribuyendo a la baja global en los niveles de glucosa basal que se observó en el grupo HFN.

Interesantemente, AKT induce la transcripción de genes lipogénicos mediante la activación de la proteína SREBP1c [289], por lo que tras el tratamiento con NAD⁺, la lipogénesis podría estarse acoplando con la glucólisis durante el periodo de ingesta alimentaria, favoreciendo así, el almacenaje de la glucosa circulante en forma de lípidos. SREBP1c promueve la transcripción de GK, la enzima limitante de la velocidad de la glucólisis en el hígado, que estimula la lipogénesis al aumentar el flujo de glucosa a la vía de la glucólisis para la obtención de acetil-CoA, el cual es utilizado para la síntesis de lípidos [290]. Por lo que la potencial restauración en la vía de señalización de la insulina provocada por el suministro de NAD⁺, podría aumentar el flujo de glucosa al interior del hígado, disminuyendo sus niveles séricos (Figura 43) y estimulando el metabolismo hepático de lipogénesis, promoviendo a su vez, la exportación de lípidos hacia otros órganos para su utilización como fuente de energía o almacenamiento dentro del tejido adiposo. Este mecanismo

ayudaría a explicar la reducción de vesículas lipídicas en los grupos suministrados con NAD⁺ (Figuras 23A, B y C y 49).

Experimentos realizados en hígado de ratas y ratones alimentados con HFD, reportan una disminución en la actividad de AMPK [291, 292]. Este hecho concuerda con nuestros resultados, en los que observamos una baja significativa en los niveles globales de fosforilación del residuo Thr172 de AMPK en los hígados del grupo HF. Interesantemente, la cronoterapia de NAD⁺ produjo un aumento en la fosforilación de la Thr172, lo que *a priori* indicaría una restauración en la actividad de AMPK, contribuyendo así al balance del metabolismo energético.

Una opción que resulta tentadora en nuestro modelo para explicar la inactivación de AMPK a causa de la HFD, es su vínculo con el NAD⁺ a través de SIRT1. En el hígado, LKB1 es el principal regulador de AMPK, ya que es responsable de la fosforilación del residuo Thr172 de la subunidad α [293]. Interesantemente, factores activadores de SIRT1, como el aumento en la disponibilidad de su cofactor NAD⁺, conducen a la desacetilación de la Lys48 en LKB1. Esto a su vez, mejora la unión de LKB1 a STRAD y MO25, aumentando su actividad cinasa permitiendo la fosforilación y activación de AMPK [294]. De este modo los bajos niveles de NAD⁺, en ratones alimentados con dieta rica en grasa, observados durante el periodo de alimentación en nuestras cuantificaciones por HPLC (Figura 18), inducirían un desacoplamiento de estos eventos, lo que resultaría en una baja en la fosforilación de la Thr172 de AMPK. Por otro lado, el suministro exógeno de NAD⁺ al ZT 11, podría favorecer el acoplamiento temporal de la actividad de SIRT1, la desacetilación de LKB1 y el aumento en la actividad de AMPK.

Independientemente de la(s) causa (s) en la disminución de la fosforilación de la Thr172 observadas en el grupo HF, quedan preguntas importantes a tratar, por ejemplo, ¿Qué papel, si lo hay, juega la disminución de la actividad de AMPK en la resistencia a la insulina observada en el grupo HF? Algunos fármacos de sensibilización a la insulina, como la metformina y las tiazolidinedionas, funcionan, en parte, a través de la activación de la AMPK [295, 296]. Además, existe un vínculo bien establecido entre la sensibilidad a la insulina y AMPK en estudios que demuestran que su actividad está disminuida en tejidos de animales diabéticos y no diabéticos con IR [292, 297]. Estos hechos estarían de acuerdo a lo observado en los grupos HF y HFN, en donde la resistencia a la insulina tendría como consecuencia una baja en los niveles de actividad de AMPK reflejada en la pérdida de fosforilación de la Thr172, mientras que la restauración de la sensibilidad a la insulina inducida con el tratamiento de NAD⁺ al ZT 11, contribuiría al restablecimiento en la actividad de AMPK.

Por otro lado, el aumento en la actividad de AMPK incrementa el flujo de lípidos al interior de la mitocondria, a través de la fosforilación de las Acetil-CoA carboxilasas 1/2 (ACC1 y ACC2) en la Ser79 y 221 [298]. AMPK también disminuye la lipogénesis mediante la regulación negativa de SREBP por medio de su fosforilación en Ser372 [299]. En nuestros experimentos, reportamos una baja en la acumulación de lípidos hepáticos como producto del suministro con NAD⁺ (Figuras 23A, B y C y 49), las cuales podrían verse influenciadas por la restitución en la actividad de AMPK sobre las vías antes expuestas. Dada la posición central que desempeña AMPK en el balance de energía de todo el cuerpo, cabe recalcar la relación entre el aumento en su actividad y el NAD⁺, ya que puede representar un vínculo no reconocido previamente en la obesidad y sus patologías asociadas que se evidencia en nuestro modelo cronoterapéutico.

La dina de rapamicina en células de mamífero (mTOR) es una serina/treonina cinasa, que contribuye en procesos tales como el control del inicio de la transcripción, el tráfico membranal, la formación de ribosomas y la respuesta inmune, así como la proliferación y muerte celular [300]. Su actividad posee un componente circadiano [301], el cual esta evidenciado en la acumulación de mTOR a lo largo del día (Fig. 22A). En particular su hiperfosforilación junto con el análisis de *Gen Ontology*, sugieren que la actividad del complejo mTORC1 disminuye como efecto del tratamiento con NAD⁺, lo cual se refleja en la hipofosforilación de sus sustratos y en la baja en la actividad de su agonista p90RSK (Figura 40A y B). Tomando en cuenta reportes recientes que indican que la sobrerregulación de mTOR [302, 303], p90RSK, E4BP1 y S6K está asociada con el desarrollo de esteatohepatitis no alcohólica y en la activación de procesos inflamatorios, tanto en humanos como en ratones [304-307], sugerimos la disminución en la vía de mTORC1 provocada por el suministro de NAD⁺, como uno de los efectos coadyuvantes en el desarrollo de estas patologías.

Está bien establecido que los individuos sometidos a una dieta alta en grasa, aumentan la transcripción del gen que codifica para la proteína PPAR γ [308-310], cuya participación es indispensable en la diferenciación adipogénica. Normalmente se expresa en niveles muy bajos en el hígado; sin embargo, en modelos animales con IR, la expresión de PPAR γ aumenta notablemente [40, 41]; mientras que su eliminación atenúa notablemente la esteatosis hepática [311]. Cabe resaltar que se desconoce el papel que juega la expresión diferencial de PPAR γ 1 y PPAR γ 2 en animales suministrados con una dieta rica en grasa. En nuestros experimentos, observamos un notable aumento en la expresión proteica de PPAR γ 2, no así con PPAR γ 1 en el grupo HF, mientras que reportamos una baja de sus niveles como efecto del tratamiento con NAD⁺, lo que podría explicar la reducción de lípidos en el hígado que observamos (Figura 23).

En cuanto a la comparación entre nuestros esquemas de suministro con NAD⁺, al ZT 11 y ZT 23, ambos lograron reducir la acumulación de lípidos en el hígado producido por el consumo de HFD. Interesantemente, la acrofase de los reguladores lipogénicos PPAR γ y CEBP α [312] tienen una diferencia de aproximadamente 12 h (Figura 23 y 50). Por otro lado, la disminución de ambas proteínas se observó en mayor medida cuando los ratones fueron suministrados al ZT 11. Esto indicaría que los efectos benéficos del NAD⁺ sobre la esteatosis hepática son dependientes de su tiempo de administración.

En nuestros experimentos, observamos una disminución global de mtDNA en el grupo alimentado con dieta rica en grasa, y la restauración de este parámetro tras el suministro cronoterapéutico de NAD⁺. Este evento puede estar relacionado con la disminución en una forma específica de autofagia conocida como mitofagia [313]. En ratones suministrados con HFD, se observan mitocondrias tubulares, con baja actividad respiratoria y con población disminuida, que correlaciona con la pobre biogénesis mitocondrial. Interesantemente en estos individuos, la mitofagia también se encuentra disminuida [314]. AMPK aumenta la mitofagia a través de la fosforilación directa de ULK1 y la inhibición del complejo mTORC1 [315]. Por lo tanto, las reducciones en la actividad de AMPK y el aumento en la actividad de mTOR observadas en el grupo HF, podrían disminuir la mitofagia, comprometiendo la función mitocondrial del hígado. Se sabe que la disfunción mitocondrial en los hepatocitos causa una depresión en la oxidación de los ácidos grasos, promoviendo NAFLD [108]. Además se sabe que la autofagia está disminuida en el hígado de ratones alimentados con dieta rica en grasa [19].

Acorde con los reportes en la literatura, en nuestros experimentos observamos un aumento en la fosforilación de ULK1 (Ser555) al ZT 12, acompañada de una disminución en la actividad de mTOR y un aumento en la actividad de AMPK en el grupo suministrado con NAD⁺. Estos eventos podrían provocar el aumento en los niveles globales de mtDNA mediante el mecanismo antes expuesto.

Con nuestro esquema de suministro intraperitoneal de NAD⁺ al ZT 11, logramos observar una sobrerregulación en la transcripción de mensajeros que participan en la oxidación de ácidos grasos (Figura 52), que no fue observado cuando se suministró al ZT 23 (Figuras 53 a 55). Para inferir la probable causa de este comportamiento, debe tomarse en cuenta que el suministro de NAD⁺ al ZT 11 aumentó su biodisponibilidad intracelular durante el periodo de ingesta calórica, potenciando su utilización como coenzima en el catabolismo de lípidos, ya que este ocurre en los ratones a partir del ZT 12 [316]. En este sentido, durante dicho periodo del día se ha observado un

aumento del acetil-CoA, que surge como producto de la oxidación de ácidos grasos[317]. Interesantemente en ratones alimentados con dieta alta en grasa, la producción de acetil-CoA en el hígado se sobreestimula tras la ingesta [111], como un paliativo para disminuir la concentración de lípidos hepáticos [318]. Sin embargo, la baja en la biodisponibilidad de NAD^+ que produce la HFD, y que observamos en los individuos del grupo HF (Figura 18A), afecta el funcionamiento de las enzimas que dependen de NAD^+ en la β -oxidación (hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, LCHAD), frenando el catabolismo de lípidos hasta donde las bajas concentraciones de NAD^+ existentes en este contexto de la HFD lo permiten, resultando en su acumulación hepática. En este sentido, la falta de sincronización entre la β -oxidación y la biodisponibilidad del NAD^+ en el grupo suministrado al ZT 23, produciría la exportación de ácidos grasos TG al resto del organismos, provocando que su aumento en suero, como se observó en el grupo HFN23 (Figura 48A y B).

En este sentido, el potencial aumento de acetil-CoA provocado por el suministro de NAD^+ al ZT 11, desencadenaría la producción de AMP en el hígado [319], dando como resultado la elevación en la relación AMP/ATP y la posterior fosforilación de AMPK [320, 321]; lo que a su vez provocaría la subregulación de genes lipolíticos, suprimiendo la acumulación de grasa corporal [322]. En apoyo de este mecanismo, informamos que el suministro con NAD^+ al ZT 11 aumenta la fosforilación de la Thr 172 en AMPK al ZT 12, conjunta a la disminución global en la señal de PPAR γ y CEBP α .

En cuanto a los nexos que existen entre el NAD^+ y sus efectos sobre algunos sensores metabólicos en nuestro modelo experimental, debemos tomar en cuenta la actividad de las Sirtuinas como mediadoras de ese dialogo. La depleción de Sirt1 en hígado, reduce los niveles de AKT-S473 [323], y la inhibición de Sirt2 impide su activación, sin embargo, la sobreexpresión de Sirt1 y Sirt2 restituye la sensibilidad a la insulina mediada por AKT [324]. A su vez, en hígado SIRT1 regula la actividad de PPAR γ por medio de su desacetilación, su depleción promueve la activación de fibrosis mediante la desregulación el eje HDAC4-SIRT1-PPAR γ [325]. Además se sabe que en tejido hepático, la dinámica de desacetilación de proteínas mitocondriales como LCAD y MCAD por parte de SIRT3, proporciona un mecanismo para la regulación en la oxidación de ácidos grasos, observándose que los ratones que carecen de SIRT3 exhiben características de trastornos de oxidación de ácidos grasos durante el ayuno y niveles reducidos de ATP [326].

Sin embargo, pese a los cambios metabólicos que producidos por el NAD^+ mediante la regulación en la actividad de las Sirtuinas, es importante resaltar el impacto que este metabolito produce por sí mismo. El NAD^+ acepta equivalentes de hidruro de enzimas limitantes que participan

en la glucólisis, el ciclo de Krebs y la beta-oxidación para formar NADH, que proporciona equivalentes reductores a la cadena de transporte de electrones mitocondrial para impulsar la fosforilación oxidativa y la producción de ATP, por lo que el flujo de estas vías depende de la biodisponibilidad del NAD⁺ [327-329]. Estas cuatro rutas vinculadas deben funcionar al máximo para optimizar la relación NAD⁺/NADH, ya que esta proporción, más que la cantidad absoluta de NAD⁺, es la que parece ser crítica para la función celular y mitocondrial.

También es importante mencionar que algunos metabolitos intermediarios en la síntesis de NAD⁺ poseen efectos farmacológicos bien documentados, los cuales podrían acentuarse al aumentar su flujo como un efecto secundario del aumento exógeno en los niveles de NAD⁺. La Nicotinamida (NAM), que es producida por las enzimas consumidoras de NAD⁺ (Sirtuinas, PARPs y CD38), suprime la respuesta inmune al reducir la expresión del antígeno ICAM-1 y HLA-DR inducido por IFN γ [330] y la inhibición del *major histocompatibility complex (MHC) class II expression* [331], por otro lado, la niacina que en mamíferos se forma a partir de la NAM por acción de la desamidasa de la microflora intestinal o del hígado [332], muestra que en hepatocitos, inhibe de forma directa y no competitiva a DGAT2 una de las enzimas que finaliza la síntesis de TG, lo que da como resultado una disminución de la síntesis de triglicéridos y secreción de lipoproteínas aterogénicas hepáticas [333, 334].

En cuanto al efecto que tuvo el suministro de NAD⁺ sobre el reloj circadiano, la dinámica de fosforilación de BMAL1 es dependiente del tiempo en el que se aplica la cronoterapia (Figura 52), la fosforilación de BMAL1 en los animales suministrados con NAD⁺ al ZT 23, es opuesta a cuando el suministro se otorga al ZT 11. Se sabe que la desacetilasa de histonas SIRT1, cuya actividad es dependiente de NAD⁺, regula la actividad del reloj central, en particular a BMAL1. SIRT1 se une a CLOCK-BMAL1 de manera circadiana y promueve la desacetilación de BMAL1. Dada su dependencia de NAD⁺, es probable que SIRT1 conecte el metabolismo celular a los circuitos del reloj circadiano y que este mecanismo influya en el control postranscripcional de BMAL1 [335]. Interesantemente, la dinámica de acumulación de las proteínas CRY1, PER2 y REV-ERB α posee un comportamiento similar (Figura 57) que podría estar influenciado por la reprogramación en la transcripción de los genes que codifican a las proteínas del reloj (Figura 58), el cual podría ser alterado por el mecanismo antes descrito en el que participa SIRT1. Acorde con ello, nuestros resultados demuestran la inversión de fase en los genes *Dbp*, *Tef*, *Noct* y *Nfil3* como efecto de invertir la biodisponibilidad del NAD⁺ al ZT 23. De esta manera, proporcionamos resultados novedosos que sugieren que la biodisponibilidad de NAD⁺ en un momento particular del día, posee la capacidad de

reconfigurar la maquinaria del reloj y alterar la fase en la que aparecen los transcritos dependientes de este sistema. Interesante mente esta reprogramación solo parece afectar al reloj periférico del hígado y no posee la capacidad de reorganizar el reloj central situado en el SCN (Figura 37).

Debido a que nuestros datos muestran que en nuestro modelo de obesidad la cronoterapia con NAD⁺ es más efectiva que su suministro al ZT 23, creemos que este esquema de administración posee un potencial terapéutico, ya que podría aumentar los efectos benéficos que han sido observados en otros modelos de suministro de NAD⁺ *ad libitum*, como mejoras en la fisiología hepática [185, 275], renal [274, 336], musculo esquelética [337, 338], cardiaca [339, 340], vascular [273], neural [198, 341], así como en el tratamiento de trastornos del envejecimiento [342, 343] inmunológicos [344, 345] y cáncer [346]. Aunado a ello, consideramos que la capacidad que mostró el NAD⁺ como reorganizador de la maquinaria del reloj, también puede ser de gran interés en el estudio del reloj circadiano hepático, y que sería muy interesante ampliarlo al resto de los órganos y tejidos.

10. Conclusiones

- El suministro exógeno de NAD⁺ al final del periodo diurno restituye el perfil de oscilación circadiana con un pico máximo de concentración al ZT 12.
- EL suministro de NAD⁺ al ZT 11 induce una reducción del peso corporal en ratones alimentados con dieta rica en grasa, sin que se reduzca la ingesta calórica.
- La hiperinsulinemia se revierte con el suministro de NAD⁺ al ZT 11.
- La hiperleptinemia se reduce cuando se aplica la cronoterapia con NAD⁺ al ZT 11.
- El suministro exógeno de NAD⁺, reduce considerablemente el riesgo de desarrollar esteatohepatitis provocada por el consumo de una dieta alta en grasas.
- La cronoterapia con NAD⁺ al ZT 11 reduce los niveles de triglicéridos séricos.
- Riesgos asociados al desarrollo de síndrome metabólico como el estrés oxidante y la reducción en el número de mitocondrias en los hepatocitos, se aminoran a consecuencia del suministro de NAD⁺ al ZT 11.
- Existe una reprogramación en la expresión de transcritos dependientes del ZT en los individuos tratados con NAD⁺ al ZT 11 que no altera la dinámica de expresión de los genes que codifican el reloj circadiano hepático.
- La cronoterapia con NAD⁺ suministrada al ZT 11 restaura la expresión de genes sobreexpresados a consecuencia de la ingesta de una dieta alta en grasa.
- La cronoterapia con NAD⁺ suministrada al ZT 11 induce la sobreexpresión de programas transcripcionales que protegen contra los efectos negativos del consumo de una dieta alta en grasa.
- La cronoterapia con NAD⁺ restituye la actividad y concentración de sensores metabólicos como AKT, AMPK y mTOR (Figura 39).
- El suministro de NAD⁺ al ZT 23 no es igual de efectivo que la cronoterapia para mejorar el ITT y el GTT, la expresión de programas génicos que potencian la lipólisis hepática y la activación de sensores moleculares del metabolismo energético (Figura 39).
- El aumento de la concentración de NAD⁺ en un momento específico del día, funciona como un señalizador endógeno capaz de reprogramar el reloj circadiano (Figura 39).
- El esquema de administración cronoterapéutica proporciona una nueva estrategia para el tratamiento de patologías que responden al aumento endógeno de los niveles de NAD⁺.

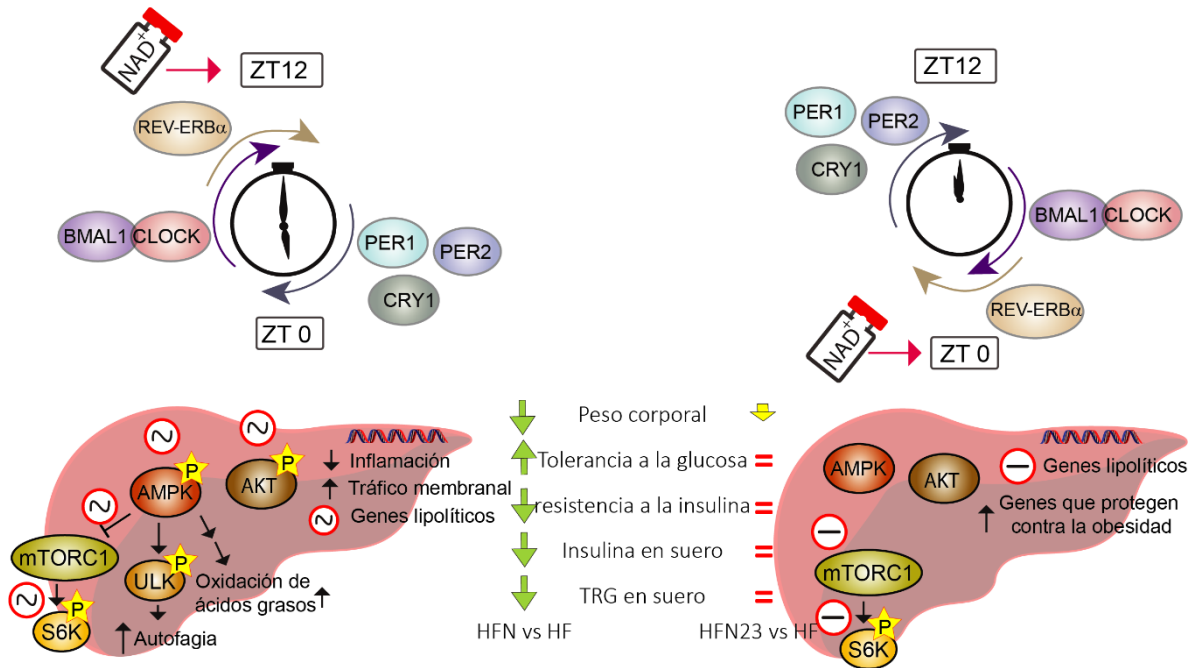


Figura 39. El tiempo de administración de NAD⁺, determina su eficacia para revertir la fisiopatología inducida por HFD y la configuración temporal del reloj circadiano

El aumento de los niveles de NAD⁺ no es el único factor que mejora la fisiopatología provocada por el consumo de un HFD, su biodisponibilidad en un momento específico del día, determina la eficiencia del suministro de NAD⁺, para la mejora en aspectos fisiológicos como el peso corporal, tolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina, niveles séricos de insulina y niveles séricos de TG. En el hígado, el aumento de las concentraciones de NAD⁺ al ZT 12, regula de manera circadiana, la transcripción de genes lipolíticos y la actividad de sensores nutricionales como AMPK, AKT y mTOR, dando lugar al surgimiento de un programa anti-obesidad que incluye aumento de la autofagia, oxidación de ácidos grasos, tráfico de membranas y disminución de la inflamación. El NAD⁺ suministrado en antifase de su biodisponibilidad natural, tienen efectos fisiológicos limitados contra la obesidad, potencian un grupo de genes anti-obesidad y reprograman el reloj circadiano. El símbolo \odot indica oscilación circadiana, mientras que el símbolo \ominus indica la ausencia de oscilación circadiana.

11. Perspectivas

- Determinar el perfil circadiano de NAD⁺ en órganos y tejidos que albergan relojes periféricos.
- Caracterizar la respuesta transcripcional y metabólica en otros órganos y tejidos dependiente de la biodisponibilidad de NAD⁺.
- Ampliar el tiempo de tratamiento con NAD⁺ con el objetivo de incrementar la protección contra el síndrome metabólico en individuos alimentados con dieta alta en grasa.
- Descifrar el mecanismo molecular mediante el cual el NAD⁺ induce una reprogramación transcripcional.
- Determinar el mecanismo molecular que permite la reprogramación del reloj molecular cuando se incrementan los niveles de NAD⁺ en antifase.
- Evaluar la efectividad de la cronoterapia en los tratamientos retardadores del envejecimiento basados en NAD⁺.
- Evaluar la efectividad del tratamiento al ZT 11 con Nicotinamida vs NAD⁺ en la reducción del riesgo para desarrollar esteatohepatitis asociada al consumo de una dieta rica en grasas.
- Determinar el efecto de suministrar NAD⁺ en antifase, al inicio del periodo de descanso, en la dinámica de acumulación de las proteínas que controlan el reloj en el núcleo supraquiasmático y en relojes periféricos.
- Escalar el esquema de cronoterapia con NAD⁺ al área clínica.

Bibliografía

1. Torday, J.S., *Homeostasis as the Mechanism of Evolution*. Biology (Basel), 2015. **4**(3): p. 573-90.
2. Albrecht, U., *Invited review: regulation of mammalian circadian clock genes*. J Appl Physiol (1985), 2002. **92**(3): p. 1348-55.
3. Agostinelli, F., et al., *What time is it? Deep learning approaches for circadian rhythms*. Bioinformatics, 2016. **32**(12): p. i8-i17.
4. Rawashdeh, O., et al., *Learned motivation drives circadian physiology in the absence of the master circadian clock*. FASEB J, 2017. **31**(1): p. 388-399.
5. Gu, C., et al., *Impact of dispersed coupling strength on the free running periods of circadian rhythms*. Phys Rev E, 2016. **93**(3): p. 032414.
6. Paulose, J.K., et al., *Human Gut Bacteria Are Sensitive to Melatonin and Express Endogenous Circadian Rhythmicity*. PLoS One, 2016. **11**(1): p. e0146643.
7. Duffy, J.F. and K.P. Wright, Jr., *Entrainment of the human circadian system by light*. J Biol Rhythms, 2005. **20**(4): p. 326-38.
8. Czeisler, C.A. and J.J. Gooley, *Sleep and circadian rhythms in humans*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2007. **72**: p. 579-97.
9. Lincoln, G.A., H. Andersson, and A. Loudon, *Clock genes in calendar cells as the basis of annual timekeeping in mammals--a unifying hypothesis*. J Endocrinol, 2003. **179**(1): p. 1-13.
10. Gooley, J.J. and E.C. Chua, *Diurnal regulation of lipid metabolism and applications of circadian lipidomics*. J Genet Genomics, 2014. **41**(5): p. 231-50.
11. Peng, L., et al., *SIRT1 deacetylates the DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein and alters its activities*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(23): p. 4720-34.
12. Ancona, D.G. and C.L. Chong, *Timing Is Everything - Entrainment and Performance in Organization Theory*. Academy of Management - Best Papers Proceedings 1992, 1992: p. 166-169.
13. Harrison, E.M. and M.R. Gorman, *Changing the waveform of circadian rhythms: considerations for shift-work*. Front Neurol, 2012. **3**: p. 72.
14. Hastings, M.H. and B.K. Follett, *Toward a molecular biological calendar?* J Biol Rhythms, 2001. **16**(4): p. 424-30.
15. Kauranen, H., et al., *Circadian clock of Drosophila montana is adapted to high variation in summer day lengths and temperatures prevailing at high latitudes*. J Insect Physiol, 2016. **89**: p. 9-18.
16. Brown, L.A., et al., *Telling the Time with a Broken Clock: Quantifying Circadian Disruption in Animal Models*. Biology (Basel), 2019. **8**(1).
17. Bandin, C., et al., *Meal timing affects glucose tolerance, substrate oxidation and circadian-related variables: A randomized, crossover trial*. Int J Obes (Lond), 2015. **39**(5): p. 828-33.
18. Schoeller, D.A., et al., *Entrainment of the diurnal rhythm of plasma leptin to meal timing*. J Clin Invest, 1997. **100**(7): p. 1882-7.
19. Wang, M.E., et al., *Increasing Dietary Medium-Chain Fatty Acid Ratio Mitigates High-fat Diet-Induced Non-Alcoholic Steatohepatitis by Regulating Autophagy*. Scientific Reports, 2017. **7**.
20. Wehrens, S.M.T., et al., *Meal Timing Regulates the Human Circadian System*. Curr Biol, 2017. **27**(12): p. 1768-1775 e3.

21. Mei, Y., et al., *Altered expressions of memory genes in food-entrained circadian rhythm*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2018. **50**(10): p. 1068-1071.
22. Silver, R., et al., *Food anticipation depends on oscillators and memories in both body and brain*. Physiology & Behavior, 2011. **104**(4): p. 562-571.
23. Stokkan, K.A., et al., *Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding*. Science, 2001. **291**(5503): p. 490-3.
24. Sato, S., et al., *Circadian Reprogramming in the Liver Identifies Metabolic Pathways of Aging*. Cell, 2017. **170**(4): p. 664-677 e11.
25. !!! INVALID CITATION !!!
26. Power, A., et al., *Rhythm-promoting actions of exercise in mice with deficient neuropeptide signaling*. J Biol Rhythms, 2010. **25**(4): p. 235-46.
27. Gabriel, B.M. and J.R. Zierath, *The Limits of Exercise Physiology: From Performance to Health*. Cell Metab, 2017. **25**(5): p. 1000-1011.
28. Gabriel, B.M. and J.R. Zierath, *Circadian rhythms and exercise - re-setting the clock in metabolic disease*. Nature Reviews Endocrinology, 2019. **15**(4): p. 197-206.
29. Peek, C.B., et al., *Circadian Clock Interaction with HIF1 alpha Mediates Oxygenic Metabolism and Anaerobic Glycolysis in Skeletal Muscle*. Cell Metabolism, 2017. **25**(1): p. 86-92.
30. Wolff, G. and K.A. Esser, *Scheduled exercise phase shifts the circadian clock in skeletal muscle*. Med Sci Sports Exerc, 2012. **44**(9): p. 1663-70.
31. Ehlers, C.L., E. Frank, and D.J. Kupfer, *Social zeitgebers and biological rhythms. A unified approach to understanding the etiology of depression*. Arch Gen Psychiatry, 1988. **45**(10): p. 948-52.
32. Abdullah, S., et al., *Automatic detection of social rhythms in bipolar disorder*. J Am Med Inform Assoc, 2016. **23**(3): p. 538-43.
33. Ban, T.A., *Affective disorders: biological aspects*. Acta Neurol (Napoli), 1985. **7**(2): p. 129-34.
34. Hirota, T. and Y. Fukada, *Resetting mechanism of central and peripheral circadian clocks in mammals*. Zoolog Sci, 2004. **21**(4): p. 359-68.
35. Klein, D.C. and J.L. Weller, *Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase*. Science, 1970. **169**(3950): p. 1093-5.
36. Akashi, M. and E. Nishida, *Involvement of the MAP kinase cascade in resetting of the mammalian circadian clock*. Genes Dev, 2000. **14**(6): p. 645-9.
37. Motzkus, D., et al., *The human PER1 gene is transcriptionally regulated by multiple signaling pathways*. FEBS Lett, 2000. **486**(3): p. 315-9.
38. Provencio, I., et al., *A novel human opsin in the inner retina*. J Neurosci, 2000. **20**(2): p. 600-5.
39. Ruby, N.F., et al., *Role of melanopsin in circadian responses to light*. Science, 2002. **298**(5601): p. 2211-3.
40. Mohawk, J.A., C.B. Green, and J.S. Takahashi, *Central and peripheral circadian clocks in mammals*. Annu Rev Neurosci, 2012. **35**: p. 445-62.
41. Panda, S., et al., *Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice*. Science, 2003. **301**(5632): p. 525-527.
42. Ishida, A., et al., *Light activates the adrenal gland: timing of gene expression and glucocorticoid release*. Cell Metab, 2005. **2**(5): p. 297-307.
43. Balsalobre, A., F. Damiola, and U. Schibler, *A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells*. Cell, 1998. **93**(6): p. 929-37.

44. Yamazaki, S., et al., *Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats*. Science, 2000. **288**(5466): p. 682-685.
45. Damiola, F., et al., *Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus*. Genes Dev, 2000. **14**(23): p. 2950-61.
46. Rhoads, D.B., et al., *Circadian periodicity of intestinal Na⁺/glucose cotransporter 1 mRNA levels is transcriptionally regulated*. J Biol Chem, 1998. **273**(16): p. 9510-6.
47. Perelis, M., et al., *Pancreatic beta cell enhancers regulate rhythmic transcription of genes controlling insulin secretion*. Science, 2015. **350**(6261): p. aac4250.
48. Huang, N., et al., *Crystal structure of the heterodimeric CLOCK:BMAL1 transcriptional activator complex*. Science, 2012. **337**(6091): p. 189-94.
49. Bozek, K., et al., *Regulation of clock-controlled genes in mammals*. PLoS One, 2009. **4**(3): p. e4882.
50. Lee, C., et al., *Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock*. Cell, 2001. **107**(7): p. 855-67.
51. Gallego, M. and D.M. Virshup, *Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(2): p. 139-48.
52. Gachon, F., et al., *The mammalian circadian timing system: from gene expression to physiology*. Chromosoma, 2004. **113**(3): p. 103-12.
53. Preussner, M. and F. Heyd, *Post-transcriptional control of the mammalian circadian clock: implications for health and disease*. Pflugers Arch, 2016. **468**(6): p. 983-91.
54. Preitner, N., et al., *The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator*. Cell, 2002. **110**(2): p. 251-60.
55. Ueda, H.R., et al., *System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks*. Nat Genet, 2005. **37**(2): p. 187-92.
56. Hirano, A., Y.H. Fu, and L.J. Ptacek, *The intricate dance of post-translational modifications in the rhythm of life*. Nat Struct Mol Biol, 2016. **23**(12): p. 1053-1060.
57. Vanselow, K., et al., *Differential effects of PER2 phosphorylation: molecular basis for the human familial advanced sleep phase syndrome (FASPS)*. Genes Dev, 2006. **20**(19): p. 2660-72.
58. Masuda, S., et al., *Mutation of a PER2 phosphodegron perturbs the circadian phosphoswitch*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020. **117**(20): p. 10888-10896.
59. Lee, H., et al., *Essential roles of CK1 δ and CK1 ϵ in the mammalian circadian clock*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(50): p. 21359-64.
60. Tsuchiya, Y., et al., *Involvement of the protein kinase CK2 in the regulation of mammalian circadian rhythms*. Sci Signal, 2009. **2**(73): p. ra26.
61. Vitaterna, M.H., et al., *Mutagenesis and Mapping of a Mouse Gene Clock, Essential for Circadian Behavior*. Science, 1994. **264**(5159): p. 719-725.
62. Yoshitane, H., et al., *Roles of CLOCK phosphorylation in suppression of E-box-dependent transcription*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(13): p. 3675-86.
63. Shirogane, T., et al., *SCF β -TRCP controls clock-dependent transcription via casein kinase 1-dependent degradation of the mammalian period-1 (Per1) protein*. J Biol Chem, 2005. **280**(29): p. 26863-72.
64. Seo, J. and K.J. Lee, *Post-translational modifications and their biological functions: Proteomic analysis and systematic approaches*. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2004. **37**(1): p. 35-44.

65. Lee, J., et al., *Dual modification of BMAL1 by SUMO2/3 and ubiquitin promotes circadian activation of the CLOCK/BMAL1 complex*. *Molecular and Cellular Biology*, 2008. **28**(19): p. 6056-6065.
66. Li, S., et al., *CLOCK is a substrate of SUMO and sumoylation of CLOCK upregulates the transcriptional activity of estrogen receptor-alpha*. *Oncogene*, 2013. **32**(41): p. 4883-4891.
67. Venne, A.S., L. Kollipara, and R.P. Zahedi, *The next level of complexity: crosstalk of posttranslational modifications*. *Proteomics*, 2014. **14**(4-5): p. 513-24.
68. Asher, G., et al., *SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation*. *Cell*, 2008. **134**(2): p. 317-328.
69. Hirayama, J., et al., *CLOCK-mediated acetylation of BMAL1 controls circadian function*. *Nature*, 2007. **450**(7172): p. 1086-U13.
70. Hughes, M.E., J.B. Hogenesch, and K. Kornacker, *JTK_CYCLE: an efficient nonparametric algorithm for detecting rhythmic components in genome-scale data sets*. *J Biol Rhythms*, 2010. **25**(5): p. 372-80.
71. Zhang, R., et al., *A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(45): p. 16219-24.
72. Reinke, H. and G. Asher, *Circadian Clock Control of Liver Metabolic Functions*. *Gastroenterology*, 2016. **150**(3): p. 574-80.
73. McCarthy, J.J., et al., *Identification of the circadian transcriptome in adult mouse skeletal muscle*. *Physiol Genomics*, 2007. **31**(1): p. 86-95.
74. Rakshit, K., et al., *Circadian variation of the pancreatic islet transcriptome*. *Physiol Genomics*, 2016. **48**(9): p. 677-87.
75. Greenwell, B.J., et al., *Rhythmic Food Intake Drives Rhythmic Gene Expression More Potently than the Hepatic Circadian Clock in Mice*. *Cell Rep*, 2019. **27**(3): p. 649-657 e5.
76. Izquierdo-Palomares, J.M., et al., *Chronotherapy versus conventional statins therapy for the treatment of hyperlipidaemia*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2016. **11**: p. CD009462.
77. Etchegaray, J.P., et al., *Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock*. *Nature*, 2003. **421**(6919): p. 177-82.
78. Doi, M., J. Hirayama, and P. Sassone-Corsi, *Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase*. *Cell*, 2006. **125**(3): p. 497-508.
79. Yoshino, J. and S. Imai, *Accurate measurement of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD(+)) with high-performance liquid chromatography*. *Methods Mol Biol*, 2013. **1077**: p. 203-15.
80. Aguilar-Arnal, L., et al., *NAD(+)-SIRT1 control of H3K4 trimethylation through circadian deacetylation of MLL1*. *Nat Struct Mol Biol*, 2015. **22**(4): p. 312-8.
81. Vaquero, A., et al., *SIRT1 regulates the histone methyl-transferase SUV39H1 during heterochromatin formation*. *Nature*, 2007. **450**(7168): p. 440-4.
82. Bass, J., *Circadian Mechanisms in Bioenergetics and Cell Metabolism*, in *A Time for Metabolism and Hormones*, P. Sassone-Corsi and Y. Christen, Editors. 2016: Cham (CH). p. 25-32.
83. Malherbe, C., et al., *Circadian Variations of Blood Sugar and Plasma Insulin Levels in Man*. *Diabetologia*, 1969. **5**(6): p. 397-&.
84. Rudic, R.D., et al., *BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis*. *Plos Biology*, 2004. **2**(11): p. 1893-1899.
85. Schlierf, G. and E. Dorow, *Diurnal Patterns of Triglycerides, Free Fatty-Acids, Blood-Sugar, and Insulin during Carbohydrate-Induction in Man and Their Modification by Nocturnal Suppression of Lipolysis*. *Journal of Clinical Investigation*, 1973. **52**(3): p. 732-740.

86. Vollmers, C., et al., *Time of feeding and the intrinsic circadian clock drive rhythms in hepatic gene expression*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009. **106**(50): p. 21453-21458.
87. Udoh, U.S., et al., *The Molecular Circadian Clock and Alcohol-Induced Liver Injury*. Biomolecules, 2015. **5**(4): p. 2504-2537.
88. Mayr, B. and M. Montminy, *Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2001. **2**(8): p. 599-609.
89. Travnickova-Bendova, Z., et al., *Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(11): p. 7728-7733.
90. Hatori, M. and S. Panda, *CRY links the circadian clock and CREB-mediated gluconeogenesis*. Cell Research, 2010. **20**(12): p. 1285-1288.
91. Lamia, K.A., et al., *AMPK Regulates the Circadian Clock by Cryptochrome Phosphorylation and Degradation*. Science, 2009. **326**(5951): p. 437-440.
92. Gnocchi, D., et al., *Lipids around the Clock: Focus on Circadian Rhythms and Lipid Metabolism*. Biology (Basel), 2015. **4**(1): p. 104-32.
93. Dallmann, R., et al., *The human circadian metabolome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(7): p. 2625-9.
94. Poggiogalle, E., H. Jamshed, and C.M. Peterson, *Circadian regulation of glucose, lipid, and energy metabolism in humans*. Metabolism, 2018. **84**: p. 11-27.
95. Alves-Bezerra, M. and D.E. Cohen, *Triglyceride Metabolism in the Liver*. Compr Physiol, 2017. **8**(1): p. 1-8.
96. Weiss, S.B., E.P. Kennedy, and J.Y. Kiyasu, *The enzymatic synthesis of triglycerides*. J Biol Chem, 1960. **235**: p. 40-4.
97. Stein, Y. and B. Shapiro, *Uptake and metabolism of triglycerides by the rat liver*. J Lipid Res, 1960. **1**: p. 326-31.
98. Adamovich, Y., et al., *Circadian clocks and feeding time regulate the oscillations and levels of hepatic triglycerides*. Cell Metab, 2014. **19**(2): p. 319-30.
99. Rey, G., et al., *Genome-wide and phase-specific DNA-binding rhythms of BMAL1 control circadian output functions in mouse liver*. PLoS Biol, 2011. **9**(2): p. e1000595.
100. Koike, N., et al., *Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals*. Science, 2012. **338**(6105): p. 349-54.
101. Adamovich, Y., R. Aviram, and G. Asher, *The emerging roles of lipids in circadian control*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1851**(8): p. 1017-25.
102. Eckel-Mahan, K.L., et al., *Coordination of the transcriptome and metabolome by the circadian clock*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(14): p. 5541-6.
103. Grimaldi, B., et al., *PER2 controls lipid metabolism by direct regulation of PPARgamma*. Cell Metab, 2010. **12**(5): p. 509-20.
104. *NAD(+) Metabolism and Signaling*. Cell Metab, 2019. **30**(1): p. 7-9.
105. Canto, C., K.J. Menzies, and J. Auwerx, *NAD(+) Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus*. Cell Metab, 2015. **22**(1): p. 31-53.
106. Houtkooper, R.H., et al., *The secret life of NAD+: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways*. Endocr Rev, 2010. **31**(2): p. 194-223.
107. Bender, D.A., *Biochemistry of tryptophan in health and disease*. Mol Aspects Med, 1983. **6**(2): p. 101-97.
108. Begrich, K., et al., *Mitochondrial Adaptations and Dysfunctions in Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. Hepatology, 2013. **58**(4): p. 1497-1507.

109. Yamazaki, F., et al., *Human indolylamine 2,3-dioxygenase. Its tissue distribution, and characterization of the placental enzyme.* Biochem J, 1985. **230**(3): p. 635-8.
110. Ramsey, K.M., et al., *Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD⁺ biosynthesis.* Science, 2009. **324**(5927): p. 651-4.
111. Eckel-Mahan, K.L., et al., *Reprogramming of the circadian clock by nutritional challenge.* Cell, 2013. **155**(7): p. 1464-78.
112. Nakahata, Y., et al., *Circadian control of the NAD⁺ salvage pathway by CLOCK-SIRT1.* Science, 2009. **324**(5927): p. 654-7.
113. Rogina, B. and S.L. Helfand, *Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(45): p. 15998-6003.
114. Howitz, K.T., et al., *Small molecule activators of sirtuins extend Saccharomyces cerevisiae lifespan.* Nature, 2003. **425**(6954): p. 191-6.
115. Tissenbaum, H.A. and L. Guarente, *Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in Caenorhabditis elegans.* Nature, 2001. **410**(6825): p. 227-30.
116. Bordone, L. and L. Guarente, *Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(4): p. 298-305.
117. Imai, S. and W. Kiess, *Therapeutic potential of SIRT1 and NAMPT-mediated NAD biosynthesis in type 2 diabetes.* Front Biosci (Landmark Ed), 2009. **14**: p. 2983-95.
118. Milne, J.C. and J.M. Denu, *The Sirtuin family: therapeutic targets to treat diseases of aging.* Curr Opin Chem Biol, 2008. **12**(1): p. 11-7.
119. Imai, S., *SIRT1 and caloric restriction: an insight into possible trade-offs between robustness and frailty.* Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2009. **12**(4): p. 350-6.
120. Nakahata, Y., et al., *The NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control.* Cell, 2008. **134**(2): p. 329-40.
121. Levine, D.C., et al., *NAD(+) Controls Circadian Reprogramming through PER2 Nuclear Translocation to Counter Aging.* Mol Cell, 2020. **78**(5): p. 835-849 e7.
122. Hasmann, M. and I. Schemainda, *FK866, a highly specific noncompetitive inhibitor of nicotinamide phosphoribosyltransferase, represents a novel mechanism for induction of tumor cell apoptosis.* Cancer Res, 2003. **63**(21): p. 7436-42.
123. Fulco, M., et al., *Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt.* Dev Cell, 2008. **14**(5): p. 661-73.
124. Skokowa, J., et al., *NAMPT is essential for the G-CSF-induced myeloid differentiation via a NAD(+)-sirtuin-1-dependent pathway.* Nat Med, 2009. **15**(2): p. 151-8.
125. Chen, G.C., et al., *Dairy products consumption and metabolic syndrome in adults: systematic review and meta-analysis of observational studies.* Sci Rep, 2015. **5**: p. 14606.
126. Marchesini, G., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome.* Diabetes, 2001. **50**(8): p. 1844-50.
127. Guo, S., *Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms.* J Endocrinol, 2014. **220**(2): p. T1-T23.
128. Isomaa, B., et al., *Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome.* Diabetes Care, 2001. **24**(4): p. 683-9.
129. Berman, P., J. Davies, and R. Horton, *Diabetes, obesity, and the metabolic syndrome: a call for papers for EASD and the World Diabetes Congress.* Lancet Diabetes Endocrinol, 2015. **3**(8): p. 591.
130. Kadowaki, T., et al., *Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome.* J Clin Invest, 2006. **116**(7): p. 1784-92.
131. Le Roith, D. and Y. Zick, *Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance.* Diabetes Care, 2001. **24**(3): p. 588-97.

132. Bugianesi, E., A.J. McCullough, and G. Marchesini, *Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease*. *Hepatology*, 2005. **42**(5): p. 987-1000.
133. Titchenell, P.M., et al., *Hepatic insulin signalling is dispensable for suppression of glucose output by insulin in vivo*. *Nat Commun*, 2015. **6**: p. 7078.
134. Paradis, V., et al., *High glucose and hyperinsulinemia stimulate connective tissue growth factor expression: a potential mechanism involved in progression to fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis*. *Hepatology*, 2001. **34**(4 Pt 1): p. 738-44.
135. Olokoba, A.B., O.A. Obateru, and L.B. Olokoba, *Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends*. *Oman Med J*, 2012. **27**(4): p. 269-73.
136. Sami, W., et al., *Effect of diet on type 2 diabetes mellitus: A review*. *Int J Health Sci (Qassim)*, 2017. **11**(2): p. 65-71.
137. Mason, I.C., et al., *Impact of circadian disruption on glucose metabolism: implications for type 2 diabetes*. *Diabetologia*, 2020. **63**(3): p. 462-472.
138. Ottosson-Laakso, E., et al., *Glucose-Induced Changes in Gene Expression in Human Pancreatic Islets: Causes or Consequences of Chronic Hyperglycemia*. *Diabetes*, 2017. **66**(12): p. 3013-3028.
139. Hunter, S.J. and W.T. Garvey, *Insulin action and insulin resistance: diseases involving defects in insulin receptors, signal transduction, and the glucose transport effector system*. *Am J Med*, 1998. **105**(4): p. 331-45.
140. Moscatiello, S., R. Manini, and G. Marchesini, *Diabetes and liver disease: an ominous association*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2007. **17**(1): p. 63-70.
141. Adua, E., et al., *The potential of N-glycosylation profiles as biomarkers for monitoring the progression of Type II diabetes mellitus towards diabetic kidney disease*. *J Diabetes Metab Disord*, 2018. **17**(2): p. 233-246.
142. Gui, F., et al., *Endothelial Dysfunction in Diabetic Retinopathy*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2020. **11**: p. 591.
143. Kopin, L. and C. Lowenstein, *Dyslipidemia*. *Ann Intern Med*, 2017. **167**(11): p. ITC81-ITC96.
144. Ginsberg, H.N., Y.L. Zhang, and A. Hernandez-Ono, *Metabolic syndrome: focus on dyslipidemia*. *Obesity (Silver Spring)*, 2006. **14 Suppl 1**: p. 41S-49S.
145. Cannon, C.P., *Mixed dyslipidemia, metabolic syndrome, diabetes mellitus, and cardiovascular disease: clinical implications*. *Am J Cardiol*, 2008. **102**(12A): p. 5L-9L.
146. Semple, R.K., et al., *Postreceptor insulin resistance contributes to human dyslipidemia and hepatic steatosis*. *J Clin Invest*, 2009. **119**(2): p. 315-22.
147. Biddinger, S.B., et al., *Hepatic insulin resistance is sufficient to produce dyslipidemia and susceptibility to atherosclerosis*. *Cell Metab*, 2008. **7**(2): p. 125-34.
148. Knutson, K.L., et al., *The metabolic consequences of sleep deprivation*. *Sleep Med Rev*, 2007. **11**(3): p. 163-78.
149. Arble, D.M., et al., *Circadian timing of food intake contributes to weight gain*. *Obesity (Silver Spring)*, 2009. **17**(11): p. 2100-2.
150. McHill, A.W., et al., *Later circadian timing of food intake is associated with increased body fat*. *Am J Clin Nutr*, 2017. **106**(5): p. 1213-1219.
151. Plano, S.A., et al., *Circadian and Metabolic Effects of Light: Implications in Weight Homeostasis and Health*. *Front Neurol*, 2017. **8**: p. 558.
152. Coomans, C.P., et al., *Detrimental effects of constant light exposure and high-fat diet on circadian energy metabolism and insulin sensitivity*. *FASEB J*, 2013. **27**(4): p. 1721-32.
153. Antoch, M.P. and R.V. Kondratov, *Pharmacological modulators of the circadian clock as potential therapeutic drugs: focus on genotoxic/anticancer therapy*. *Handb Exp Pharmacol*, 2013(217): p. 289-309.

154. Knutson, K.L. and E. Van Cauter, *Associations between sleep loss and increased risk of obesity and diabetes*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1129**: p. 287-304.
155. Kohsaka, A., et al., *High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice*. Cell Metab, 2007. **6**(5): p. 414-21.
156. Broussard, J.L., et al., *Impaired insulin signaling in human adipocytes after experimental sleep restriction: a randomized, crossover study*. Ann Intern Med, 2012. **157**(8): p. 549-57.
157. Green, C.B., J.S. Takahashi, and J. Bass, *The meter of metabolism*. Cell, 2008. **134**(5): p. 728-42.
158. Panda, S., et al., *Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock*. Cell, 2002. **109**(3): p. 307-20.
159. Rutter, J., M. Reick, and S.L. McKnight, *Metabolism and the control of circadian rhythms*. Annu Rev Biochem, 2002. **71**: p. 307-31.
160. Turek, F.W., et al., *Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice*. Science, 2005. **308**(5724): p. 1043-5.
161. Kennaway, D.J., et al., *Metabolic homeostasis in mice with disrupted Clock gene expression in peripheral tissues*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007. **293**(4): p. R1528-37.
162. Marcheva, B., et al., *Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes*. Nature, 2010. **466**(7306): p. 627-31.
163. Lamia, K.A. and R.M. Evans, *Metabolism: Tick, tock, a beta-cell clock*. Nature, 2010. **466**(7306): p. 571-2.
164. Ando, H., et al., *Rhythmic messenger ribonucleic acid expression of clock genes and adipocytokines in mouse visceral adipose tissue*. Endocrinology, 2005. **146**(12): p. 5631-6.
165. Pan, X., J. Queiroz, and M.M. Hussain, *Nonalcoholic fatty liver disease in CLOCK mutant mice*. J Clin Invest, 2020. **130**(8): p. 4282-4300.
166. Pan, X., X.C. Jiang, and M.M. Hussain, *Impaired cholesterol metabolism and enhanced atherosclerosis in clock mutant mice*. Circulation, 2013. **128**(16): p. 1758-69.
167. Froy, O., *A CRY for help to fight fat*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2013. **304**(11): p. E1129-30.
168. Raspe, E., et al., *Identification of Rev-erbalpha as a physiological repressor of apoC-III gene transcription*. J Lipid Res, 2002. **43**(12): p. 2172-9.
169. Ye, D., et al., *Associations of polymorphisms in circadian genes with abdominal obesity in Chinese adult population*. Obes Res Clin Pract, 2016. **10 Suppl 1**: p. S133-S141.
170. Dashti, H.S., et al., *Habitual sleep duration is associated with BMI and macronutrient intake and may be modified by CLOCK genetic variants*. Am J Clin Nutr, 2015. **101**(1): p. 135-43.
171. Corella, D., et al., *CLOCK gene variation is associated with incidence of type-2 diabetes and cardiovascular diseases in type-2 diabetic subjects: dietary modulation in the PREDIMED randomized trial*. Cardiovasc Diabetol, 2016. **15**: p. 4.
172. Loria-Kohen, V., et al., *Polymorphism in the CLOCK gene may influence the effect of fat intake reduction on weight loss*. Nutrition, 2016. **32**(4): p. 453-60.
173. Karantanos, T., et al., *Association of the clock genes polymorphisms with colorectal cancer susceptibility*. J Surg Oncol, 2013. **108**(8): p. 563-7.
174. Karthikeyan, R., et al., *Per3 length polymorphism in patients with type 2 diabetes mellitus*. Horm Mol Biol Clin Investig, 2014. **18**(3): p. 145-9.
175. Yamaguchi, M., et al., *Association between brain-muscle-ARNT-like protein-2 (BMAL2) gene polymorphism and type 2 diabetes mellitus in obese Japanese individuals: A cross-sectional analysis of the Japan Multi-institutional Collaborative Cohort Study*. Diabetes Res Clin Pract, 2015. **110**(3): p. 301-8.

176. Kelly, M.A., et al., *Circadian gene variants and susceptibility to type 2 diabetes: a pilot study*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e32670.
177. Renstrom, F., et al., *Season-dependent associations of circadian rhythm-regulating loci (CRY1, CRY2 and MTNR1B) and glucose homeostasis: the GLACIER Study*. Diabetologia, 2015. **58**(5): p. 997-1005.
178. Mendoza, J., P. Pevet, and E. Challet, *High-fat feeding alters the clock synchronization to light*. J Physiol, 2008. **586**(24): p. 5901-10.
179. Honma, K., et al., *Loss of circadian rhythm of circulating insulin concentration induced by high-fat diet intake is associated with disrupted rhythmic expression of circadian clock genes in the liver*. Metabolism, 2016. **65**(4): p. 482-91.
180. Penke, M., et al., *Hepatic NAD salvage pathway is enhanced in mice on a high-fat diet*. Mol Cell Endocrinol, 2015. **412**: p. 65-72.
181. Belenky, P., K.L. Bogan, and C. Brenner, *NAD⁺ metabolism in health and disease*. Trends Biochem Sci, 2007. **32**(1): p. 12-9.
182. Imai, S. and L. Guarente, *Ten years of NAD-dependent SIR2 family deacetylases: implications for metabolic diseases*. Trends Pharmacol Sci, 2010. **31**(5): p. 212-20.
183. Yoshino, J., et al., *Nicotinamide mononucleotide, a key NAD(+) intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice*. Cell Metab, 2011. **14**(4): p. 528-36.
184. Gariani, K., et al., *Eliciting the mitochondrial unfolded protein response by nicotinamide adenine dinucleotide repletion reverses fatty liver disease in mice*. Hepatology, 2016. **63**(4): p. 1190-204.
185. Gariani, K., et al., *Inhibiting poly ADP-ribosylation increases fatty acid oxidation and protects against fatty liver disease*. J Hepatol, 2017. **66**(1): p. 132-141.
186. Trammell, S.A., et al., *Nicotinamide Riboside Opposes Type 2 Diabetes and Neuropathy in Mice*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 26933.
187. Rajman, L., K. Chwalek, and D.A. Sinclair, *Therapeutic Potential of NAD-Boosting Molecules: The In Vivo Evidence*. Cell Metab, 2018. **27**(3): p. 529-547.
188. Imai, S., *"Clocks" in the NAD World: NAD as a metabolic oscillator for the regulation of metabolism and aging*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1804**(8): p. 1584-90.
189. Guarente, L., *Sirtuins as potential targets for metabolic syndrome*. Nature, 2006. **444**(7121): p. 868-74.
190. Escande, C., et al., *Flavonoid apigenin is an inhibitor of the NAD⁺ ase CD38: implications for cellular NAD⁺ metabolism, protein acetylation, and treatment of metabolic syndrome*. Diabetes, 2013. **62**(4): p. 1084-93.
191. Braidy, N. and Y. Liu, *NAD⁺ therapy in age-related degenerative disorders: A benefit/risk analysis*. Exp Gerontol, 2020. **132**: p. 110831.
192. Hong, W., et al., *Nicotinamide Mononucleotide: A Promising Molecule for Therapy of Diverse Diseases by Targeting NAD⁺ Metabolism*. Front Cell Dev Biol, 2020. **8**: p. 246.
193. Lewis, J.E., et al., *Targeting NAD(+) Metabolism to Enhance Radiation Therapy Responses*. Semin Radiat Oncol, 2019. **29**(1): p. 6-15.
194. Wang, J., et al., *Efficacy and safety of NAD⁺ ADP-ribosyltransferase 1 agonist versus Donepezil in elderly Chinese patients with Alzheimer disease: A novel target for effective therapy*. Pak J Pharm Sci, 2019. **32**(5(Special)): p. 2427-2432.
195. Yamaguchi, S. and J. Yoshino, *Adipose tissue NAD(+) biology in obesity and insulin resistance: From mechanism to therapy*. Bioessays, 2017. **39**(5).
196. Hsu, C.P., et al., *Nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates cell survival through NAD⁺ synthesis in cardiac myocytes*. Circ Res, 2009. **105**(5): p. 481-91.

197. Wang, G., et al., *P7C3 neuroprotective chemicals function by activating the rate-limiting enzyme in NAD salvage*. Cell, 2014. **158**(6): p. 1324-1334.
198. Araki, T., Y. Sasaki, and J. Milbrandt, *Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration*. Science, 2004. **305**(5686): p. 1010-3.
199. Nazari Soltan Ahmad, S., et al., *Dunnione protects against experimental cisplatin-induced nephrotoxicity by modulating NQO1 and NAD(+) levels*. Free Radic Res, 2018. **52**(7): p. 808-817.
200. Pellicciari, R., et al., *alpha-Amino-beta-carboxymuconate-epsilon-semialdehyde Decarboxylase (ACMSD) Inhibitors as Novel Modulators of De Novo Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD(+)) Biosynthesis*. J Med Chem, 2018. **61**(3): p. 745-759.
201. Kraus, D., et al., *Nicotinamide N-methyltransferase knockdown protects against diet-induced obesity*. Nature, 2014. **508**(7495): p. 258-62.
202. Dellinger, R.W., et al., *Erratum: Author Correction: Repeat dose NRPT (nicotinamide riboside and pterostilbene) increases NAD(+) levels in humans safely and sustainably: a randomized, double-blind, placebo-controlled study*. NPJ Aging Mech Dis, 2018. **4**: p. 8.
203. Poyan Mehr, A., et al., *De novo NAD(+) biosynthetic impairment in acute kidney injury in humans*. Nat Med, 2018. **24**(9): p. 1351-1359.
204. van de Weijer, T., et al., *Evidence for a direct effect of the NAD+ precursor acipimox on muscle mitochondrial function in humans*. Diabetes, 2015. **64**(4): p. 1193-201.
205. Jacobson, E.L. and M.K. Jacobson, *Tissue NAD as a biochemical measure of niacin status in humans*. Methods Enzymol, 1997. **280**: p. 221-30.
206. Yang, Y., et al., *Dihydronicotinamide riboside is a potent NAD(+) concentration enhancer in vitro and in vivo*. J Biol Chem, 2019. **294**(23): p. 9295-9307.
207. Bock, K.W., *Aryl hydrocarbon receptor (AHR) functions in NAD(+) metabolism, myelopoiesis and obesity*. Biochem Pharmacol, 2019. **163**: p. 128-132.
208. Canto, C., et al., *The NAD(+) precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity*. Cell Metab, 2012. **15**(6): p. 838-47.
209. Jukarainen, S., et al., *Obesity Is Associated With Low NAD(+)/SIRT Pathway Expression in Adipose Tissue of BMI-Discordant Monozygotic Twins*. J Clin Endocrinol Metab, 2016. **101**(1): p. 275-83.
210. Berardo, C., et al., *Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Non-Alcoholic Steatohepatitis: Current Issues and Future Perspectives in Preclinical and Clinical Research*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(24).
211. Anisonyan, A.V., et al., *[Non-alcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes mellitus: issues of the liver fibrosis diagnostics]*. Ter Arkh, 2020. **92**(8): p. 73-78.
212. Bence, K.K. and M.J. Birnbaum, *Metabolic drivers of non-alcoholic fatty liver disease*. Mol Metab, 2020: p. 101143.
213. Garten, A., et al., *Physiological and pathophysiological roles of NAMPT and NAD metabolism*. Nat Rev Endocrinol, 2015. **11**(9): p. 535-46.
214. Amano, H., et al., *Telomere Dysfunction Induces Sirtuin Repression that Drives Telomere-Dependent Disease*. Cell Metab, 2019. **29**(6): p. 1274-1290 e9.
215. Mukhopadhyay, P., et al., *Poly (ADP-ribose) polymerase-1 is a key mediator of liver inflammation and fibrosis*. Hepatology, 2014. **59**(5): p. 1998-2009.
216. Pham, T.X., et al., *Nicotinamide riboside, an NAD+ precursor, attenuates the development of liver fibrosis in a diet-induced mouse model of liver fibrosis*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2019. **1865**(9): p. 2451-2463.

217. Martens, C.R., et al., *Chronic nicotinamide riboside supplementation is well-tolerated and elevates NAD(+) in healthy middle-aged and older adults*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 1286.
218. 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.
219. Nakahata, Y. and Y. Bessho, *The Circadian NAD+ Metabolism: Impact on Chromatin Remodeling and Aging*. Biomed Res Int, 2016. **2016**: p. 3208429.
220. Peek, C.B., et al., *Circadian clock NAD+ cycle drives mitochondrial oxidative metabolism in mice*. Science, 2013. **342**(6158): p. 1243417.
221. Collins, S., et al., *Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics*. Physiol Behav, 2004. **81**(2): p. 243-8.
222. Speakman, J., et al., *Animal models of obesity*. Obes Rev, 2007. **8 Suppl 1**: p. 55-61.
223. Schein, P.S. and S. Loftus, *Streptozotocin: depression of mouse liver pyridine nucleotides*. Cancer Res, 1968. **28**(8): p. 1501-6.
224. Mehlem, A., et al., *Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease*. Nat Protoc, 2013. **8**(6): p. 1149-54.
225. Subramanian, A., et al., *Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(43): p. 15545-50.
226. Liberzon, A., et al., *The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection*. Cell Syst, 2015. **1**(6): p. 417-425.
227. Heinz, S., et al., *Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities*. Mol Cell, 2010. **38**(4): p. 576-89.
228. Abhilash, L. and V. Sheeba, *RhythmicAlly: Your R and Shiny-Based Open-Source Ally for the Analysis of Biological Rhythms*. J Biol Rhythms, 2019. **34**(5): p. 551-561.
229. Bellet, M.M., et al., *The time of metabolism: NAD+, SIRT1, and the circadian clock*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2011. **76**: p. 31-8.
230. Benede-Ubieto, R., et al., *Guidelines and Considerations for Metabolic Tolerance Tests in Mice*. Diabetes Metab Syndr Obes, 2020. **13**: p. 439-450.
231. Tsujino, N. and T. Sakurai, *[Circadian rhythm of leptin, orexin and ghrelin]*. Nihon Rinsho, 2012. **70**(7): p. 1121-5.
232. Spangenburg, E.E., et al., *Use of BODIPY (493/503) to visualize intramuscular lipid droplets in skeletal muscle*. J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: p. 598358.
233. Madsen, M.S., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and C/EBPalpha synergistically activate key metabolic adipocyte genes by assisted loading*. Mol Cell Biol, 2014. **34**(6): p. 939-54.
234. Liss, K.H.H. and B.N. Finck, *PPARs and nonalcoholic fatty liver disease*. Biochimie, 2017. **136**: p. 65-74.
235. Matsusue, K., et al., *Hepatic CCAAT/enhancer binding protein alpha mediates induction of lipogenesis and regulation of glucose homeostasis in leptin-deficient mice*. Molecular Endocrinology, 2004. **18**(11): p. 2751-2764.
236. Fedorova, M., R.C. Bollineni, and R. Hoffmann, *Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies*. Mass Spectrom Rev, 2014. **33**(2): p. 79-97.
237. Videla, L.A., et al., *Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients*. Clin Sci (Lond), 2004. **106**(3): p. 261-8.

238. Young, M.J. and W.C. Copeland, *Human mitochondrial DNA replication machinery and disease*. *Curr Opin Genet Dev*, 2016. **38**: p. 52-62.
239. Bochkis, I.M., et al., *Hepatocyte-specific ablation of Foxa2 alters bile acid homeostasis and results in endoplasmic reticulum stress*. *Nat Med*, 2008. **14**(8): p. 828-36.
240. Wolfrum, C., et al., *Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes*. *Nature*, 2004. **432**(7020): p. 1027-32.
241. Xiong, Q., et al., *Nr2e1 ablation impairs liver glucolipid metabolism and induces inflammation, high-fat diets amplify the damage*. *Biomed Pharmacother*, 2019. **120**: p. 109503.
242. Hayhurst, G.P., et al., *Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(4): p. 1393-403.
243. Simonen, P.P., H.K. Gylling, and T.A. Miettinen, *Diabetes contributes to cholesterol metabolism regardless of obesity*. *Diabetes Care*, 2002. **25**(9): p. 1511-5.
244. Sun, H., et al., *Role of the mTORFOXO1 pathway in obesity-associated renal tubulointerstitial inflammation*. *Mol Med Rep*, 2019. **19**(2): p. 1284-1293.
245. Saxton, R.A. and D.M. Sabatini, *mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease*. *Cell*, 2017. **169**(2): p. 361-371.
246. Duvel, K., et al., *Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1*. *Mol Cell*, 2010. **39**(2): p. 171-83.
247. Peterson, T.R., et al., *mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway*. *Cell*, 2011. **146**(3): p. 408-20.
248. Robles, M.S., S.J. Humphrey, and M. Mann, *Phosphorylation Is a Central Mechanism for Circadian Control of Metabolism and Physiology*. *Cell Metab*, 2017. **25**(1): p. 118-127.
249. Lipton, J.O., et al., *The Circadian Protein BMAL1 Regulates Translation in Response to S6K1-Mediated Phosphorylation*. *Cell*, 2015. **161**(5): p. 1138-1151.
250. Jouffe, C., et al., *The Circadian Clock Coordinates Ribosome Biogenesis*. *Plos Biology*, 2013. **11**(1).
251. Foster, K.G. and D.C. Fingar, *Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(19): p. 14071-7.
252. Le Bacquer, O., et al., *Elevated sensitivity to diet-induced obesity and insulin resistance in mice lacking 4E-BP1 and 4E-BP2*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(2): p. 387-96.
253. Garcia, D. and R.J. Shaw, *AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance*. *Mol Cell*, 2017. **66**(6): p. 789-800.
254. Smith, B.K., et al., *Treatment of nonalcoholic fatty liver disease: role of AMPK*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2016. **311**(4): p. E730-E740.
255. Marcinko, K., et al., *High intensity interval training improves liver and adipose tissue insulin sensitivity*. *Mol Metab*, 2015. **4**(12): p. 903-15.
256. Sun, L., et al., *Hydrogen sulfide reduces serum triglyceride by activating liver autophagy via the AMPK-mTOR pathway*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2015. **309**(11): p. E925-35.
257. Cool, B., et al., *Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome*. *Cell Metab*, 2006. **3**(6): p. 403-16.
258. Woods, A., et al., *Identification of phosphorylation sites in AMP-activated protein kinase (AMPK) for upstream AMPK kinases and study of their roles by site-directed mutagenesis*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(31): p. 28434-42.
259. Strzyz, P., *Membrane trafficking: The second job of ULKs*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016. **17**(7): p. 396-7.

260. Peng, C., et al., *RSK2 mediates NF- κ B activity through the phosphorylation of I κ B α in the TNF-R1 pathway*. *FASEB J*, 2010. **24**(9): p. 3490-9.
261. Diaz, M.E., et al., *Growth hormone modulation of EGF-induced PI3K-Akt pathway in mice liver*. *Cell Signal*, 2012. **24**(2): p. 514-523.
262. Keung, W., et al., *Inhibition of carnitine palmitoyltransferase-1 activity alleviates insulin resistance in diet-induced obese mice*. *Diabetes*, 2013. **62**(3): p. 711-20.
263. Luo, W., et al., *Pathview Web: user friendly pathway visualization and data integration*. *Nucleic Acids Res*, 2017. **45**(W1): p. W501-W508.
264. Hashimoto, T., et al., *Peroxisomal and mitochondrial fatty acid beta-oxidation in mice nullizygous for both peroxisome proliferator-activated receptor alpha and peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. Genotype correlation with fatty liver phenotype*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(27): p. 19228-36.
265. Dhar, M., et al., *Omega oxidation of 3-hydroxy fatty acids by the human CYP4F gene subfamily enzyme CYP4F11*. *J Lipid Res*, 2008. **49**(3): p. 612-24.
266. Hoek-van den Hil, E.F., et al., *Quercetin induces hepatic lipid omega-oxidation and lowers serum lipid levels in mice*. *PLoS One*, 2013. **8**(1): p. e51588.
267. Szrok, S., et al., *Metallothioneins 1 and 2, but not 3, are regulated by nutritional status in rat white adipose tissue*. *Genes Nutr*, 2016. **11**: p. 18.
268. Xu, Y., et al., *Lipocalin-2 Protects Against Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease by Targeting Hepatocytes*. *Hepatol Commun*, 2019. **3**(6): p. 763-775.
269. Wuarin, J. and U. Schibler, *Expression of the liver-enriched transcriptional activator protein DBP follows a stringent circadian rhythm*. *Cell*, 1990. **63**(6): p. 1257-66.
270. Bouret, S.G., S.J. Draper, and R.B. Simerly, *Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice*. *J Neurosci*, 2004. **24**(11): p. 2797-805.
271. Orosco, M., et al., *Feeding-related immunoreactive insulin changes in the PVN-VMH revealed by microdialysis*. *Brain Res*, 1995. **671**(1): p. 149-58.
272. Petrovich, G.D., *The Function of Paraventricular Thalamic Circuitry in Adaptive Control of Feeding Behavior*. *Front Behav Neurosci*, 2021. **15**: p. 671096.
273. de Picciotto, N.E., et al., *Nicotinamide mononucleotide supplementation reverses vascular dysfunction and oxidative stress with aging in mice*. *Aging Cell*, 2016. **15**(3): p. 522-30.
274. Guan, Y., et al., *Nicotinamide Mononucleotide, an NAD(+) Precursor, Rescues Age-Associated Susceptibility to AKI in a Sirtuin 1-Dependent Manner*. *J Am Soc Nephrol*, 2017. **28**(8): p. 2337-2352.
275. Mukherjee, S., et al., *Nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis promotes liver regeneration*. *Hepatology*, 2017. **65**(2): p. 616-630.
276. Bruckbauer, A., et al., *Leucine-nicotinic acid synergy stimulates AMPK/Sirt1 signaling and regulates lipid metabolism and lifespan in *Caenorhabditis elegans*, and hyperlipidemia and atherosclerosis in mice*. *Am J Cardiovasc Dis*, 2017. **7**(2): p. 33-47.
277. Stromsdorfer, K.L., et al., *NAMPT-Mediated NAD(+) Biosynthesis in Adipocytes Regulates Adipose Tissue Function and Multi-organ Insulin Sensitivity in Mice*. *Cell Rep*, 2016. **16**(7): p. 1851-60.
278. Wanders, D., et al., *Niacin increases adiponectin and decreases adipose tissue inflammation in high fat diet-fed mice*. *PLoS One*, 2013. **8**(8): p. e71285.
279. Ganji, S.H., M.L. Kashyap, and V.S. Kamanna, *Niacin inhibits fat accumulation, oxidative stress, and inflammatory cytokine IL-8 in cultured hepatocytes: Impact on non-alcoholic fatty liver disease*. *Metabolism*, 2015. **64**(9): p. 982-90.

280. Koroglu, E., et al., *Role of oxidative stress and insulin resistance in disease severity of non-alcoholic fatty liver disease*. Turk J Gastroenterol, 2016. **27**(4): p. 361-6.
281. Chienwichai, P., et al., *Hepatic protein Carbonylation profiles induced by lipid accumulation and oxidative stress for investigating cellular response to non-alcoholic fatty liver disease in vitro*. Proteome Sci, 2019. **17**: p. 1.
282. Berlanga, A., et al., *Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease*. Clin Exp Gastroenterol, 2014. **7**: p. 221-39.
283. Martinez-Galisteo, E., et al., *NADPH and oxidized thioredoxin mediate redox interconversion of calf-liver and Escherichia coli thioredoxin reductase*. Mol Cell Biochem, 1992. **109**(1): p. 61-9.
284. Hatori, M., et al., *Time-Restricted Feeding Without Reducing Caloric Intake Prevents Metabolic Diseases in Mice Fed a High-Fat Diet*. Diabetes, 2013. **62**: p. A526-A526.
285. Hagiwara, A., et al., *Hepatic mTORC2 Activates Glycolysis and Lipogenesis through Akt, Glucokinase and SREBP1c*. Diabetes, 2012. **61**: p. A27-A27.
286. Lu, M.J., et al., *Insulin regulates liver metabolism in vivo in the absence of hepatic Akt and Foxo1*. Nature Medicine, 2012. **18**(3): p. 388-U254.
287. Matsuda, S., M. Kobayashi, and Y. Kitagishi, *Roles for PI3K/AKT/PTEN Pathway in Cell Signaling of Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. ISRN Endocrinol, 2013. **2013**: p. 472432.
288. Perry, R.J., et al., *Hepatic Acetyl CoA Links Adipose Tissue Inflammation to Hepatic Insulin Resistance and Type 2 Diabetes*. Cell, 2015. **160**(4): p. 745-758.
289. Moon, Y.A., et al., *The Scap/SREBP Pathway Is Essential for Developing Diabetic Fatty Liver and Carbohydrate-Induced Hypertriglyceridemia in Animals*. Cell Metabolism, 2012. **15**(2): p. 240-246.
290. Foufelle, F. and P. Ferre, *New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c*. Biochemical Journal, 2002. **366**: p. 377-391.
291. Lindholm, C.R., et al., *A high-fat diet decreases AMPK activity in multiple tissues in the absence of hyperglycemia or systemic inflammation in rats*. J Physiol Biochem, 2013. **69**(2): p. 165-75.
292. Bonnard, C., et al., *Changes in adiponectin, its receptors and AMPK activity in tissues of diet-induced diabetic mice*. Diabetes & Metabolism, 2008. **34**(1): p. 52-61.
293. Shaw, R.J., et al., *The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin*. Science, 2005. **310**(5754): p. 1642-1646.
294. Lan, F., et al., *SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1 - Possible role in AMP-activated protein kinase activation*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(41): p. 27628-27635.
295. Lim, C.T., B. Kola, and M. Korbonits, *AMPK as a mediator of hormonal signalling*. Journal of Molecular Endocrinology, 2010. **44**(2): p. 87-97.
296. Wong, A.K.F., et al., *AMP-activated protein kinase pathway: a potential therapeutic target in cardiometabolic disease*. Clinical Science, 2009. **116**(7-8): p. 607-620.
297. Yu, X., et al., *Leptinomimetic effects of the AMP kinase activator AICAR in leptin-resistant rats: prevention of diabetes and ectopic lipid deposition*. Diabetologia, 2004. **47**(11): p. 2012-2021.
298. Munday, M.R., et al., *Identification by amino acid sequencing of three major regulatory phosphorylation sites on rat acetyl-CoA carboxylase*. Eur J Biochem, 1988. **175**(2): p. 331-8.
299. Li, Y., et al., *AMPK Phosphorylates and Inhibits SREBP Activity to Attenuate Hepatic Steatosis and Atherosclerosis in Diet-Induced Insulin-Resistant Mice*. Cell Metabolism, 2011. **13**(4): p. 376-388.

300. Cao, R.F., *mTOR Signaling, Translational Control, and the Circadian Clock*. *Frontiers in Genetics*, 2018. **9**.
301. LeBouton, A.V. and S.D. Handler, *Persistent circadian rhythmicity of protein synthesis in the liver of starved rats*. *Experientia*, 1971. **27**(9): p. 1031-2.
302. Kubrusly, M.S., et al., *A role for mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway in non alcoholic steatohepatitis related-cirrhosis*. *Histol Histopathol*, 2010. **25**(9): p. 1123-31.
303. Laplante, M. and D.M. Sabatini, *An Emerging Role of mTOR in Lipid Biosynthesis*. *Current Biology*, 2009. **19**(22): p. R1046-R1052.
304. Chung, J., et al., *Rapamycin Fkbp Specifically Blocks Growth-Dependent Activation of and Signaling by the 70 Kd S6 Protein-Kinases*. *Cell*, 1992. **69**(7): p. 1227-1236.
305. Datan, E., et al., *mTOR/p70S6K signaling distinguishes routine, maintenance-level autophagy from autophagic cell death during influenza A infection*. *Virology*, 2014. **452**: p. 175-190.
306. Morales-Ibanez, O., et al., *Kinase analysis in alcoholic hepatitis identifies p90RSK as a potential mediator of liver fibrogenesis*. *Gut*, 2016. **65**(5): p. 840-851.
307. Wang, C., et al., *Inflammatory Stress Increases Hepatic CD36 Translational Efficiency via Activation of the mTOR Signalling Pathway*. *Plos One*, 2014. **9**(7).
308. Browning, J.D. and J.D. Horton, *Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury*. *Journal of Clinical Investigation*, 2004. **114**(2): p. 147-152.
309. Rogue, A., et al., *Gene Expression Changes Induced by PPAR Gamma Agonists in Animal and Human Liver*. *Ppar Research*, 2010.
310. VidalPuig, A., et al., *Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents*. *Journal of Clinical Investigation*, 1996. **97**(11): p. 2553-2561.
311. Matsusue, K., et al., *Liver-specific disruption of PPAR gamma in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes*. *Journal of Clinical Investigation*, 2003. **111**(5): p. 737-747.
312. Bauer, R.C., et al., *Tribbles-1 regulates hepatic lipogenesis through posttranscriptional regulation of C/EBP alpha*. *Journal of Clinical Investigation*, 2015. **125**(10): p. 3809-3818.
313. Ferretti, A.C., et al., *Protein kinase A signals apoptotic activation in glucose-deprived hepatocytes: participation of reactive oxygen species*. *Apoptosis*, 2012. **17**(5): p. 475-491.
314. Putti, R., et al., *Diet impact on mitochondrial bioenergetics and dynamics*. *Frontiers in Physiology*, 2015. **6**.
315. Zhao, M.T. and D.J. Klionsky, *AMPK-Dependent Phosphorylation of ULK1 Induces Autophagy*. *Cell Metabolism*, 2011. **13**(2): p. 119-120.
316. Hatori, M., et al., *Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet*. *Cell Metab*, 2012. **15**(6): p. 848-60.
317. Stubblefield, J.J., et al., *Temporal Control of Metabolic Amplitude by Nocturnin*. *Cell Rep*, 2018. **22**(5): p. 1225-1235.
318. Ghosh, S., et al., *Short chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency and short-term high-fat diet perturb mitochondrial energy metabolism and transcriptional control of lipid-handling in liver*. *Nutr Metab (Lond)*, 2016. **13**: p. 17.
319. Hardie, D.G., et al., *Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system*. *FEBS Lett*, 2003. **546**(1): p. 113-20.
320. Sakakibara, S., et al., *Acetic acid activates hepatic AMPK and reduces hyperglycemia in diabetic KK-A(y) mice*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **344**(2): p. 597-604.
321. Hardie, D.G., *AMP-activated protein kinase: a master switch in glucose and lipid metabolism*. *Rev Endocr Metab Disord*, 2004. **5**(2): p. 119-25.

322. Yamashita, H., et al., *Improvement of obesity and glucose tolerance by acetate in Type 2 diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007. **71**(5): p. 1236-43.
323. Wang, R.H., et al., *Hepatic Sirt1 deficiency in mice impairs mTorc2/Akt signaling and results in hyperglycemia, oxidative damage, and insulin resistance*. *J Clin Invest*, 2011. **121**(11): p. 4477-90.
324. Ramakrishnan, G., et al., *Sirt2 deacetylase is a novel AKT binding partner critical for AKT activation by insulin*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(9): p. 6054-66.
325. Li, M., et al., *Hepatic stellate cell-specific deletion of SIRT1 exacerbates liver fibrosis in mice*. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017. **1863**(12): p. 3202-3211.
326. Hirschey, M.D., et al., *SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation*. *Nature*, 2010. **464**(7285): p. 121-5.
327. Latipaa, P.M., et al., *Regulation of palmitoylcarnitine oxidation in isolated rat liver mitochondria. Role of the redox state of NAD(H)*. *Biochim Biophys Acta*, 1986. **875**(2): p. 293-300.
328. Ogawa, N., et al., *Biomimetic systems involving sequential redox reactions in glycolysis - the sulfur effect*. *Chem Commun (Camb)*, 2020. **56**(85): p. 12917-12920.
329. Robinson, J.B., Jr. and P.A. Srere, *Organization of Krebs tricarboxylic acid cycle enzymes in mitochondria*. *J Biol Chem*, 1985. **260**(19): p. 10800-5.
330. Hiromatsu, Y., et al., *Inhibitory effects of nicotinamide on recombinant human interferon-gamma-induced intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and HLA-DR antigen expression on cultured human endothelial cells*. *Immunol Lett*, 1992. **31**(1): p. 35-9.
331. Nomura, I., T. Kurashige, and T. Taniguchi, *Inhibitory effect of interferon-gamma-dependent induction of major histocompatibility complex class II antigen by expressing exogenous poly(ADP-ribose) synthetase gene*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991. **175**(2): p. 685-9.
332. Jackson, T.M., et al., *Large supplements of nicotinic acid and nicotinamide increase tissue NAD+ and poly(ADP-ribose) levels but do not affect diethylnitrosamine-induced altered hepatic foci in Fischer-344 rats*. *J Nutr*, 1995. **125**(6): p. 1455-61.
333. Romani, M., et al., *Niacin: an old lipid drug in a new NAD(+) dress*. *J Lipid Res*, 2019. **60**(4): p. 741-746.
334. Ganji, S.H., et al., *Niacin noncompetitively inhibits DGAT2 but not DGAT1 activity in HepG2 cells*. *J Lipid Res*, 2004. **45**(10): p. 1835-45.
335. Bellet, M.M. and P. Sassone-Corsi, *Mammalian circadian clock and metabolism - the epigenetic link*. *J Cell Sci*, 2010. **123**(Pt 22): p. 3837-48.
336. Zhuo, L., et al., *NAD blocks high glucose induced mesangial hypertrophy via activation of the sirtuins-AMPK-mTOR pathway*. *Cell Physiol Biochem*, 2011. **27**(6): p. 681-90.
337. Gomes, A.P., et al., *Declining NAD(+) induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging*. *Cell*, 2013. **155**(7): p. 1624-38.
338. Ryu, D., et al., *NAD+ repletion improves muscle function in muscular dystrophy and counters global PARylation*. *Sci Transl Med*, 2016. **8**(361): p. 361ra139.
339. Horton, J.L., et al., *Mitochondrial protein hyperacetylation in the failing heart*. *JCI Insight*, 2016. **2**(1).
340. Martin, A.S., et al., *Nicotinamide mononucleotide requires SIRT3 to improve cardiac function and bioenergetics in a Friedreich's ataxia cardiomyopathy model*. *JCI Insight*, 2017. **2**(14).
341. Wei, C.C., et al., *NAD replenishment with nicotinamide mononucleotide protects blood-brain barrier integrity and attenuates delayed tissue plasminogen activator-induced*

- haemorrhagic transformation after cerebral ischaemia*. Br J Pharmacol, 2017. **174**(21): p. 3823-3836.
342. Mouchiroud, L., et al., *The NAD(+)/Sirtuin Pathway Modulates Longevity through Activation of Mitochondrial UPR and FOXO Signaling*. Cell, 2013. **154**(2): p. 430-41.
343. Mills, K.F., et al., *Long-Term Administration of Nicotinamide Mononucleotide Mitigates Age-Associated Physiological Decline in Mice*. Cell Metab, 2016. **24**(6): p. 795-806.
344. Niren, N.M., *Pharmacologic doses of nicotinamide in the treatment of inflammatory skin conditions: a review*. Cutis, 2006. **77**(1 Suppl): p. 11-6.
345. Ren, J.H., et al., *Sirtuin 1 regulates hepatitis B virus transcription and replication by targeting transcription factor AP-1*. J Virol, 2014. **88**(5): p. 2442-51.
346. Firestein, R., et al., *The SIRT1 deacetylase suppresses intestinal tumorigenesis and colon cancer growth*. PLoS One, 2008. **3**(4): p. e2020.

APÉNDICE A. Composición de las dietas

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.

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

Teklad Diets are designed and manufactured for research purposes only.



© 2015 Envigo

Standard Product Form: Pellet

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

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

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

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

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

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

[†] 1 IU vitamin A = 0.3 µg retinol

[‡] 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 + Madison WI + envigo.com + tekladinfo@envigo.com + (800) 483-5523

0915

Teklad Custom Diet

TD.160547

29% Fat Diet



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

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

Key Features

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

Selected Nutrient Information¹

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

¹ Values are calculated from ingredient analysis or manufacturer data

Teklad Diets are designed & manufactured for research purposes only.

Key Planning Information

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

+ Lead time:
 · 2 weeks non-irradiated
 · 4 weeks irradiated

Product Specific Information

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

Options (Fees Will Apply)

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

Speak With A Nutritionist
 + (800) 483-5523
 + askanutritionist@envigo.com 

Contact Us
Obtain Pricing · Check Order Status
 + teklad@envigo.com
 + (800) 483-5523

International Inquiry (Outside USA or Canada)
 + askanutritionist@envigo.com

Place Your Order (USA & Canada)
Please Choose One
 + www.envigo.com/teklad-orders
 + tekladorders@envigo.com
 + (800) 483-5523
 + (608) 277-2066 facsimile

© 2015 Envigo

08/06/15

APÉNDICE B. Preparación de las soluciones para la tinción de ORO

B.1. Paraformaldehído al 4%

- 1.- Para preparar 40 mL de solución al 4%, pesar 1.6 g de formaldehído evitando la dispersión de partículas en el aire.
- 2.- Calentar ~30 mL de PBS 1X a 60°C y verterlo dentro de un tubo con tapa de 50 mL.
- 3.- Dentro de una campana de extracción, adicionar 1.6 g de paraformaldehído al PBS 1X.
- 4.- Agitar con el tubo cerrado hasta su completa disolución.
- 5.- Enfriar a 4°C antes de utilizar.

B.2. Rojo oleoso

- 1.- Añadir 100 mg de ORO a 16 mL de alcohol isopropílico al 99% y mezclar la solución en una placa magnética durante 2 hr a temperatura ambiente. Esta solución concentrada constituye el *stock* y puede reservarse a temperatura ambiente durante 6 meses o hasta que la solución se precipite.
- 2.- Preparar la solución de trabajo añadiendo 1.5 partes de la solución *stock* a una parte de agua destilada.
- 3.- Dejar precipitar la solución por 10 minutos a 4°C.
- 4.- Filtrar la solución a través de un filtro de 45 µm para remover los precipitados. Se recomienda utilizar esta solución en las próximas 6 h para evitar la aparición de precipitados de ORO en el tejido.

B.3. Hematoxilina de Gill I

- 1.- Mezclar 730 mL de agua destilada con 250 mL de etilenglicol por 30 minutos.
- 2.- Agregar hematoxilina en polvo anhidra (2gr) y agitar mediante una placa magnética por 30 minutos.
- 3.- Adicionar 0.2 gr de Yodato de sodio y agitar por 30 minutos.
- 4.- Adicionar 17 gr de sulfato de aluminio, mezclar durante 3.5 horas. Agregar 0.2 mL de ácido acético glacial y completar 4 horas de agitación.

B.4. Solución de Litio

- 1.- Preparar la solución *stock* añadiendo 1.5g en 100 mL de agua destilada y agitar hasta que la mayor parte del soluto de halla disuelto. Debido a que ésta es una solución saturada se observará la formación de un precipitado que no podrá ser eliminado. Esta solución puede ser almacenada a temperatura ambiente por 6 meses.

2.- Para la obtención de la solución de trabajo, tomar la parte líquida del *stock* y disolverla en proporción 1:5 [*stock*: agua destilada]. Almacenar a temperatura ambiente y utilizar repetidamente hasta que pierda su transparencia por efecto de las tinciones.

APÉNDICE C. Primers

Tabla Suplementaria 1. Secuencia de oligos utilizados en la reacción de qPCR

Primer	Secuencia
<i>Abcd1 Fw</i>	GCC AGG GTG TAC GAG ATG
<i>Abcd1 Rv</i>	CCT CTA CAT GGA CAC CAG ACT G
<i>Acaa1b Fw</i>	CA TGC TGA GAT TGT GCC TGT G
<i>Acaa1b Rv</i>	GGT AGA GCC TCC ATC CTT GAA G
<i>Acot2 Fw</i>	CTG AGA GCA AGC AGG TTG TG
<i>Acot2 Rv</i>	GCT CAG CGT CGC ATT TGT C
<i>Acox1 Fw</i>	CAT CAC AGG GGC TCA GAT GTC
<i>Acox1 Rv</i>	CAG TGG GGA CTT CTT GGC
<i>Acsm1 Fw</i>	CCT TGA TTC TGC CCC GAG TG
<i>Acsm1 Rv</i>	GTC CTT GGC TTT CAG TTG GGT
<i>B2m Fw</i>	GGT CTT TCT GGT GCT TGT CTC A
<i>B2m Rv</i>	GTT CGG CTT CCC ATT CTC C
<i>Bmal1 Fw</i>	CCA AGA AAG TAT GGA CAC AGA CAA A
<i>Bmal1 Rv</i>	GCA TTC TTG ATC CTT CCT TGG T
<i>Clock Fw</i>	ACCACAGCAACAGCAACAAC
<i>Clock Rv</i>	GGCTGCTGAACTGAAGGAAG
<i>Cpt1a Fw</i>	CCA TGA AGC CCT CAA ACA GAT C
<i>Cpt1a Rv</i>	ATC ACA CCC ACC ACC ACG ATA
<i>Cpt2 Fw</i>	CAG AAG CCT CTC TTG AAT GAC AGC
<i>Cpt2 Rv</i>	GCA GCT CCT TCC CAA TGC
<i>Crat Fw</i>	AAG AAT GGG CTC ACA CCA AG
<i>Crat Rv</i>	CGC TCC AGT CCC TTC TGT AG
<i>Cry1 Fw</i>	CTGGCGTGGAAGTCATCGT
<i>Cry1 Rv</i>	CTGTCCGCCATTGAGTTCTATG
<i>Cyp4a10 Fw</i>	ACT TCC CAA GTG CCT TTC C
<i>Cyp4a10 Rv</i>	TAC GCA CCA TTA GCC TTT GG
<i>Cyp4a14 Fw</i>	CAA GGC AGT GTT CAG TTG GAT G
<i>Cyp4a14 Rv</i>	CAG GCG AAA GAA AGT CAG GTT G
<i>Cyp4a31 Fw</i>	CCT CTG TGT TCT GTC TGC TCC
<i>Cyp4a31 Rv</i>	GTG AAA GGG CGG TGA TGG
<i>Dbp Fw</i>	GCT CCA GTA CTT CTC ATC CTT CTG T
<i>Dbp Rv</i>	AAT GAC CTT TGA ACC TGA TCC CGC T
<i>Echs1 Fw</i>	GGG CTG ATC CAG TTG AAC C
<i>Echs1 Rv</i>	CAC CCA CAG CAG GAT CTT G
<i>Lcn2 Fw</i>	CAG AAG GCA GCT TTA CGA TGT AC
<i>Lcn2 Rv</i>	TCT GAT CCA GTA GCG ACA GC

<i>Mt1 Fw</i>	ATG GA CCC CAA CTG CTC CTG
<i>Mt1 Rv</i>	CCC TGG GCA CAT TTG GAG C
<i>Mt2 Fw</i>	GCA AAG AGG CTT CCG ACA AG
<i>Mt2 Rv</i>	AGG CTA GGC TTC TAC ATG GTC T
<i>mtCOX1 Fw</i>	ACC ATC ATT TCT CCT TCT CCT A
<i>mtCOX1 Rv</i>	TAG ATT TCC GGC TAG AGG TG
<i>Nfil3 Fw</i>	GGTTACAGCCGCCCTTTCTT
<i>Nfil3 Rv</i>	TCCGGCACAGGGTAA ATCTG
<i>Noct Fw</i>	CACTCTCCCATTCGCGTCAT
<i>Noct Rv</i>	AGGCACTTCCTCTCTTCCCA
<i>Per1 Fw</i>	GTG CAC AGC ACC CAG TTC CC
<i>Per1 Rv</i>	ACC AGC GTG TCA TGA TGA CAT A
<i>Per2 Fw</i>	GGCTTCACCATGCCTGTTGT
<i>Per2 Rv</i>	GGAGTTATTTCCGAGGCAAGTGT
<i>Rev-Erba Fw</i>	GGG CAC AAG CAA CAT TAC CA
<i>Rev-Erba Rv</i>	CAC GTC CCC ACA CAC CTT AC
<i>Rplp1 Fw</i>	GTG GTG CTG CTC CAT CC
<i>Rplp1 Rv</i>	GGT TCA GCT CTT TAT TAG CCA ACT TA
<i>S18 Fw</i>	TGG CTC ATT AAA TCA GTT ATG GT
<i>S18 Rv</i>	GTC GGC ATG TAT TAG CTC TAG
<i>Slc27a2 Fw</i>	ATG CCG TGT CCG TCT TTT AC
<i>Slc27a2 Rv</i>	CTT CAG ACC TCC ACG ACT CC
<i>Tbp Fw</i>	CAA ACC CAG AAT TGT TCT CCT T
<i>Tbp Rv</i>	ATG TGG TCT TCC TGA ATC CCT
<i>Tef Fw</i>	TCTTTCAGCCCTCGGAAACC
<i>Tef Rv</i>	GCAGGGTCAGGGTTGAAGTT

APÉNDICE D. Anticuerpos

Tabla Suplementaria 2. Anticuerpos utilizados para la detección de proteínas por Western Blot

Anticuerpo	Procedencia	PM(kDa)	Secundario	# Producto	Dilución	Vehículo
AKT	Cell Signaling	60	Anti-Rabbit	9272	1:1000	2
AKT (Ser473)	Cell Signaling	60	Anti-Rabbit	9271	1:1000	2
AMPK α (D5A2)	Cell Signaling	62	Anti-Rabbit	5831	1:1000	2
Anti-rabbit IgG, HRP	Cell Signaling	NA	Anti-Rabbit	7074	1:1000	3
Beclin-1 (D40C5)	Cell Signaling	60	Anti-Rabbit	3495	1:1000	2
BMAL1	Abcam	90	Anti-Rabbit	Ab3350	1:1000	2
C/EBP alfa	Santa Cruz	55/43	Anti-Mouse	sc-365318	1:500	1
CRY1	Bethyl	74	Anti-Rabbit	A302-614A	1:1000	2
GAPDH (HRP)	Genetex	NA	NA	GTX627408-01	1:120000	2
mTOR	Cell Signaling	289	Anti-Rabbit	2983	1:1000	2
P84	Genetex	84	NA	GTX70220-01	1:1000	1
PER2	Alpha Diagnostics	190	Anti-Rabbit	PER21-A	1:2000	2
Phospho-4E-BP1 (Thr37/46)	Cell Signaling	15 a 20	Anti-Rabbit	2855	1:1000	2
Phospho-AMPK α (Thr172)	Cell Signaling	62	Anti-Rabbit	50081	1:1000	2
Phospho-Beclin-1 (Ser93)	Cell Signaling	60	Anti-Rabbit	14717	1:1000	2
Phospho-mTOR (Ser2448)	Cell Signaling	289	Anti-Rabbit	5536	1:1000	2
Phospho-p70 S6 Kinase (Ser371)	Cell Signaling	70, 85	Anti-Rabbit	9208	1:1000	2
Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389)	Cell Signaling	70, 85	Anti-Rabbit	9234	1:1000	2
Phospho-p90RSK (Ser380)	Cell Signaling	90	Anti-Rabbit	11989	1:1000	2
Phospho-p90RSK (Thr359)	Cell Signaling	90	Anti-Rabbit	8753	1:1000	2
Phospho-p90RSK (Thr573)	Cell Signaling	90	Anti-Rabbit	9346	1:1000	2
Phospho-Raptor (Ser792)	Cell Signaling	150	Anti-Rabbit	2083	1:1000	2
Phospho-ULK1 (Ser555)	Cell Signaling	140-150	Anti-Rabbit	5869	1:1000	2
PPAR gama (81B8)	Cell Signaling	53/57	Anti-Rabbit	2443	1:1000	4
Raptor (24C12)	Cell Signaling	150	Anti-Rabbit	2280	1:1000	2
REV-ERB α	Cell Signaling	78	Anti-Rabbit	13418	1:1000	2
RSK1/RSK2/RSK3 (32D7)	Cell Signaling	90	Anti-Rabbit	9355	1:1000	2
ULK1 (D8H5)	Cell Signaling	150	Anti-Rabbit	8054	1:1000	2
α -Tubulina (B-5-1-2)	Sigma	NA	Anti-Mouse	T5168	1:80000	4

(1) 5% w/v BSA,

1X TBS 0.05% Tween@20

(2) 5% w/v BSA, 1X TBS 0.1% Tween@20

(3) 5% w/v leche libre de grasa, 1X TBS 0.1% Tween@20

(4) 1X TBS 0.05% Tween@20

Apéndice E. Western blots por ZT

En este anexo se incluyen los western blots en base a los cuales se realizaron las imágenes que se muestran en los avances. En ellos se analiza la expresión de las proteínas en los grupos control (CD), dieta rica en grasa (HF) y suministrado con NAD+ al ZT 11 (HFN) en ZTs de manera individual.

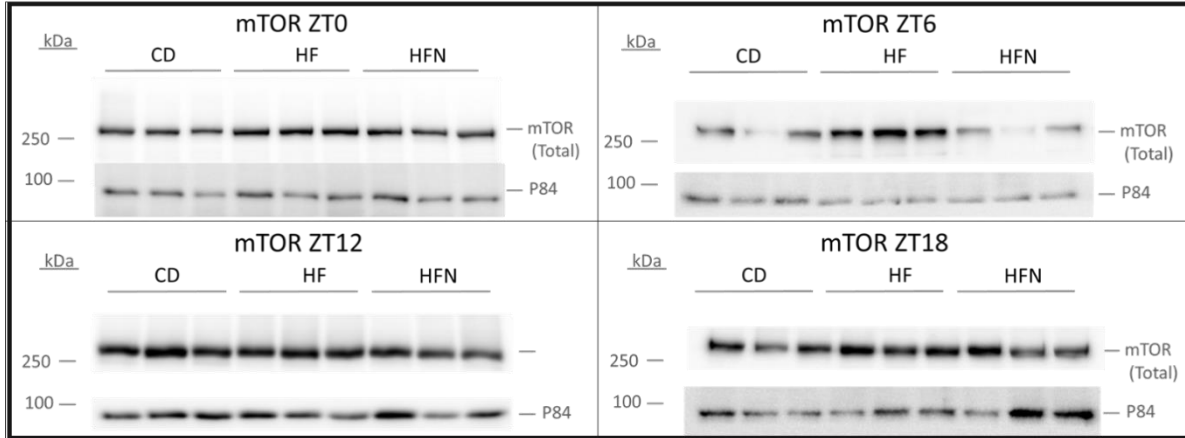


Fig. Suplementaria 2. Detección de la proteína mTOR por medio de Western Blot al ZT 0, 6, 12 y 18. Cada WB incluye los grupos CD, HF y HF (N = 3), en sus ZT correspondientes. Se incluye la imagen de la detección de P84 como control de carga.

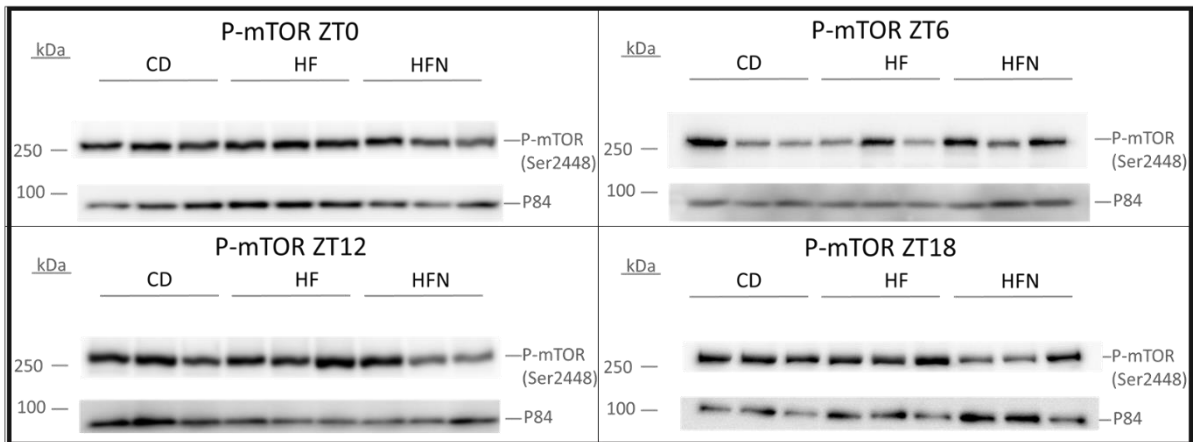


Fig. Suplementaria 3. Detección de la fosforilación en la Ser2448 de mTOR por medio de Western Blot al ZT 0, 6, 12 y 18. Cada WB incluye los grupos CD, HF y HF (N = 3), en sus ZT correspondientes. Se incluye la imagen de la detección de P84 como control de carga.

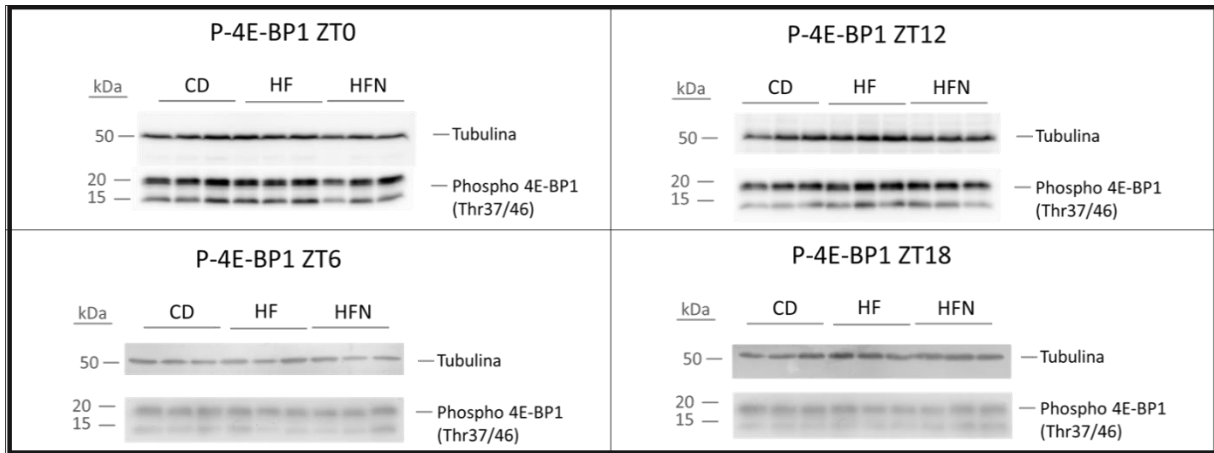


Fig. Suplementaria 4. Detección de la fosforilación en la Thr 37 y 46 de E-BP1 por medio de Western Blot al ZT 0, 6, 12 y 18. Cada WB incluye los grupos CD, HF y HF (N = 3), en sus ZT correspondientes. Se incluye la imagen de la detección de Tubulina como control de carga.

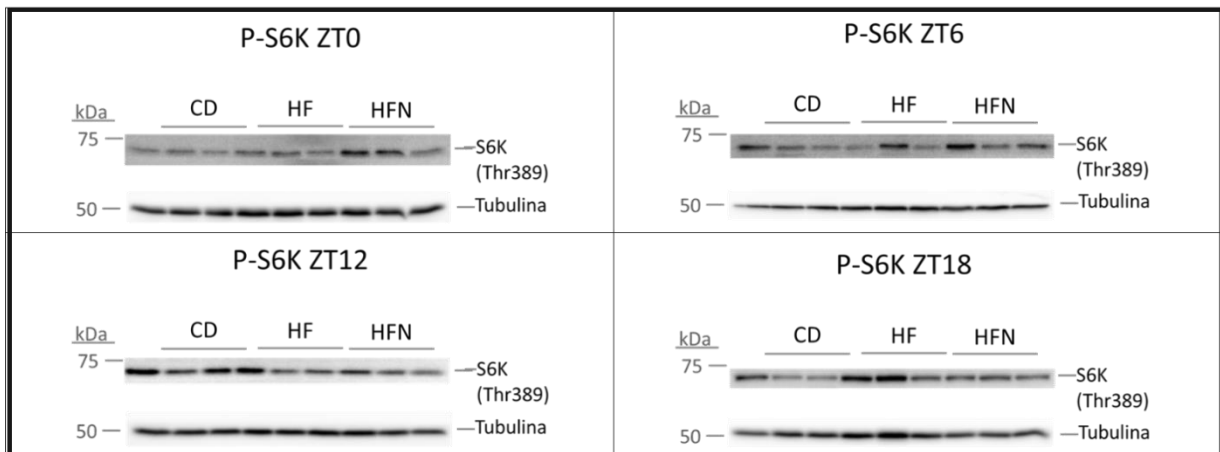


Fig. Suplementaria 5. Detección de la fosforilación en la Thr 389 de S6K por medio de Western Blot al ZT 0, 6, 12 y 18. Cada WB incluye los grupos CD, HF y HF (N = 3), en sus ZT correspondientes. Se incluye la imagen de la detección de Tubulina como control de carga.

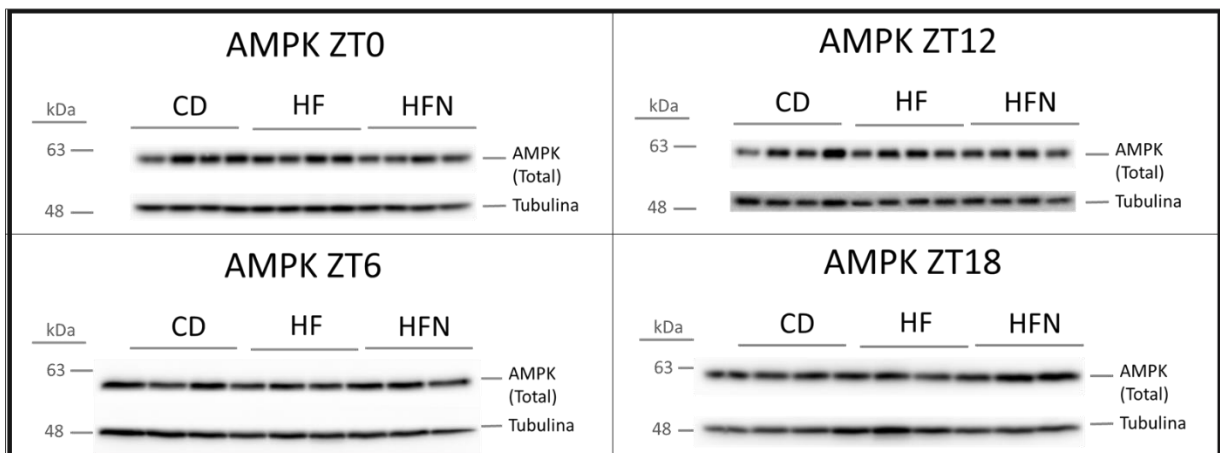


Fig. Suplementaria 6. Detección de la proteína AMPK por medio de Western Blot al ZT 0, 6, 12 y 18. Cada WB incluye los grupos CD, HF y HF (ZT 6 y 18 N = 3; ZT 0 y 12 N = 4), en sus ZT correspondientes. Se incluye la imagen de la detección de Tubulina como control de carga.

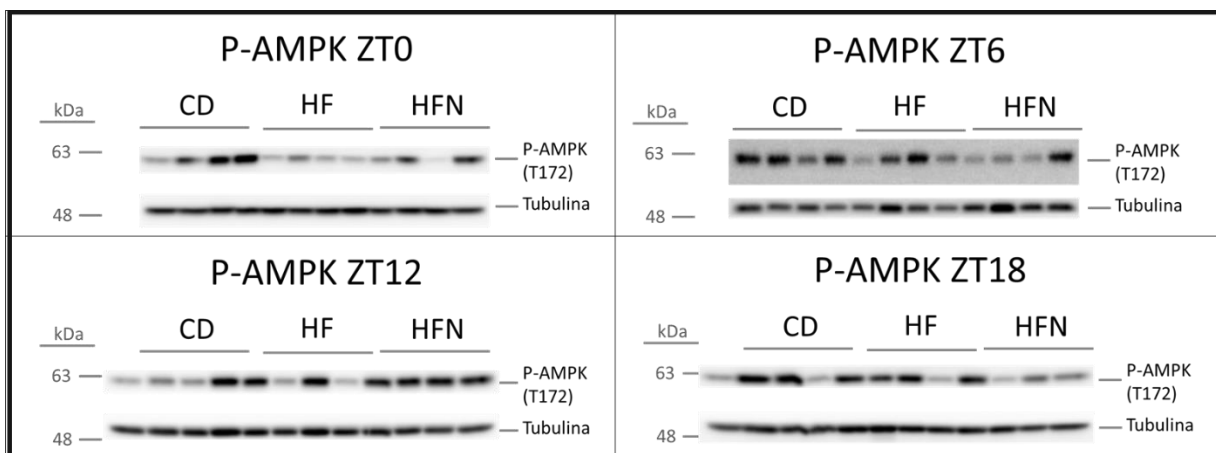


Fig. Suplementaria 7. Detección de la fosforilación en la Thr172 de AMPK por medio de Western Blot al ZT 0, 6, 12 y 18. Cada WB incluye los grupos CD, HF y HF (N = 4), en sus ZT correspondientes. Se incluye la imagen de la detección de Tubulina como control de carga.

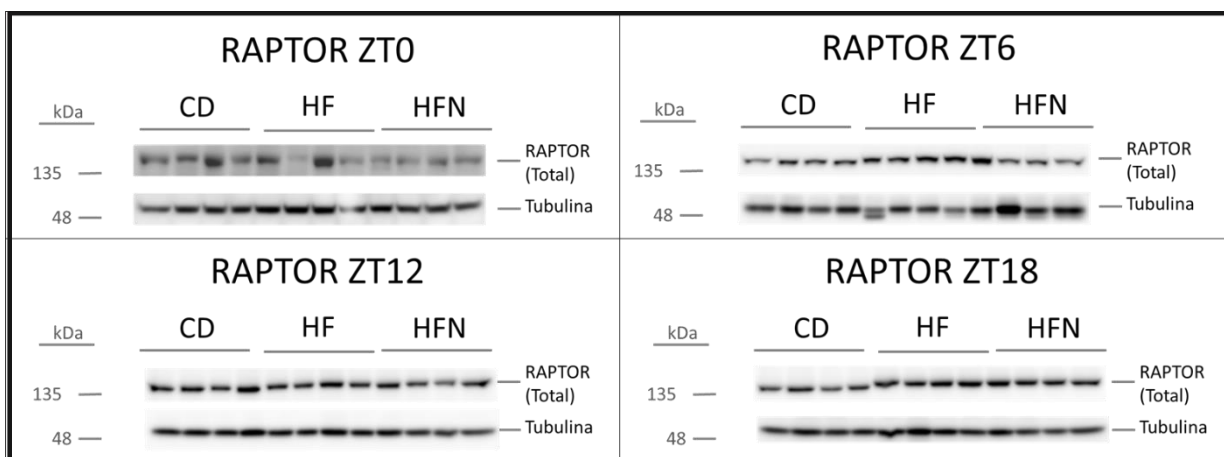


Fig. Suplementaria 8. Detección de la proteína RAPTOR por medio de Western Blot al ZT 0, 6, 12 y 18. Cada WB incluye los grupos CD, HF y HF (N = 4), en sus ZT correspondientes. Se incluye la imagen de la detección de Tubulina como control de carga.

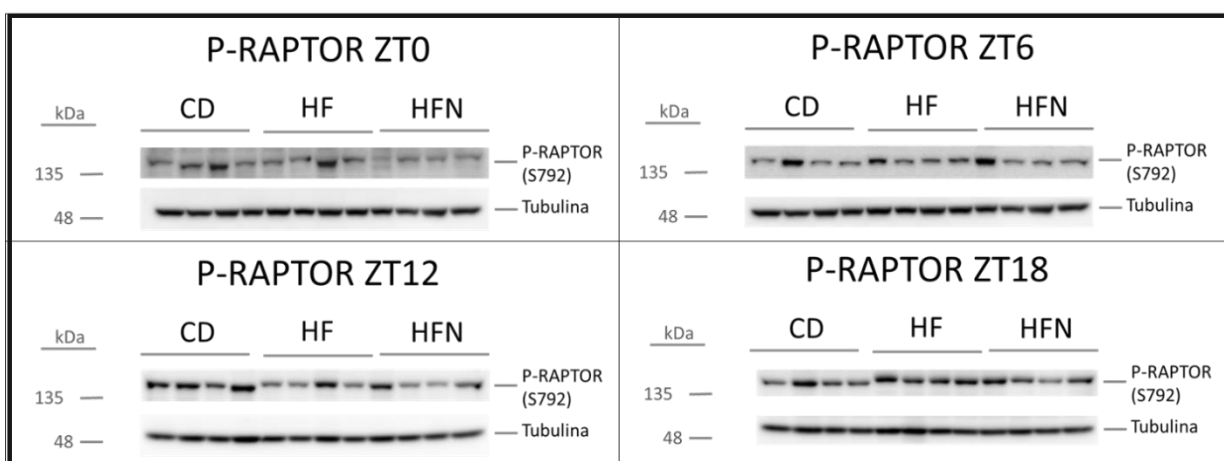


Fig. Suplementaria 9. Detección de la fosforilación en la Serina 792 de RAPTOR por medio de Western Blot al ZT 0, 6, 12 y 18. Cada WB incluye los grupos CD, HF y HF (N = 4), en sus ZT correspondientes. Se incluye la imagen de la detección de Tubulina como control de carga.

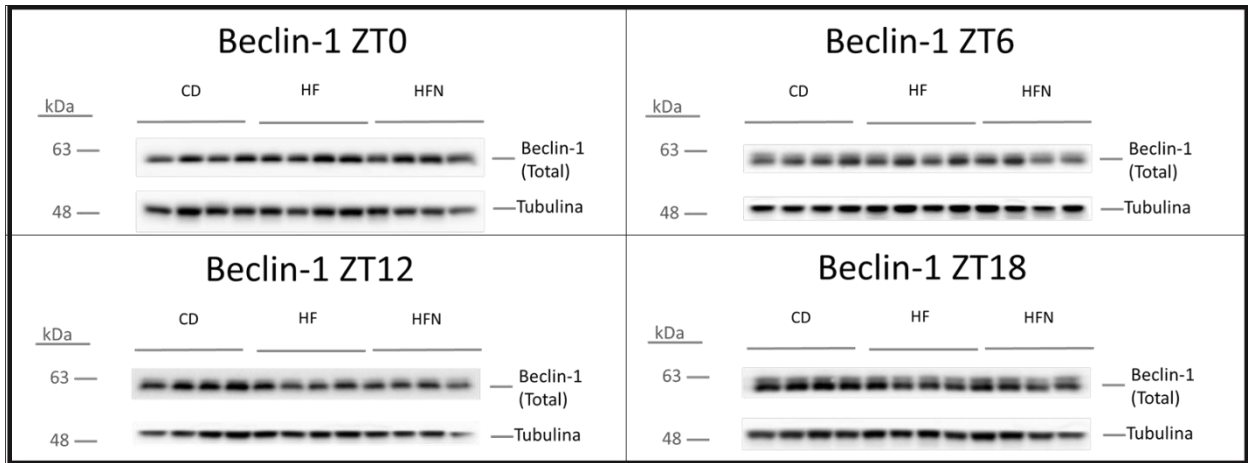


Fig. Suplementaria 10. Detección de la proteína Beclin-1 por medio de Western Blot al ZT 0, 6, 12 y 18. Cada WB incluye los grupos CD, HF y HF (N = 4), en sus ZT correspondientes. Se incluye la imagen de la detección de Tubulina como control de carga.

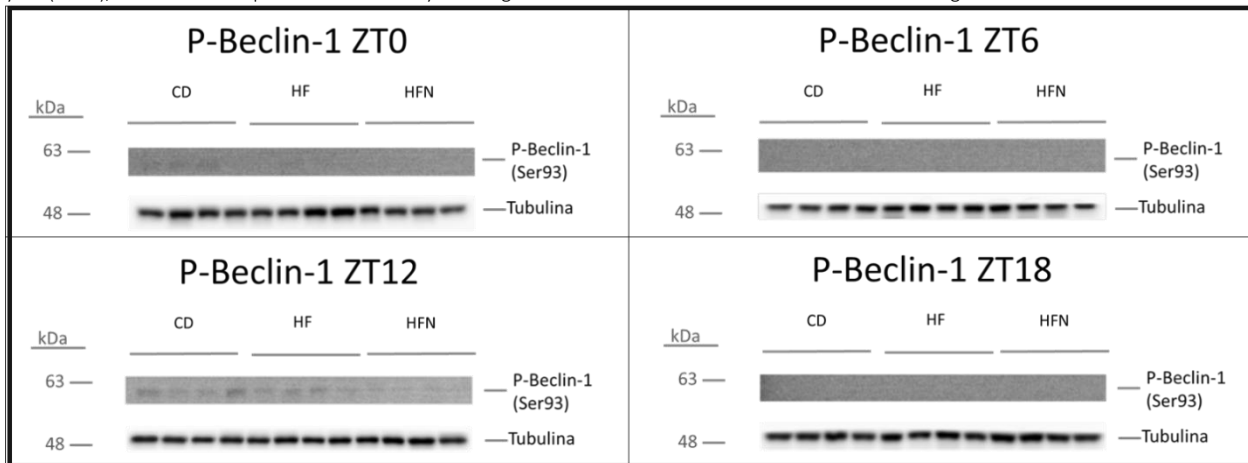


Fig. Suplementaria 11. Detección de la fosforilación en la Serina 93 de Beclin-1 por medio de Western Blot al ZT 0, 6, 12 y 18. Cada WB incluye los grupos CD, HF y HF (N = 4), en sus ZT correspondientes. Se incluye la imagen de la detección de Tubulina como control de carga.

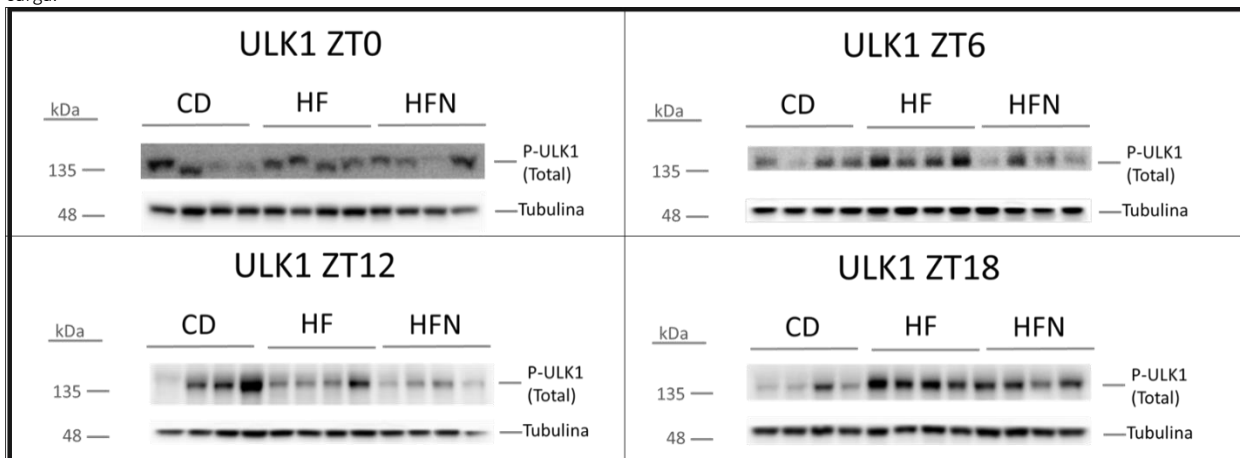


Fig. Suplementaria 12. Detección de la proteína ULK1 por medio de Western Blot al ZT 0, 6, 12 y 18. Cada WB incluye los grupos CD, HF y HF (N = 4), en sus ZT correspondientes. Se incluye la imagen de la detección de Tubulina como control de carga.

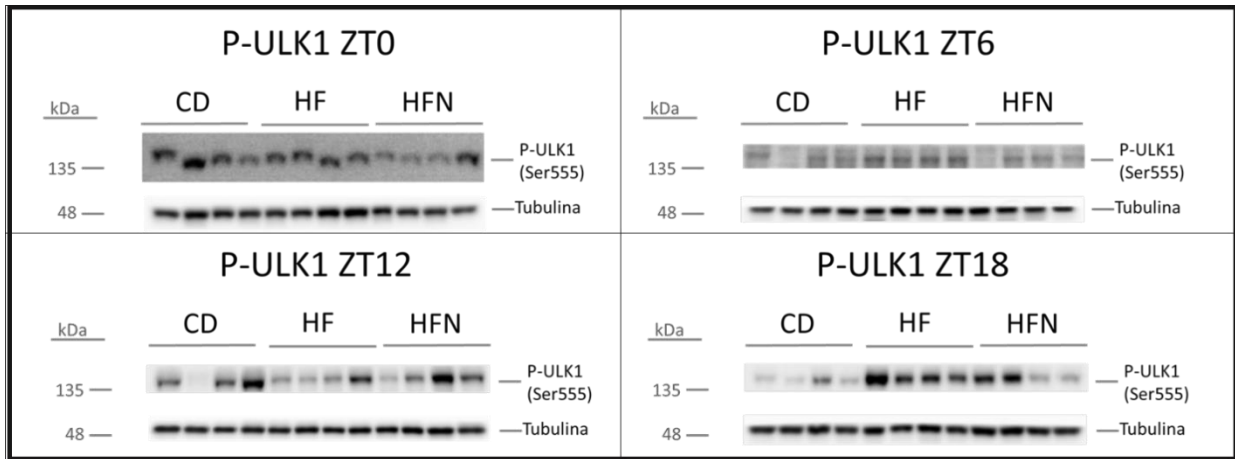


Fig. Suplementaria 13. Detección de la fosforilación en la Serina 555 de ULK1 por medio de Western Blot al ZT 0, 6, 12 y 18. Cada WB incluye los grupos CD, HF y HF (N = 4), en sus ZT correspondientes. Se incluye la imagen de la detección de Tubulina como control de carga.

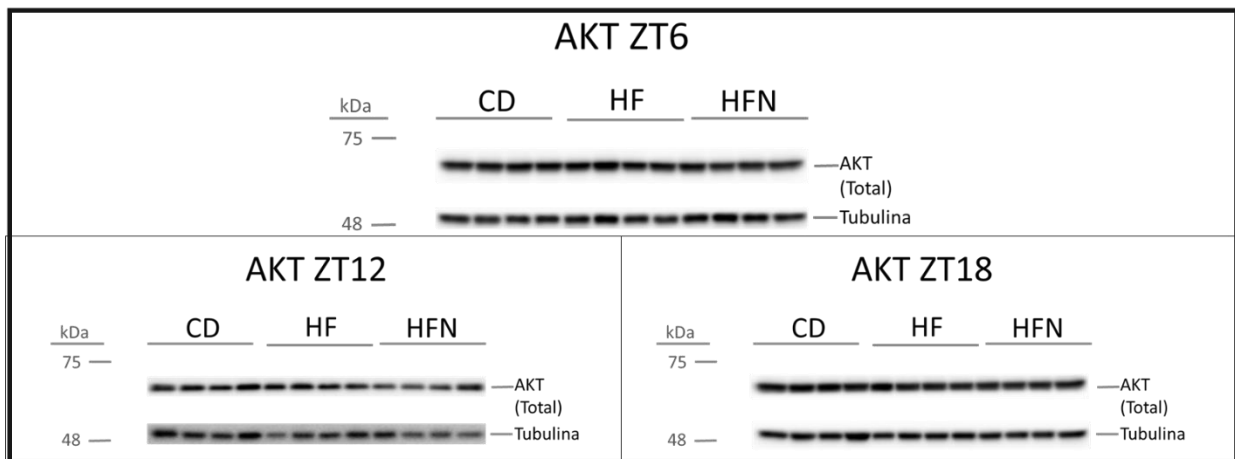


Fig. Suplementaria 14. Detección de la proteína AKT por medio de Western Blot al ZT 6, 12 y 18. Cada WB incluye los grupos CD, HF y HF (N = 4), en sus ZT correspondientes. Se incluye la imagen de la detección de Tubulina como control de carga.

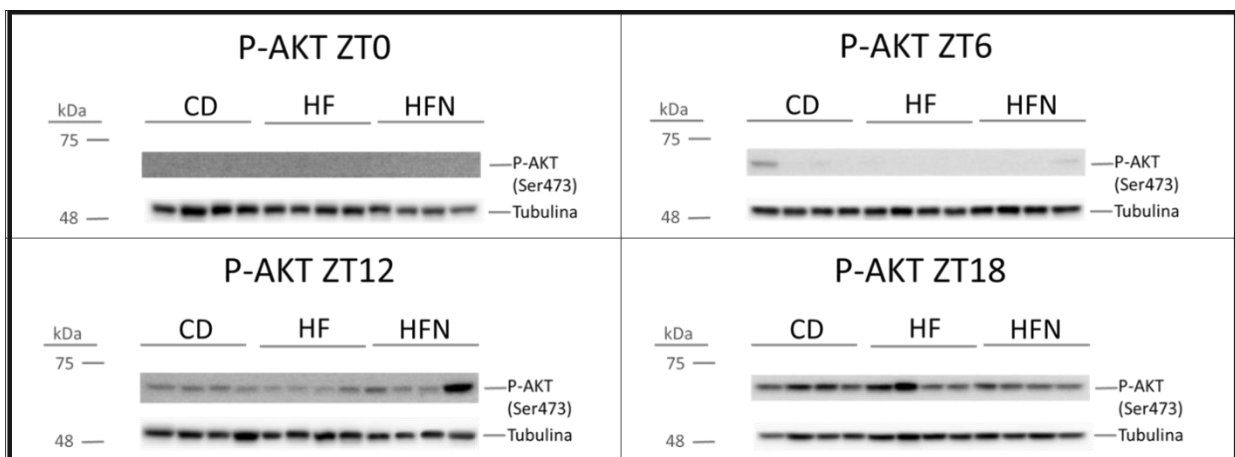


Fig. Suplementaria 15. Detección de la fosforilación en la Serina473 de AKT por medio de Western Blot al ZT 0, 6, 12 y 18. Cada WB incluye los grupos CD, HF y HF (N = 4), en sus ZT correspondientes. Se incluye la imagen de la detección de Tubulina como control de carga.

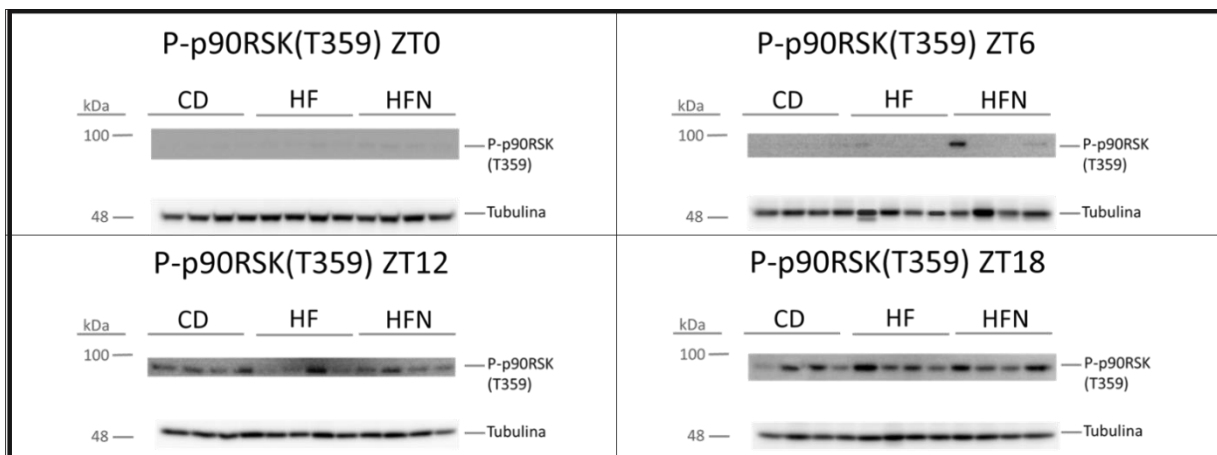


Fig. Suplementaria 16. Detección de la fosforilación en la Treonina 359 de p90RSK por medio de Western Blot al ZT 0, 6, 12 y 18. Cada WB incluye los grupos CD, HF y HF (N = 4), en sus ZT correspondientes. Se incluye la imagen de la detección de Tubulina como control de carga.

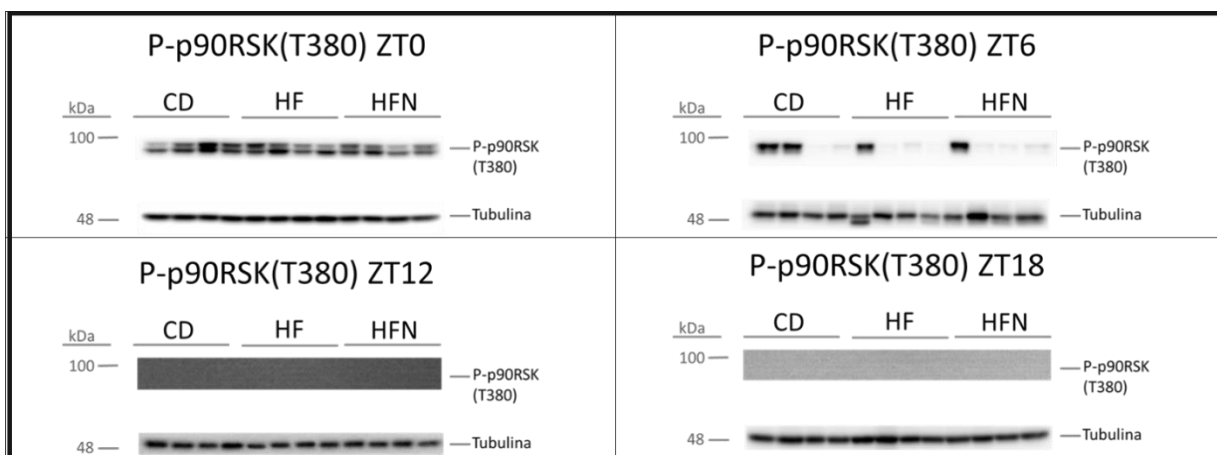


Fig. Suplementaria 17. Detección de la fosforilación en la Treonina 380 de p90RSK por medio de Western Blot al ZT 0, 6, 12 y 18. Cada WB incluye los grupos CD, HF y HF (N = 4), en sus ZT correspondientes. Se incluye la imagen de la detección de Tubulina como control de carga.

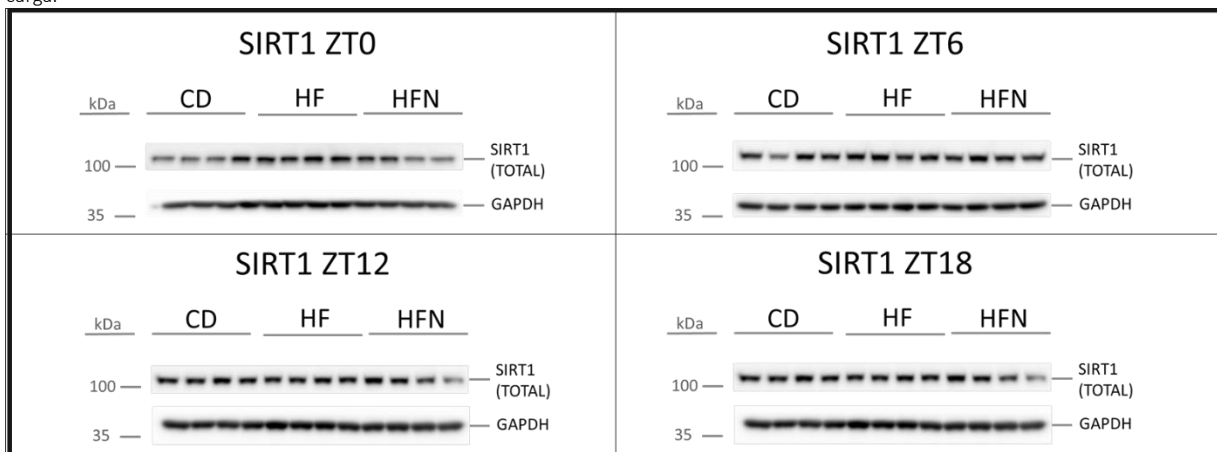


Fig. Suplementaria 18. Detección de la proteína SIRT1 por medio de Western Blot al ZT 0, 6, 12 y 18. Cada WB incluye los grupos CD, HF y HF (N = 4), en sus ZT correspondientes. Se incluye la imagen de la detección de Tubulina como control de carga.

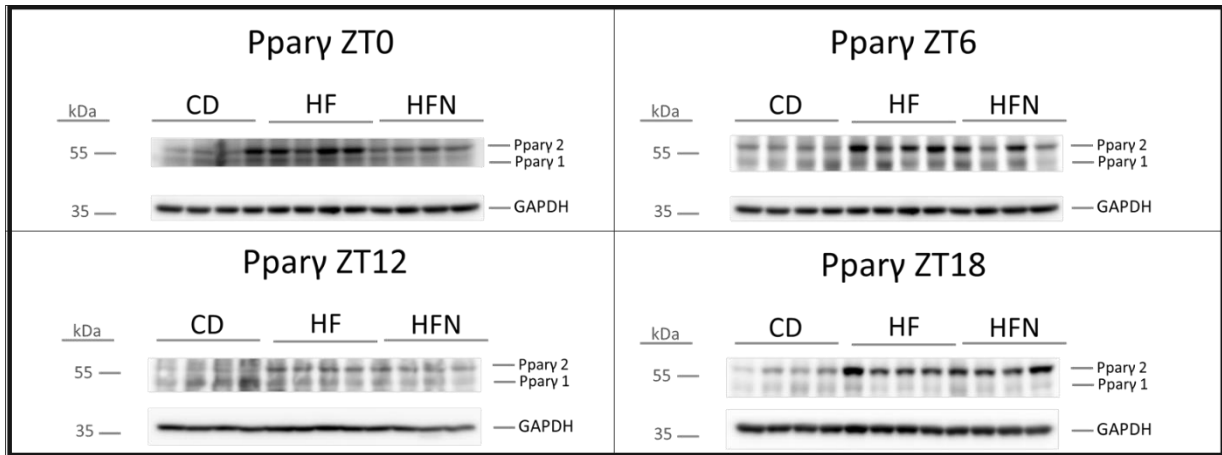


Fig. Suplementaria 19. Detección de la proteína Pparγ por medio de Western Blot al ZT 0, 6, 12 y 18. Cada WB incluye los grupos CD, HF y HF (N = 4), en sus ZT correspondientes. Se incluye la imagen de la detección de Tubulina como control de carga.

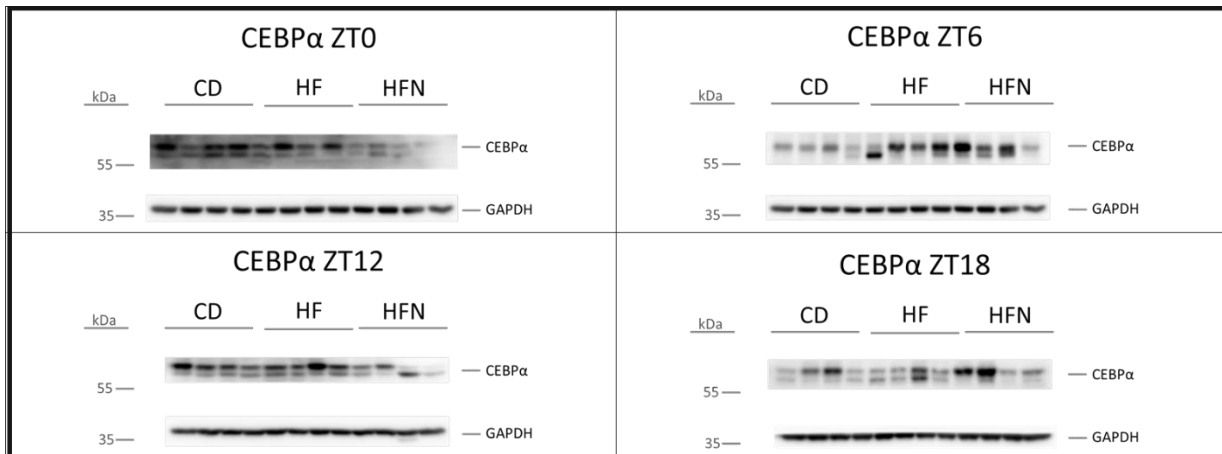


Fig. Suplementaria 20. Detección de la proteína CEBPα por medio de Western Blot al ZT 0, 6, 12 y 18. Cada WB incluye los grupos CD, HF y HF (N = 4), en sus ZT correspondientes. Se incluye la imagen de la detección de Tubulina como control de carga.

Apéndice F. Densitometría de las proteínas estudiadas por WB

