



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Estudio de los cambios diurnos en la accesibilidad a la cromatina del tejido adiposo blanco de ratones sometidos a un paradigma de acceso restringido al alimento”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Mauricio Alberto Basulto Almeida

Dra. Lorena Aguilar Arnal
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

Dra. Mayra Furlan Magaril
[Instituto de Fisiología Celular](#)
Dra. Viviana del Carmen Valadez Graham
[Instituto de Biotecnología](#)

Ciudad Universitaria, Cd de México. Marzo, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. Lorena Aguilar Arnal en el departamento de Biología Celular perteneciente al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y bajo la guía Dra. Mayra Furlan Magaril del IFC y la Dra. Viviana del Carmen Valadez Graham en calidad de miembros del comité tutor. Agradezco a las doctoras por su contribución en mi formación y su guía para la realización del presente proyecto.

Agradezco al programa de Maestría en Ciencias Bioquímicas al igual que a todos los profesores en las distintas asignaturas que tome. De igual manera agradezco a CONACyT por el apoyo económica otorgado mediante el programa de Becas Nacionales para Estudios de Posgrado 2021.

Agradezco ampliamente a la Mtra. En Ciencias Marcia Bustamante Zepeda por su constante apoyo técnico, así como a mis amigos y compañeros de laboratorios Roberto Valiente, Roman Sitten, Alejandro Alarcón, Iraiz Nuñez, Edgar Sánchez, Mirna González, Luis Ricardo Hernández y la Dra. Lucia Mendoza, quienes compartieron conmigo parte de su conocimiento al igual que a mi compañero de posgrado Luis Tenorio Hernández y todos los demás integrantes del laboratorio de la Dra. Mayra Furlan Magaril, y en particular a la Mtra. En Ciencias Rosario Pérez Molina, por su valioso apoyo técnico.

Hago constar mi agradecimiento a la Unidad de Modelos Biológicos a cargo del Dr. Víctor Daniel Garzón Cortes y en especial a la MVZ Rubi Elizabeth, así como también agradezco al departamento de bioinformática del IIB y a la Unidad de Bioinformática y Manejo de la Información del IFC a cargo del Dr. Cesar Augusto Poot Hernández.

Este trabajo fue realizado con el apoyo y financiamiento del proyecto no. FORDECYT – PRONACES/15758/2020 al igual que del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-DGAPA de la UNAM, IN208022).

Índice de contenidos

Lista de abreviaturas	6
1. Resumen gráfico.....	8
2. Resumen.....	8
3. Abstract	10
4. Introducción	11
4.1. Ciclos Circadianos.....	11
4.1.1. Arquitectura del reloj circadiano de mamíferos	12
4.1.2. El reloj molecular.....	14
4.2. La obesidad.....	16
4.3. Tratamiento de la obesidad y patrones de alimentación diurnos.	22
4.4. El reloj circadiano y el metabolismo	24
4.5. Accesibilidad a la cromatina y reorganización rítmica.....	26
5. Justificación	30
6. Pregunta de investigación:.....	31
7. Hipótesis.....	31
8. Objetivos	32
8.1. Objetivo general.....	32
8.2. Objetivos específicos.....	32
9. Metodología	33
9.1. Generación modelo experimental	33
9.2. Test de tolerancia a la glucosa (TTG)	34
9.3. Test de sensibilidad a la insulina (TSI)	34
9.4. Aislamiento de núcleos	35
9.5. Extracción de DNA nuclear.....	36
9.6. Extracción DNA de tejido adiposo.....	36
9.7. Extracción de RNA	37
9.8. Síntesis de cDNA.....	37
9.9. PCR cuantitativa (qPCR)	38
9.10. Enriquecimiento de DNA nuclear versus DNA total.....	38
9.11. ATAC-seq	39

9.11.1.	Reacción de transposición.....	39
9.11.2.	Amplificación de la librería.....	39
9.11.3.	Purificación de librería amplificada.....	40
9.11.4.	Análisis de datos ATAC-seq	41
10.	Resultados	43
10.1.	Generación del modelo de estudio	43
10.2.	Estandarización del aislamiento de núcleos de células de tejido adiposo.....	52
10.3.	Estandarización de la técnica de ATAC-seq.....	57
10.4.	Generación de librerías de accesibilidad - grupo HF.....	62
10.4.1.	Curva de incubación Tn5	65
10.5.	Análisis de las librerías de accesibilidad del grupo HF	67
11.	Discusión	78
12.	Conclusiones.....	88
13.	Bibliografía	89
14.	Apéndices	99
14.1.	Composición de las dietas	99
14.2.	Oligonucleotidos ATAC-seq	101
14.3.	Oligonucleótidos control de regiones abiertas	101
14.4.	Oligonucleótidos control de regiones abiertas específicos de tejido adiposo.....	101
14.5.	Control de calidad de secuencias	101

Índice de figuras

Figura 1. Organización anatómica circadiana en mamíferos.	13
Figura 2. Organización de la maquinaria circadiana molecular central en mamíferos.	15
Figura 3. Efectos de la obesidad en el tejido adiposo blanco.	21
Figura 4. Efectos de una alimentación restringida en tiempo (TRF) respecto a una alimentación ad libitum.	23
Figura 5. Oscilaciones cíclicas en el estado de apertura de la cromatina.	28
Figura 6. Curva de amplificación de librería de accesibilidad	40
Figura 7. Descripción general de los pasos a seguir para el análisis de datos generados mediante ATAC-seq.	42
Figura 8. Esquema de trabajo de la generación de los modelos.	43
Figura 10. Registro del consumo de Kcal por semana de los distintos grupos de estudio.	46
Figura 11. Consumo de alimento total y consumo de alimento respecto al peso de los modelos.	47
Figura 12. Consumo de alimento total y respecto al peso de los modelos en distintos puntos temporales del estudio.	48
Figura 13. Cambios en la tolerancia de glucosa en los modelos pertenecientes a los distintos grupos de estudio.	50
Figura 14. Cambios en la sensibilidad a insulina en los modelos pertenecientes a los distintos grupos de estudio.	51
Figura 15. Diferencias fenotípicas entre ratones de los grupos de estudio.	52
Figura 16. Aislamiento de núcleos	53
Figura 17. Aislamiento de núcleos por metodología de Van Hauweart	54
Figura 18. Cociente de amplificación Cox/18S por qPCR en muestras de tejido adiposo blanco.	55
Figura 19. Alistamiento de núcleos de tejido adiposo blanco por método de Van Hauweart modificado.	56
Figura 20. Comparación del número de núcleos obtenidos por los distintos métodos de aislamiento.	56
Figura 21. Distribución de tamaños de la librería de ATAC-seq.	58
Figura 22. Evaluación de la accesibilidad de regiones específicas del genoma librerías de ATAC-seq.	59
Figura 23. Visualización del análisis de los datos del ATACseq piloto.	61
Figura 24. Anotación de los sitios genómicos donde se encuentran los picos de accesibilidad la librería de ATAC-piloto.	62
Figura 25. Observación de los núcleos aislados de las muestras de WAT de modelos obesos.	63

Figura 26. Distribución de tamaño de librerías de ATACseq Ronda 1.....	64
Figura 27. Distribución de tamaño de librerías de ATACseq Ronda 2.....	65
Figura 28. Distribución de tamaño de librerías de accesibilidad.	66
Figura 29. Distribución de tamaño de librerías de accesibilidad.	66
Figura 30. Distribución de los fragmentos de las librerías.	69
Figura 31. Análisis de enriquecimiento de los sitios adyacentes al TSS.....	70
Figura 32. Anotación de los sitios genómicos donde se encuentran los picos de accesibilidad.....	71
Figura 33. Datos de ATAC-seq en distintos genes representativos con accesibilidad en WAT.	72
Figura 34. Datos de ATAC-seq en distintos genes sin accesibilidad en WAT.	73
Figura 35. Datos de ATAC-seq en genes codificantes para elementos del reloj circadiano.	76
Figura 36. Visualización de genes codificantes para elementos del reloj circadiano.	76
Figura 37. Agrupamiento de los sets de datos de accesibilidad a la cromatina.	77
Figura 38. Datos de ATAC-seq y ChIP-seq en genes del reloj circadiano en WAT.....	85

Índice de tablas

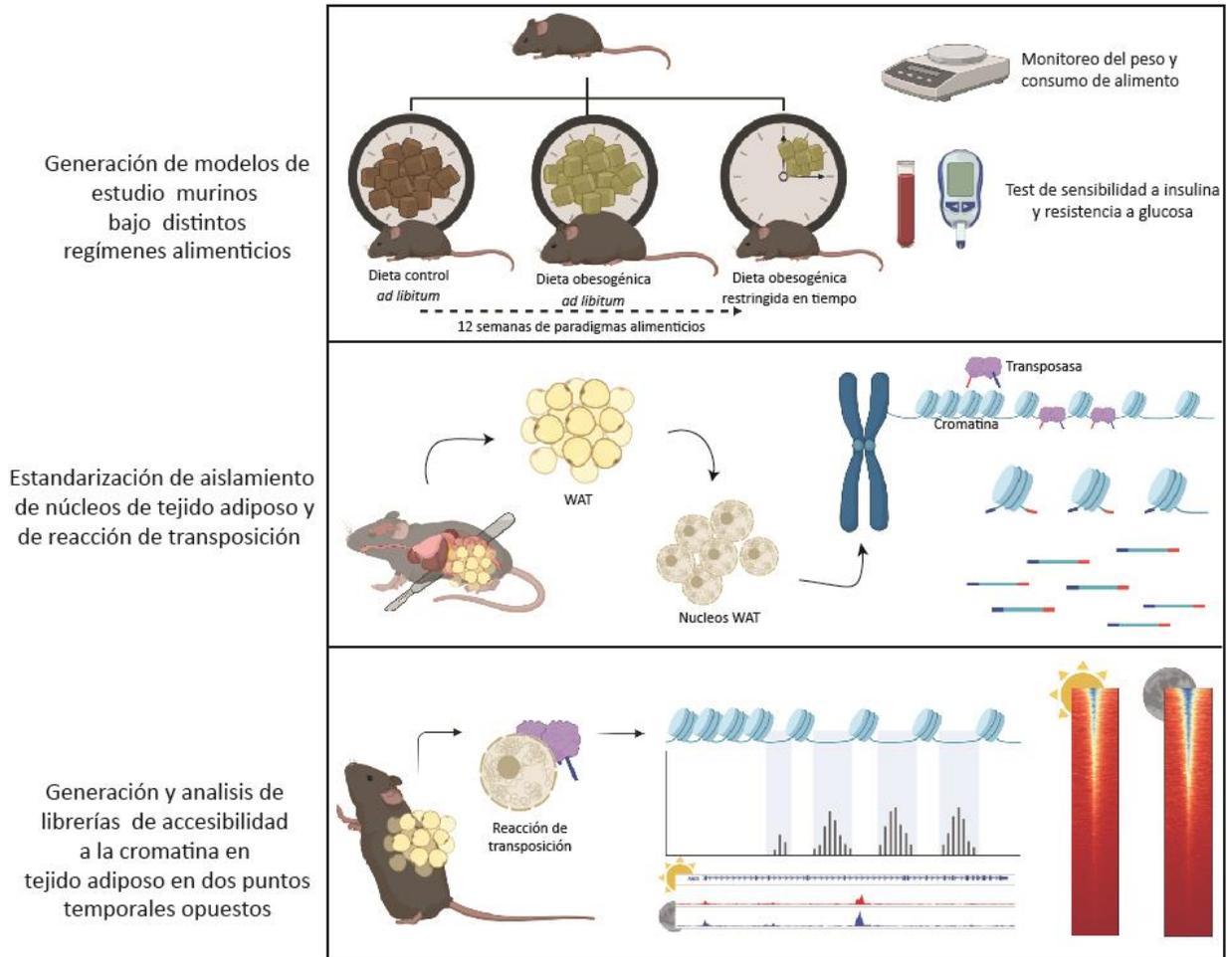
Tabla 1. Adipocinas y función en estados distintos estados metabólicos. Se indican las referencias para la descripción de cada adipocina..	19
Tabla 2. Disposición de los grupos de estudio.	44
Table 3. Panorama de la secuencia de ATAC piloto.	60
Tabla 4. Inventario de librerías.....	63
Tabla 5. Panorama de las secuencias de las librerías de accesibilidad a la cromatina.	68

Lista de abreviaturas

AT	Tejido Adiposo (del inglés: A dipose T issue)
ATAC-Seq	(del inglés: A ssay for T ransposase- A ccessible C hromatin using s equencing?)
BAT	Tejido Adiposo Pardo (del inglés: B rown A dipose T issue)
BMI	Índice de Masa Corporal (del inglés: B ody M ass I ndex)
cAMP	Adenosin Monofosfato cíclico
CCGs	Genes Controlados por el Reloj (del inglés: C lock C ontrolled G enes)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FFA	Ácidos grasos libres (del inglés: F ree F atty A cids)
HFD	Dieta enriquecida en grasa (del inglés: H igh F at D iet)
HFRD	Dieta enriquecida en grasas con acceso Restringido en tiempo (del inglés: H igh F at R estricted D iet)
ipRGC	Célula Retinal Ganglionar intrínsecamente fotosensible (del inglés: i ntrinsically p hotosensitive R etinal G anglion C ell)
Kcal	Kilocalorías
NAFLD	Esteatosis hepática no alcohólica (del inglés: N on A lcoholic F atty L iver D isease)
NC	Normocalórico
OMS	Organización Mundial de la salud
PTM	Modificación post traduccional (del inglés: P ost T raduccional M odification)
RNA	Ácido Ribonucleico
SCN	Núcleo supraquiasmático
SNC	Sistema Nervioso Central
TF	Factor de transcripción
TRF	Alimentación restringida en tiempo (del inglés: T ime R estricted F eeding)

TSI	Test de Sensibilidad a Insulina
TSS	Sitio de inicio de la transcripción (del inglés: T ranscription S tart S ite)
TTG	Test de Tolerancia a Glucosa
WAT	Tejido Adiposo Blanco (del inglés: W hite A dipose T issue)
ZT	Zeitgeber time (tiempo circadiano)

1. Resumen gráfico



2. Resumen

La obesidad, estado patológico, de etiología multifactorial está determinada por la presencia en exceso de tejido adiposo, la cual es un factor determinante para el desarrollo y diagnóstico desfavorable de múltiples patologías. Paradigmas de alimentación restringida en tiempo han mostrado un impacto benéfico en el estado de modelos

murinos y humanos, provocando un efecto protector ante las consecuencias deletéreas de la obesidad.

En el presente trabajo se generaron 3 grupos murinos de estudio distintos, los cuales se mantuvieron bajo distintos paradigmas de alimentación para estudiar el impacto que tienen estas dietas en el estado de accesibilidad a la cromatina en tejido adiposo blanco en distintos momentos del día.

Un primer grupo fue alimentado con una dieta control (CD) con acceso *ad libitum*, un segundo grupo (HF) fue alimentado con una dieta alta en grasas *ad libitum* y un tercer grupo (HFRD) se alimentó con dieta obesogénica restringiendo el acceso a un periodo de 6 horas al día. Se muestra un claro aumento del grupo HF respecto al grupo CD, efecto que no se muestra en los ratones pertenecientes al grupo HFRD lo que se acompaña de una mayor sensibilidad a la insulina y tolerancia a la glucosa respecto a los ratones del grupo HF, dándose evidencia de la mejora en la aptitud metabólica en nuestro modelo HFRD.

Posteriormente se generaron herramientas para el estudio de los cambios en la accesibilidad de la cromatina generados por los distintos paradigmas de alimentación, incluyendo la estandarización de un protocolo de aislamiento de núcleos de tejido adiposo blanco y el adecuar un protocolo de ATAC-seq lo cual permitió generar librerías de accesibilidad de tejido graso proviniendo de nuestros grupos de estudio.

Los resultados obtenidos en el presente estudio sientan las bases para el estudio en los cambios cíclicos en el estado de accesibilidad de la cromatina provocados por distintas dietas, así como el potencial de dilucidar cuales son los factores moleculares regulando estos cambios.

3. Abstract

Obesity, a pathological state, of multifactorial etiology is determined by the presence of excess adipose tissue, which is a determining factor for the development and unfavorable diagnosis of multiple pathologies. Time-restricted feeding paradigms have shown a beneficial impact on the state of murine and human models, provoking a protective effect against the deleterious consequences of obesity.

In the present work, 3 different murine study groups were generated, which were maintained under different feeding paradigms to study the impact of these diets on the state of accessibility to chromatin in white adipose tissue at different times of the day.

A first group was fed a control diet (CD) with ad libitum access, a second group (HF) was fed a high-fat diet ad libitum, and a third group (HFRD) was fed an obesogenic diet with restricted access to a period of 6 hours a day. A clear increase is shown in the HF group compared to the CD group, an effect that is not shown in the mice belonging to the HFRD group, which is accompanied by greater insulin sensitivity and glucose tolerance compared to the HF group mice, giving evidence of improvement in metabolic fitness in our HFRD model.

Subsequently, tools were generated for the study of the changes in the accessibility of chromatin generated by the different feeding paradigms, including the standardization of a protocol for the isolation of white adipose tissue nuclei and the adaptation of an ATAC-seq protocol, which allowed Generate fatty tissue accessibility libraries from our study groups.

The results obtained in the present study lay the foundations for the study of the cyclical changes in the state of chromatin accessibility caused by different diets, as well as the potential to elucidate which are the molecular factors regulating these changes.

4. Introducción

4.1. Ciclos Circadianos

La vida en el planeta evolutivamente se ha visto influenciada por los ciclos de luz y oscuridad ocasionados por el movimiento de rotación de la tierra. Estos ciclos han resultado en fluctuaciones diarias en la fisiología de organismos pertenecientes a todos los dominios taxonómicos¹ y en específico mostrando un gran valor en mamíferos donde además de ciclos de sueño y vigilia se presentan de forma rítmica fluctuaciones en múltiples aspectos comportamentales incluyendo características cognitivas como los niveles de alerta, la capacidad de concentración o de aprendizaje², pero también a nivel bioquímico y fisiológico como lo son fluctuaciones rítmicas en los movimientos intestinales, la temperatura corporal, la presión sanguínea, etc³. Además, se observan fluctuaciones diurnas en los niveles de hormonas circulantes⁴ y, de especial importancia para este estudio, variaciones rítmicas en el metabolismo donde a ciertas horas del día el procesamiento y asimilación de carbohidratos, lípidos u otros nutrientes resultan óptimos^{5,6}.

Los ritmos antes mencionados, denominados ciclos circadianos debido a su raíz etimológica derivada del latín *circa*- alrededor de, y *diem*-día, son dirigidos por el sistema del reloj circadiano y consisten en una red jerárquica de osciladores interconectados, el cual integra señales ambientales a lo largo del día para organizar la segregación temporal de rutas metabólicas de manera tejido-específica. Los ritmos circadianos cuentan con distintas propiedades que los caracterizan, por ejemplo, el hecho de ser innatos, es decir, que están presentes desde el nacimiento de los organismos⁷. Otra característica propia de los ciclos circadianos es el ser endógenos y autosostenibles, lo que se explica por el hecho de que los ciclos se generan y persisten en el tiempo sin la necesidad de la presencia de factores externos, sin embargo, la falta de estos factores ambientales genera una

desincronización a nivel sistémico, misma que se puede revertir mediante la exposición al ambiente a través de señales específicas o dadores de tiempo⁸.

Acorde con lo anterior, los estímulos externos dadores de tiempo que cobran importancia en el alineamiento y correcto funcionamiento del reloj circadiano y por lo tanto, de la regulación de los sistemas biológicos son denominados *zeitgebers* (raíz etimológica proviniendo del alemán *zeit* – tiempo y *geber*, dador). En mamíferos, el más importante es la luz^{8,9}, pero existen otros como, la alimentación o la actividad física^{10 11}.

4.1.1. Arquitectura del reloj circadiano de mamíferos

En mamíferos, el reloj circadiano se encuentra organizado de manera jerárquica, siendo el núcleo supraquiasmático (SCN), la región anatómica que consiste en un conjunto de alrededor de 10,000 neuronas asociadas a ambos lados del hipotálamo, el sincronizador maestro de los ciclos¹², lo que fue demostrado por primera vez en estudios en los que se generaban lesiones quirúrgicas que inhabilitaban el SCN, lo que daba como resultado la ablación de las fluctuaciones circadianas en la conducta y en la sincronización rítmica de las funciones endocrinas¹³. Dicho núcleo recibe directamente estímulos fóticos desde células ganglionares fotorreceptoras (ipRGC)¹⁴, tipo celular con un alto umbral de activación y cinética de reacción lenta ubicadas en la base de la retina. Las ipRGCs, a través de proyecciones que forman parte del tracto retinohipotalámico, refieren la información lumínica directamente al SNC^{15 16}; núcleo que está conformado por neuronas que a nivel autónomo muestran periodicidades de entre 22 a 30 horas sin embargo en conjunto disminuyen ese rango de oscilaciones cercano a las 24 hrs¹⁷, permitiendo de esta manera al SCN ajustar los ciclos endógenos en relación con ciclos externos de luz y oscuridad¹⁸.

En concordancia con lo anterior expuesto, se han mostrado evidencias del papel fundamental que tiene el SCN en el mantenimiento de los ciclos circadianos mediante

experimentos de intercambio de periodicidad circadiana entre roedores *wild type* con una lesión quirúrgica del reloj circadiano, los cuales muestran interrupción de los patrones de la actividad locomotora, y modelos neonatos con un SNC integro y que posterior trasplante recíproco de células del SCN, la actividad circadiana se restaura en los modelos arrítmicos ¹⁹.

El SCN puede enviar información al resto de relojes periféricos, incluyendo relojes del sistema nervioso central los cuales pueden afectar procesos a nivel sistémico como por ejemplo los comportamientos de sueño y vigilia, que se dan en parte acoplados a la secreción rítmica de la hormona melatonina, o ritmos autonómicos del sistema nervioso, que a su vez pueden alinear los relojes de tejidos periféricos ¹⁵ vía simpática, parasimpática, hormonal y/o humoral (Figura 1)²⁰.

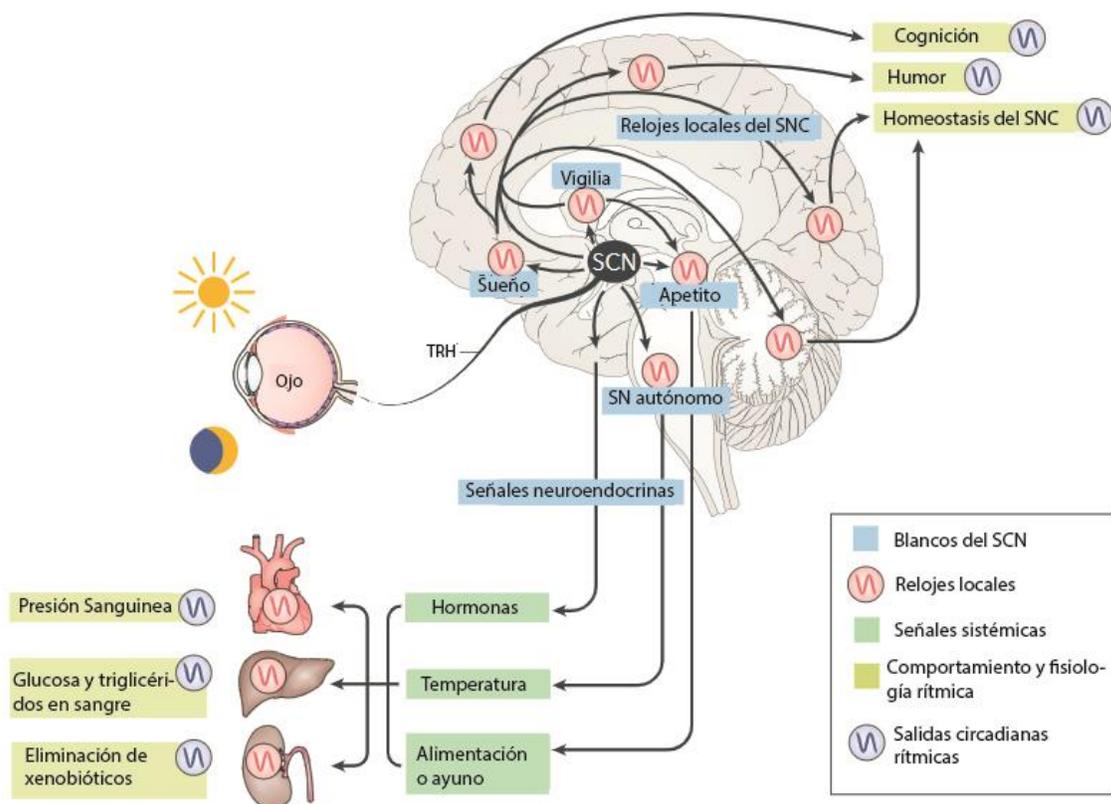


Figura 1. Organización anatómica circadiana en mamíferos. Se muestra como el Núcleo Supraquiasmático tras recibir estímulos fóticos es capaz de comunicarse con una variedad de

relojes locales ubicados en el SNC los cuales coordinan comportamientos y programas fisiológicos de manera sistémica (Imagen modificada de Hastings et, al.17).

Aunado a esto, evidencia de patrones de transcripción rítmicos en tejidos periféricos se han observado tras el aislamiento y cultivo de fibroblastos y hepatocitos de rata y la posterior detección de patrones rítmicos de expresión de mRNA en estas células²¹, así como la observación de la expresión rítmica del gen reportero luciferasa bajo el control del promotor de los genes circadiano *Per1* y *Per2* en cultivos primarios de células de pulmón, hígado y cornea entre otros ^{22,23}, de esta manera dando certeza de la presencia de patrones rítmicos en los tejidos periféricos y de que la génesis de estos no es dependiente del NSQ, demostrando la existencia de osciladores circadianos endógenos.

4.1.2. El reloj molecular

A nivel molecular, el reloj circadiano consta de factores transcripcionales especializados que sincronizan la transcripción cíclica de genes implicados en el control de la homeostasis metabólica. La estimulación sistémica que parte del SCN vía neuronal y humoral sincroniza los relojes moleculares de los tejidos periféricos dirigiendo programas locales de expresión génica de manera rítmica ²⁴. Esta maquinaria molecular se presenta en ciclos de retroalimentación transcripcional-traduccionales los cuales son los encargados de generar ritmos de 24 horas en la transcripción de una gran diversidad de genes, conocidos como genes controlados por el reloj (CCGs), entre los que se encuentran factores de transcripción como *Pparg*, *SREBF1* y *Wnt* (Figura 2) ¹⁸.

En mamíferos, el reloj molecular presente en cada célula está conformado por asas de retroalimentación que regulan positiva y negativamente la transcripción. El asa positiva consta de las proteínas Circadian Locomotor Output Cycles Protein Kaput (CLOCK) y Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator Like (ARNTL, también conocido como BMAL1) los cuales gracias a sus dominios bHLH-PAS ²⁵ actúan como los factores de transcripción centrales del reloj ya que al formar un heterodímero entre ellos son capaces de unirse a

las cajas E (5'-CACGTG-3'), *enhancers* que propician la transcripción de los CCGs²⁶. Entre los genes controlados por el heterodímero CLOCK-BMAL1 se encuentran *Per1-3* y *Cry1-2*, genes que codifican a las proteínas represoras Periodo y Criptocromo, respectivamente, las cuales, tras su acumulación respecto al tiempo, oligomerización y translocación nuclear, forman un complejo represor que impide el reclutamiento de CLOCK:BMAL1 a la cromatina, promoviendo así su propia represión transcripcional ^{27,28} (Figura 2).

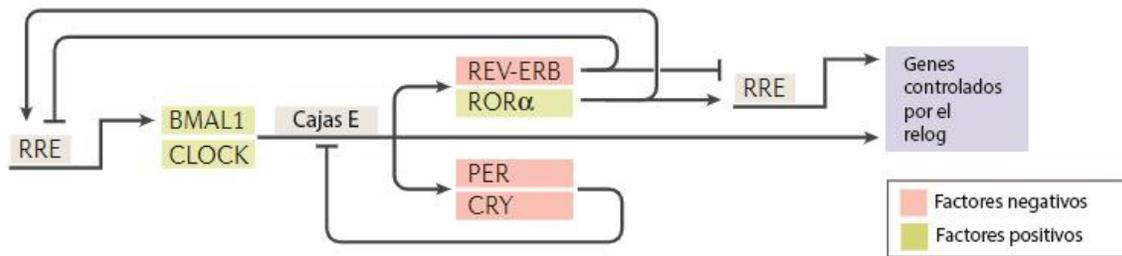


Figura 2. Organización de la maquinaria circadiana molecular central en mamíferos. Esquema de las vías de retroalimentación transcripcional-traduccional formadas por la maquinaria central del reloj circadiano (Imagen modificada de Hastings et, al.17).

El reloj molecular se estabiliza y se robustece mediante ciclos reguladores adicionales y el uso de mecanismos postraduccionales como fosforilación, acetilación, sumoilación y ubiquitinación, entre otras, los cuales afectan la estabilidad de las proteínas acumuladas que convergen para coordinar la transcripción rítmica ²⁹. Uno de estos ciclos accesorios es el llevado a cabo por la expresión circadiana de los receptores nucleares RORα, REV-ERBα (o NR1D1) y REV-ERBβ (o NR1D2) que actúan sobre los elementos ROREs (o RRE), elementos en cis, ricos en secuencias AT que preceden al motivo GGTC³⁰, ubicados en los promotores de genes incluyendo *BMAL1* donde forman un patrón de activación/represión de la transcripción de este gen central del mecanismo molecular del reloj circadiano. ³¹

El funcionamiento adecuado de la maquinaria molecular circadiana permite que diferentes funciones biológicas se lleven a cabo; sin embargo, disrupciones en la expresión de los elementos moleculares del reloj afectan de gran manera la amplitud y periodicidad

de procesos rítmicos, como lo muestra la ablación del dímero BMAL1:CLOCK lo que tiene como efecto perturbaciones en el manejo de la glucosa y en la secreción de insulina³², o de los receptores nucleares REV-ERB α y REV-ERB β y su efecto en el cambio de la expresión periódica de transcriptoma en ratones con mutaciones en estos genes, alteraciones en los patrones de actividad física y alteraciones en el manejo de lípidos mostrándose así una gran importancia de los elementos moleculares del reloj en el mantenimiento de los ritmos circadianos³³.

Asimismo, perturbaciones en el correcto funcionamiento del reloj circadiano provocados por periodos de exposición a la luz u oscuridad mayores a 12 horas y/o cambios en los patrones de sueño y vigilia se encuentran asociadas al desarrollo de patologías tales como desordenes metabólicos, obesidad y/o diabetes³⁴³⁵.

4.2. La obesidad

La obesidad es un estado patológico caracterizado por la acumulación excesiva de tejido adiposo (AT) asociado a múltiples patologías, y que se presenta en la actualidad como un grave problema de salud a nivel mundial, llegando a considerarse esta una epidemia vigente³⁶. Dentro de las enfermedades asociadas y/o derivadas a la obesidad y cuyo diagnóstico es desfavorable se encuentran la diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, ácido graso no alcohólico, hipertensión, infarto en distintos tejidos, osteoartritis y una predisposición a algunos tipos de cáncer³⁷.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), cerca del 13% de la población mundial mayor a 18 años padecen de obesidad, cifra que se ha triplicado desde las primeras estimaciones realizadas en 1975 y cuyo factor determinante parece asociarse a patrones conductuales relacionados con estilos de vida modernos, como sedentarismo y alta ingesta calórica, los cuales provocan un desbalance entre el consumo y el gasto energético, resultando esto en el aumento de la deposición de grasa.

La obesidad está definida como una acumulación excesiva de tejido adiposo la cual se encuentra acompañada de una inflamación sistémica crónica. El tejido en cuestión cuenta con una gran heterogeneidad lo cual deriva en que este se clasifique, basándose en sus principales características morfológicas, en dos tipos, tejido adiposo blanco (WAT) y tejido adiposo pardo (BAT)³⁸. El BAT se encuentra específicamente en mamíferos, es de vital importancia en el proceso de termogénesis y se compone principalmente de adipocitos pardos, tipo celular capaz de almacenar grasa de manera unilocular, así como por poseer un gran número de mitocondrias. La recepción vía somatosensorial tras estímulos prolongados de exposición a una sensación térmica fría estimula la liberación de norepinefrina dentro del BAT lo que conduce a la lipólisis de los triacilglicerolos almacenados en los adipocitos y el aumento de ácidos grasos libres al interior de la célula los que son utilizados en el proceso de β -oxidación. El proceso de termogénesis consiste en la generación de calor a través del desacoplamiento de la respiración mitocondrial gracias a la termogenina (UCP-1), proteína expresada únicamente en adipocitos del tejido adiposo pardo, disipando en forma de calor la energía generada³⁹. En condiciones de obesidad el tejido adiposo pardo muestra una asociación negativa con el incremento del índice de masa corporal (BMI)⁴⁰ y tejido adiposo visceral ⁴¹, lo que se acompaña del decremento en la toma de glucosa por parte del BAT ⁴⁰.

El tejido adiposo blanco (WAT) funciona como el principal sitio de almacenamiento de energía en el cuerpo, encontrándose presente en múltiples localizaciones anatómicas, dividiéndose estas en tejido adiposo subcutáneo y en tejido adiposo omental/visceral. La expansión del WAT relacionado a periodos de superávit calórico y a patrones erráticos de alimentación está directamente vinculada al desarrollo de obesidad. El WAT cuenta con una gran heterogeneidad celular, componiéndose este tejido de adipocitos maduros, preadipocitos, fibroblastos, células endoteliales, células estromales, células dendríticas, eosinófilos, macrófagos antiinflamatorios M2 y células innatas linfoides tipo 2, entre otros tipos celulares⁴².

Tanto al tejido adiposo blanco como al tejido adiposo pardo se les atribuyen importantes funciones como la homeostasis metabólica y participación en la regulación de niveles de glucosa y lípidos, así como en procesos inmunes ^{43,44}. En condiciones de homeostasis, la lipólisis en el WAT se puede inducir por vía parasimpática debido a la acción de catecolaminas (epinefrina, norepinefrina y dopamina), neurotransmisores monoamónicos y moléculas lipolíticas con gran importancia que actúan directamente sobre receptores β -adrenérgicos de adipocitos del WAT, estimulando la degradación de triglicéridos e incrementando los niveles intracelulares de cAMP⁴⁵; sin embargo, en condiciones de obesidad, se ha reportado que se encuentra una resistencia a catecolaminas por parte del AT, consecuencia de un decremento de la respuesta de los receptores β -adrenérgicos, lo que resulta en una reducción del gasto energético de los adipocitos y un aumento en el almacenamiento de triacilgliceroles^{46,47}.

Adicionalmente, el WAT tiene la capacidad de liberar factores endocrinos conocidos como adipocinas, entre las que se encuentra la leptina, adiponectina, adipsina, FABP4 y NRG4⁴³, además de muchas otras (Tabla 1), moléculas que dotan a este tejido de una importancia crucial en la modulación de la homeostasis sistémica, por lo que un desbalance de estas, producto de cambio en el volumen y localización de los depósitos de tejido adiposo fruto de la obesidad resultan en el desarrollo de enfermedades como cardiomiopatías y NAFLD⁴⁸.

Adiponectina	Funciones fisiológicas	Cambios y asociaciones en condiciones de obesidad
Leptina ⁴⁹	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento de la respuesta a la inanición • Aumento en el gasto energético • Aumento en la gluconeogénesis hepática • Disminución en la resistencia a insulina • Disminución en la 	<ul style="list-style-type: none"> • Hiperleptidemia • Inflamación crónica basal • Resistencia a insulina

	aterogénesis	
Adiponectina ⁵⁰	<ul style="list-style-type: none"> • Disminución de la inflamación • Aumento en sensibilidad a la insulina • Incremento en catabolismo de ácidos grasos 	<ul style="list-style-type: none"> • Hipoadiponectinemia • Resistencia a la insulina • Hipertensión y disfunción endotelial
Adipsina ⁵¹	<ul style="list-style-type: none"> • Modulación de la inflamación a nivel sistémico 	<ul style="list-style-type: none"> • Intolerancia a la glucosa
FAP4 ⁵²	<ul style="list-style-type: none"> • Regulación de gluconeogénesis 	<ul style="list-style-type: none"> • Resistencia a insulina • Aterogénesis
NRG4 ⁵³	<ul style="list-style-type: none"> • Regulación de la inflamación en hígado y sistema cardiovascular 	<ul style="list-style-type: none"> • Dislipidemia
Visfatina ⁵⁴	<ul style="list-style-type: none"> • Actividad chemotaxica de monocitos 	<ul style="list-style-type: none"> • Resistencia a insulina • Aterogénesis
Resistina ⁵⁵	<ul style="list-style-type: none"> • Regulación de la respuesta inflamatoria 	<ul style="list-style-type: none"> • Desarrollo de diabetes • Desarrollo de esteatosis hepática no alcohólica
Vaspina ⁵⁶	<ul style="list-style-type: none"> • Regulación de la ingesta • Degradación de serin-proteasas degradadoras de insulina 	<ul style="list-style-type: none"> • Resistencia a la insulina
Quemerina ⁵⁷	<ul style="list-style-type: none"> • Regulación de adipogénesis 	<ul style="list-style-type: none"> • Lipodistrofia • Desarrollo de resistencia a insulina
LCN2 ⁵⁸	<ul style="list-style-type: none"> • Regulación de la sensibilidad a insulina • Regulación de la secreción de TNF por adipocitos 	<ul style="list-style-type: none"> • Mediador de la inflamación crónica basal

Tabla 1. Adipocinas y función en estados distintos estados metabólicos. Se indican las referencias para la descripción de cada adipocina. En general, la información de la tabla ha sido extraída de la literatura que se cita a lo largo del texto.

En condiciones de obesidad, el WAT se encuentra asociado a un estado de inflamación basal crónica, provocado por una variedad de factores entre los que se encuentran la

muerte celular de adipocitos⁵⁹ y el reclutamiento de células inmunes, principalmente macrófagos, pero también células B y células T⁶⁰ (Figura 3). Se ha demostrado que la población de macrófagos que componen el WAT de individuos sanos se encuentra cerca del 10% de la población total de células del tejido⁶¹ y que dicha población se compone principalmente de macrófagos M2, tipo celular asociado a la secreción de citocinas antiinflamatorias como IL-10 y factores de crecimiento como TGF- β ⁶², sin embargo en condiciones de obesidad los macrófagos se polarizan a el tipo de macrófago proinflamatorio M1, aumentando la presencia de citocinas proinflamatorias circulantes (TNF- α , MCP1, IL-6, etc)⁶³, al mismo tiempo que el número de macrófagos aumenta hasta componer el 40%⁶¹ de la población total de células del tejido. Otros factores que contribuyen al estado inflamatorio propio de la obesidad son cambios en la conformación y densidad de la matriz extracelular (ECM)⁶⁴ así como perturbaciones en la interacción de los adipocitos con la ECM, esto aunado a la generación de un ambiente hipóxico como resultado de un aumento en la tasa metabólica de los adipocitos hipertróficos y de la reducción en la difusión de oxígeno⁶⁵.

Dentro de los efectos sistémicos del estado crónico de inflamación provocado por la obesidad, uno de los que más llaman la atención es la resistencia a la insulina, la cual está definida como la disfunción en el control del metabolismo de la glucosa mediado por insulina en diversos tejidos, particularmente en musculo, hígado y AT. La resistencia a insulina está estrechamente relacionado al padecimiento de diabetes mellitus tipo 2 y enfermedades cardiovasculares⁶⁶. Evidencia de la relación entre la obesidad, la inflamación y la resistencia a insulina se observa en numerosos estudios donde se inhiben vías inflamatorias, como es el caso del *knockout* en hepatocitos de ratones obesos de IKK- β , cinasa central de la vía de NF- κ B, lo que da como resultado la sensibilización a la insulina en hígado⁶⁷. Otro ejemplo experimental se da en el caso de TLR4, receptor de lipopolisacáridos vital para la respuesta innata inmune, donde su delección en un modelo de obesidad murino protege contra la reducción de la sensibilidad a insulina⁶⁸.

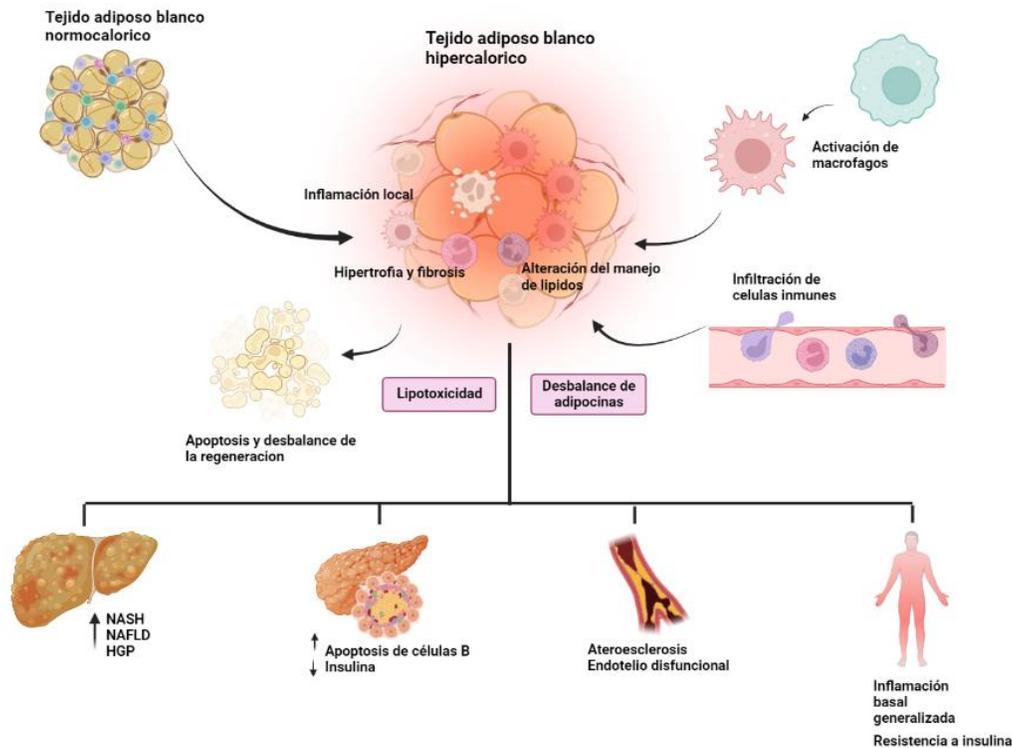


Figura 3. Efectos de la obesidad en el tejido adiposo blanco. El tejido adiposo blanco en condiciones de obesidad se encuentra ligado a la aparición de características que lo asocian con un estado patológico. Modificado de Pagano E. et al. (2017)⁶⁹.

Otra consecuencia de la obesidad es la deposición ectópica de grasa (Figura 3). La expansión del WAT se logra mediante dos vías, el aumento en el número de adipocitos (hiperplasia) y el agrandamiento de los adipocitos preexistentes por acumulación de lípidos intracelulares (hipertrofia), sin embargo, en condiciones de obesidad los depósitos anatómicos de WAT no pueden contener con las crecientes necesidades de almacenamiento y se vuelven insuficientes en el almacenamiento de triglicéridos, por lo que estas moléculas se comienzan a depositar en sitios cuya función principal no es el almacenamiento de grasa, por ejemplo hígado, musculo esquelético, corazón y páncreas⁷⁰. Cantidades excesivas de grasa ectópica se relacionen directamente con la disrupción en el señalamiento de insulina, el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2, esteatosis hepática no alcohólica y con enfermedades cardiovasculares (Figura 3)⁷¹.

Tanto factores biológicos como ambientales muestran un impacto en la toma y gasto de energía, aunque el factor determinante en la creciente epidemia de obesidad parece asociarse a los estilos de vida modernos en los cuales se promueve el consumo de alimentos altamente procesados mientras el estilo de vida sedentario va en aumento ⁷² por lo que el definir el impacto de los nutrientes en la salud y enfermedad se vuelve una actividad necesaria.

4.3. Tratamiento de la obesidad y patrones de alimentación diurnos.

Los paradigmas actuales para el tratamiento de la obesidad tienen como objetivo la pérdida de peso mediante diferentes enfoques, como intervenciones en el estilo de vida que incluyen aumento de la actividad física y la adopción de dietas con una ingesta calórica reducida, esto en ocasiones complementado de tratamientos farmacológicos o de cirugía en casos selectos⁷³, sin embargo los efectos a largo plazo no se muestran del todo relevantes ya que se ha demostrado que se es más propenso a ganar porcentaje del peso perdido a largo plazo, sobre todo en dietas altas en carbohidratos ⁷⁴ aunque, de manera interesante, la hora del día en que ingerimos alimentos parece tener un papel fundamental en la forma en que los nutrientes alteran nuestra salud y por lo tanto en el tratamiento a la obesidad ⁷⁵. En este escenario, intervenciones enfocadas en la generación de un ayuno intermitente que consiste en restringir la ingesta de alimento a determinadas horas del día, han emergido como una nueva estrategia para mejorar el estado de salud tanto en humanos como en modelos murinos ⁷⁶⁻⁷⁸.

Se han reportado una serie de consecuencias a nivel fisiológico provocados por periodos temporales restringidos de alimentación y ayuno, las cuales incluyen una mejora en los niveles de glicemia, de sensibilidad a insulina, respuesta de células beta pancreáticas, en valores de presión sanguínea y en niveles de estrés oxidativo, la optimización de los niveles de LDLs y triglicéridos circulante, así como la pérdida de peso a través de la reducción de la acumulación de grasa y el mejoramiento de una serie de patologías

4.4. El reloj circadiano y el metabolismo

En diversos tejidos se observan oscilaciones circadianas que van del 10% al 20% del transcriptoma²⁹. Dichos transcritos son rítmicos de una manera diferencial tejido específica, a excepción de los genes pertenecientes a la maquinaria molecular del reloj los cuales oscilan en todos los órganos estudiados⁸³, lo que apunta a que la generación de fluctuaciones en los procesos fisiológicos se originan gracias a una acción combinatoria entre factores de transcripción propios del tejido y aquellos pertenecientes a la maquinaria molecular del reloj, como por ejemplo en el caso del receptor nuclear HNF4A el cual tiene un papel importante en el mantenimiento de los ciclos autónomos celulares inhibiendo el papel del dímero CLOCK-BMAL1 de una manera tejido específica⁸⁴.

En diversos estudios comparativos se ha observado que existe comunicación y sincronización entre los relojes circadianos de tejidos periféricos⁸⁵, revelando interacciones metabólicas específicas de manera espacio y tiempo específicas, mismas que se ven alteradas cuando existe un desafío nutricional, en esta ocasión surgido a partir de una dieta alta en grasas, como es el caso del estudio llevado a cabo por Dyar et. al, en el que se realizó un estudio transversal de los cambios en los metabolitos de 8 tejidos distintos a lo largo de 24 horas y donde se encontró una fuerte comunicación y coordinación entre los metabolitos de distintos tejidos, así como el impacto de una dieta obesogénica en la modificación de estas conexiones⁸⁶.

En el WAT se observa ritmicidad en diferentes vías metabólicas, incluyendo la lipólisis y la lipogénesis, lo que contribuye a cambios oscilatorios en los niveles de ácidos grasos libres (FFA) en sangre⁸⁷. Un ejemplo de la dinámica rítmica del metabolismo en WAT se encuentra en la oscilación regulada por la proteína perteneciente al reloj molecular REV-ERB α del gen *Lpl*, el cual codifica para la enzima lipoproteín lipasa encargada de hidrolizar triglicéridos en la lipólisis⁸⁸.

En condiciones de disponibilidad de alimento, los relojes circadianos, son capaces de anticiparse al consumo de comida, optimizando procesos fisiológicos como la digestión y

procesos metabólicos y con esto la homeostasis energética⁸⁹, por ejemplo el aumento de vías orexigénicas previo al inicio de la fase activa⁹⁰ o la evidencia de que en condiciones de disponibilidad de alimento restringida a una vez al día durante la etapa activa, se observan cambios en la actividad locomotora de modelos murinos en un lapso de 1-3 horas previo a la ingesta⁹¹, sin embargo, la relación entre el reloj central y los mecanismos anticipatorios de toma de alimento no parece ser tan evidente.

Como se mencionó previamente, los zeitgebers son señales ambientales que sirven como sincronizadores de los ritmos circadianos, y entre estas señales se encuentra la alimentación⁹², la cual funciona como un importante alineador de los ritmos circadianos periféricos, lo que complementado con el tiempo en el que se dispone de alimentos, incorpora un nuevo arreglo cíclico en procesos fisiológicos como el de la temperatura corporal, actividad motriz y la expresión de CCGs independientemente de la influencia del núcleo supraquiasmático⁹³.

Evidencia apoyando esta teoría se muestra en estudios donde, aunque componentes del reloj se encuentren mutados, en particular BMAL1 y Rev-Erb, una alimentación restringida a un periodo de 10 horas durante la fase activa de modelos murinos mejora el estado metabólico, previniendo el desarrollo de obesidad, hiperlipidemia así como de intolerancia a glucosa y resistencia a insulina, afectaciones que se observan en un modelo murino con las mismas mutaciones del reloj molecular pero con una alimentación sin restricciones temporales⁹⁴.

Por otra parte, se ha estudiado que el estado de estrés metabólico ocasionado por la obesidad conlleva un rearrreglo sustancial del transcriptoma y la ganancia o pérdida de ritmicidad de ciertos genes implicados en el metabolismo⁹⁵ así como también se ha observado el rearrreglo global de enhancers circadianos, lo que conlleva una aperiodicidad *de novo* en factores de transcripción como SREBP y PPARα, implicados en el anabolismo y el catabolismo de lípidos respectivamente⁹⁶.

Aunque lo anterior descrito muestra una relación entre el metabolismo y el reloj circadiano es necesaria más información para comprender por completo como alteraciones en la homeostasis circadiana conduce a la generación de enfermedades metabólicas.

4.5. Accesibilidad a la cromatina y reorganización rítmica

La cromatina, definida como la estructura de empaquetamiento de la información genética al interior de las células con núcleo, es un complejo de DNA y proteínas cuya unidad elemental son los nucleosomas, unidades que consisten de un octámero de histonas, conformado de dos heterodímeros H2A-H2B y dos heterodímeros H3-H4, encargadas de empaquetar ~147 bases de DNA⁹⁷. Aunado a esta función, los nucleosomas son blanco de múltiples modificaciones post traduccionales (PTM) en su extremo N-terminal, como metilaciones, acetilaciones, ubiquitinaciones y glucosilaciones; lo cual conlleva, entre otros efectos, a la regulación del reclutamiento de moléculas modificadoras de la cromatina, así como al grado de compactación y estabilidad de la cromatina⁹⁸.

El posicionamiento de los nucleosomas a lo largo del genoma es altamente dinámico, lo que implica distintos grados de accesibilidad de la cromatina, que van desde un estado cerrado, lo cual restringe el acceso de factores moleculares al genoma; a un estado abierto, pasando por distintos niveles de permisividad de acceso al material genómico lo que provoca diferencias funcionales de la cromatina. La accesibilidad a la cromatina se define como el grado en el que macromoléculas nucleares pueden contactar al DNA y su estado está determinado por la ubicación y organización topológica de nucleosomas y factores de unión a la cromatina que permiten u obstruyen el acceso a la cromatina⁹⁹. El DNA libre de nucleosomas se puede encontrar ocupado por distintas proteínas entre los que destacan la presencia de RNA polimerasas en genes con transcripción activa, factores

de transcripción (TF) o proteínas estructurales que regulan el ordenamiento de la cromatina¹⁰⁰.

Es importante mencionar que el término de accesibilidad de la cromatina, utilizado ampliamente en este trabajo, se diferencia de los términos referentes al estado de la cromatina, eucromatina y heterocromatina. La accesibilidad a la cromatina refleja las regiones internucleosomales, donde las secuencias de nucleótidos se encuentran libres para su interacción con proteínas reguladoras, modificadoras de la cromatina o proteínas que conforman la maquinaria transcripcional, siendo parte de estas secuencias regiones regulatorias y genes con transcripción activa⁹⁹.

Los conceptos eucromatina y heterocromatina se utilizan para indicar un grado de ordenamiento superior, importantes para la estabilidad del genoma, y los que, por lo general, también hacen referencia a su posicionamiento dentro del núcleo eucariota¹⁰¹.

Por otro lado, se tiene certeza que el reloj circadiano asiste en la generación de patrones oscilatorios en la estructura de la cromatina (Figura 5). La maquinaria del reloj se auxilia de mecanismos epigenéticos y proteínas de modificación de la cromatina para definir oscilaciones diarias en la fisiología de los tejidos, teniendo como efecto la generación de la dinámica rítmica observada en el estado de la cromatina. Un ejemplo de la evidencia de lo anterior descrito se observa en la proteína del reloj circadiano CLOCK que tiene actividad de acetiltransferasa de histonas, acetilando los residuos K9 Y K14 de la H3 de nucleosomas lo que contribuye a eventos de remodelación de la cromatina¹⁰². Otro ejemplo es la interacción del dímero CLOCK-BMAL1 con acetiltransferasas de histonas como p300 o CBP, lo cual provoca una accesibilidad a la cromatina que varía en un periodo de 24 horas⁹⁹. Aunado a esto, existe evidencia de la asociación de elementos del reloj circadiano con otras proteínas que añaden PTMs a los nucleosomas, como metiltransferasas en la asociación de CLOCK con MLL1, proteína homóloga del complejo Trithorax de *D. melanogaster*, lo que genera un patrón oscilatorio en la marca H3K4me3¹⁰³ reforzando la idea de la asociación del reloj circadiano con las modificaciones de la cromatina que se realizan en intervalos periódicos de tiempo, lo que se acompaña de transiciones en la

actividad transcripcional y en el ciclo rítmico de la expresión génica. Estos ejemplos apuntan a cómo, durante el ciclo circadiano, tanto la represión como activación transcripcional se acompaña por transiciones dinámicas en el estado de la cromatina lo que a su vez influye el ciclo rítmico de la expresión génica, generando oscilaciones de genes pertenecientes a diversas vías metabólicas lo que dispersa la funcionalidad de estas alrededor del día¹⁰⁴.

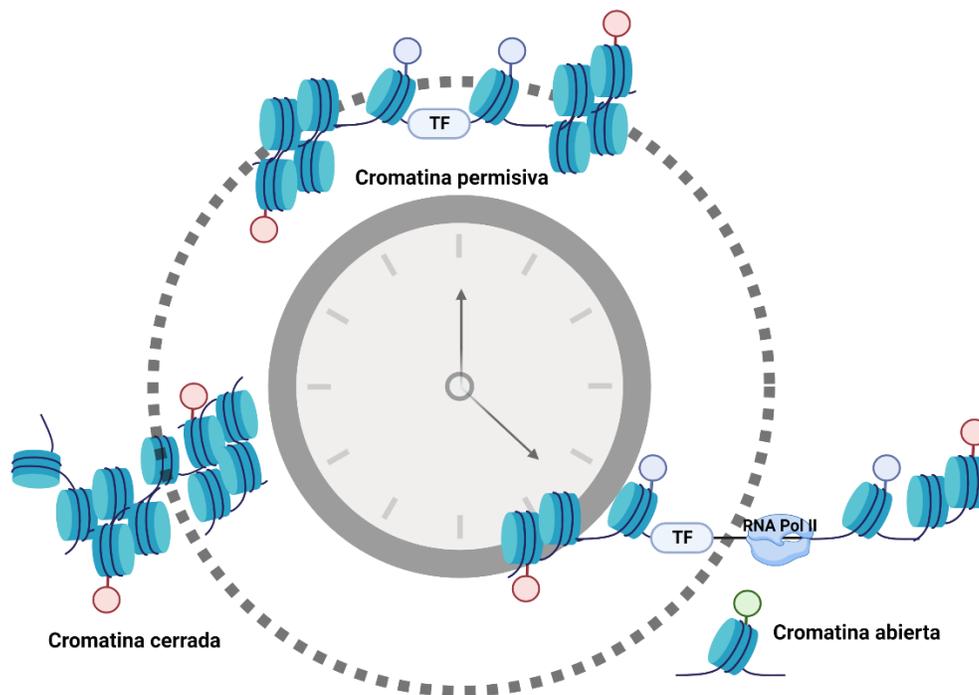


Figura 5. Oscilaciones cíclicas en el estado de apertura de la cromatina. El estado de la cromatina es altamente dinámico, pasando por distintos grados de accesibilidad periódicamente. Una cromatina permisiva permite que distintos factores de transcripción y proteínas remodeladoras de la cromatina se unan al DNA para iniciar la transcripción y el establecimiento de un estado de cromatina abierta lo que contrasta con la cromatina cerrada en donde no se permiten la interacción de moléculas con el DNA.

Aunado a lo anterior, se ha observado que distintas intervenciones alimenticias tienen un efecto en la generación de modificaciones en las marcas de la cromatina y por lo tanto en su estructura. Evidencia de la relación que tiene el metabolismo en la organización rítmica del estado la cromatina se encuentra estudiando la distribución diferencial de marcas de

nucleótidos (p ej. metilaciones) y PTMs de histonas en estados de homeostasis y estados patológicos como lo puede ser la obesidad. Un ejemplo de lo anterior descrito se encuentra en un estudio realizado por Multhaup et al¹⁰⁵; donde se observan cambios en los patrones de metilación en bases de DNA de 625 sitios a lo largo del genoma de adipocitos en ratones alimentados con una dieta obesogénica, lo que a su vez afecta la expresión génica.

Cambios en el estado de accesibilidad a la cromatina en hígado se observan en un modelo murino alimentado con una dieta obesogénica, donde se encuentra accesibilidad *de novo* en ciertas regiones de la cromatina, lo que se acompaña de cambios en la actividad de factores de transcripción como HNF4 α y de marcas de histonas como H4K9me2¹⁰⁶ . Referente a la accesibilidad a la cromatina en el WAT, se tiene evidencia experimental de que, en células inmunes de este tejido, en específico monocitos y macrófagos del tejido adiposo, una dieta obesogénica tiene efectos en el panorama general de accesibilidad a la cromatina, tal y como lo reportan Hu. R. et al ¹⁰⁷.

El estudio realizado por Nair V.D. et al¹⁰⁸; en donde se realiza un análisis diferencial de accesibilidad a la cromatina utilizando WAT y musculo esquelético utilizando la técnica de ATAC-seq (*Assay for Transposase Accesible Chromatin using sequencing*) , muestra diferencias en ambos tejidos estudiados lo que indicaría identidad en la accesibilidad a la cromatina tejido especifica, lo que a su vez, demostrado por los autores, se acompaña cambios en marcas de histonas como el caso de la H3K27ac, marca asociada con sitios de transcripción activos, evidencia de la asociaciones de las PTM de histonas con la permisividad de la cromatina.

Todo lo anterior descrito deja clara la existencia de una interacción entre los relojes circadianos, el metabolismo y la estructura de la cromatina, así como de la importancia que tienen estos mecanismos en el funcionamiento del tejido adiposo, sin embargo, aún se desconoce mucho acerca de los factores moleculares regulando esta interconexión y los cambios dados por distintas intervenciones alimenticias.

5. Justificación

La obesidad se presenta hoy en día como uno de los principales problemas de salud pública a nivel global, convirtiéndose esta en una epidemia en desarrollo a pesar de los esfuerzos por encontrar soluciones para combatir la obesidad muchas veces estos se muestran ineficientes. En este contexto, la regulación circadiana del metabolismo y su interconexión con el estado de la cromatina se han convertido en temas de gran interés, sin embargo, aún se desconocen muchos de los factores moleculares dirigiendo cambios en la estructura de esta molécula, así como los mecanismos de sincronización ente los distintos relojes y el metabolismo para mantener un estado óptimo de este último.

La restricción temporal de la ingesta de alimento se ha demostrado como un tratamiento eficaz contra la obesidad, volviéndose apremiante el estudio de los mecanismos moleculares que subyacen el efecto benéfico de la alimentación restringida en tiempo para desarrollar estrategias más efectivas para combatir la obesidad. Es este proyecto se busca analizar el efecto que tienen distintos paradigmas alimenticios en el estado de la cromatina a horas específicas del día en tejido adiposo.

La información obtenida acerca de la accesibilidad diferencial que se logra mediante el efecto de distintas dietas puede potencialmente brindar información de las regiones del genoma que se encuentren interactuando con factores de transcripción que sostienen una respuesta metabólica en coordinación con el reloj circadiano.

6. Pregunta de investigación:

¿Qué cambios diferenciales se dan entre la accesibilidad de la cromatina de genes del reloj y genes metabólicos, en el tejido adiposo blanco de ratones alimentados con dieta control, obesogénica, y con dieta obesogénica restringida en el tiempo?

7. Hipótesis

La dieta alta en calorías proveniente de la grasa y administrada en un paradigma de restricción de acceso temporal genera cambios en la accesibilidad a la cromatina en regiones reguladoras de genes que rigen el metabolismo en tejido adiposo y de genes del reloj, los cuales también están ligados a la temporalidad (hora del día). Estos cambios están implicados en la recuperación de la aptitud metabólica de los ratones.

8. Objetivos

8.1. Objetivo general

Evaluar comparativamente los cambios en la apertura de la cromatina del tejido adiposo blanco en un modelo de obesidad inducida por la dieta en ratón, y un modelo alimentado con dieta obesogénica con restricción temporal de acceso al alimento.

8.2. Objetivos específicos

1. Generar un modelo de ratón de obesidad inducida por la dieta y recuperar su aptitud metabólica utilizando un paradigma de restricción temporal de acceso al alimento, y evaluar los cambios fenotípicos asociados.
2. Estandarizar un protocolo de aislamiento de núcleos en tejido adiposo de ratón manteniendo la conformación y viabilidad de los núcleos.
3. Estandarizar un protocolo de ATAC-seq de tejido adiposo blanco de ratón.
4. Determinar los cambios en la accesibilidad de la cromatina en el tejido adiposo de los modelos de los distintos grupos de estudio utilizando el protocolo estandarizado de ATAC-seq.

9. Metodología

9.1. Generación modelo experimental

Se partió de una cohorte de 90 ratones macho de la cepa C57BL/6J, alojados en la Unidad de Modelos Biológico del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM en un ambiente con una temperatura de 24° y humedad de entre 45% y 55% con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas por 12 horas, con una densidad de máximo dos ratones por caja.

A las 6 semanas de edad, los ratones fueron separados en 3 grupos, el primer grupo alimentado bajo un régimen de dieta normo calórica (NC) (Teklad 2018, 18% Proteína) *ad libitum*, un segundo grupo alimentado con una dieta obesogénica (TestDiet 58Y1, 60%kcal procedentes de la grasa) *ad libitum* bajo la cual los ratones desarrollan un modelo de obesidad y diabetes ⁹⁵ y otro grupo alimentado con dieta obesogénica (TestDiet 58Y1) restringida en el tiempo durante 12 semanas. En los grupos de alimentación restringida en el tiempo, el alimento se administró a partir de los zeitgebers (ZT, hora después de que las luces son encendidas) ZT12 a ZT18. La restricción al alimento fue llevada a cabo mediante un sistema automatizado de dispensadores de alimento incluidos en un equipo Oaspad, Omniaiva.

La medida del peso de los ratones y de la ingesta de alimento se llevó a cabo de manera semanal, esta última calculando la diferencia en pesos en el alimento respecto al inicio y al final de la semana.

Al terminar las 12 semanas de los distintos regímenes alimenticios, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se les extrajo el tejido adiposo blanco epididimal (eWAT), cerebro, suero, hígado, páncreas, tejido adiposo pardo (BAT) y musculo esquelético, los cuales fueron congelados en hielo seco inmediatamente posterior a su extracción.

El manejo de los animales se llevó a cabo de acuerdo con la normativa del comité interno para el cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUAL).

9.2. Test de tolerancia a la glucosa (TTG)

Las pruebas de tolerancia de glucosa se realizaron al principio del estudio, a las 6 semanas posteriores y a las 12 semanas tras el inicio.

Para pruebas de tolerancia a glucosa (TTG) los ratones fueron puestos en situación de ayuno por 12 horas, del ZT16 al ZT4, a lo que posteriormente se medirán los niveles de glucosa basal usando un glucómetro Accu-Chek (Roche) mediante extracción de una gota de sangre vía caudal. Subsecuentemente, se les administró una solución de D-glucosa (cat. no. G8270) disuelta en solución salina (2g glucosa/kg de peso), de manera intraperitoneal y los niveles de glucosa en sangre fueron medidos a los 15, 30, 60 y 120 minutos posteriores a la inyección. Las pruebas fueron realizadas al ZT4.

9.3. Test de sensibilidad a la insulina (TSI)

Un enfoque similar al de las pruebas de tolerancia a glucosa se utilizó para las pruebas de sensibilidad a insulina (TSI), aplicándose estas en la semana 0 del estudio, la semana 6 y la semana 12. Se aplicó un ayuno de 4 horas, del ZT0 al ZT4, seguido de una medición de glucosa basal sanguínea vía caudal mediante el glucómetro Accu-Check (Roche). Posteriormente se les administró una inyección de solución de insulina (Humulin Regular, HI-210) disuelta en solución salina (0.6 unidades de insulina/ kg de peso), de manera intraperitoneal y los niveles de glucosa en sangre fueron medidos a los 15, 30, 60 y 120 minutos posteriores a la inyección. Las pruebas fueron realizadas al ZT4.

9.4. Aislamiento de núcleos

Se tomaron aproximadamente 250mg de tejido adiposo blanco epididimal (eWAT) congelado a -80° a los cuales se les añadió 1 mililitro de Buffer de aislamiento nuclear (NIB) (Sacarosa 250mM, Hepes pH 7.5 10 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM , KCl 10 mM, Igepal CA-60 0.001%, DTT 0.2 mM, *cOmplete inhibidor cocktail* 5 U/ml(Cat. No.11836153001)) preparado inmediatamente previo a la extracción. El tejido se cortó finamente ($> 1mm^3$) con tijeras previamente enfriadas y se transfirió a un homogeneizador tipo de Dounce de 2ml (D89938-1SET) y se aplicaron 10 *strokes* con el pistilo A (*Loose*) y 8 con el pistilo B (*Tight*), procurando que la muestra siempre se mantuviera en frío y variando estos últimos en caso de que ya no se muestre resistencia al bajar el pistilo y se observe una solución homogénea uniforme.

Esta suspensión se incubó 30 minutos en hielo, se filtró utilizando una malla de 70um y se lavó tanto el homogeneizador como la malla de filtrado con 1 ml de NIB cada uno. Tanto el mililitro de NIB ocupado para lavar como el mililitro de NIB ocupado para lavar la malla se recuperaron y se añaden a la suspensión inicial para recuperar el máximo posible te núcleos. Posteriormente, para separar el contenido de grasa del tejido de las demás fracciones celulares, se centrifugó el homogeneizado a 1000xg durante 10 minutos a $4^{\circ}C$ utilizando una centrifuga Thermo Sorvall ST 16R, a lo cual se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en un mililitro de NIB. La suspensión sin grasa se centrifugo de nuevo en una centrifuga Thermo Sorvall ST 16R a 500xg durante 10 minutos a $4^{\circ}C$, se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 500 ul de ATAC-Wash Buffer (Tris-HCl pH 7.5 10mM, $MgCl_2$ 3mM, NaCl 10mM, Tween-20 0.1%). Se procedió a contabilizar los núcleos teñidos en relación 1:1 con una solución de azul de Tripano 0.4% en una cámara de Neubauer. La visualización de los núcleos se realizó utilizando un microscopio invertido ZEISS primovert.

9.5. Extracción de DNA nuclear

Se partió de una suspensión de núcleos aislados inmediatamente previo a la extracción de DNA, centrifugándolos a 2000x g por 15 minutos a 4°C en una centrifuga Beckman Avanti™ 30. Una vez terminado esta centrifugación se descartó el sobrenadante y el *pellet* de núcleos se resuspendió en 300 ul Buffer de Lisis (LB) (SDS 0.3 %, EDTA 1 mM, Tris pH 8.0 10mM), incubando la suspensión por 30 minutos en hielo. Terminado este tiempo se añadieron 2 ul de RNAsa (10mg/ml) y se incubó por 30 minutos a 37°C para deshacerse de cualquier RNA contaminante. Terminado este tiempo se añadió 3ul (10mg/ml) de proteinasa K por muestra y se incubo en agitación (1,000 RPM) a 67°C durante 60 minutos. Terminada la incubación se añadieron 300ul de Fenol-Cloroformo y posterior se homogeneización mediante vortex se centrifugó el material a 14,000xg. Como resultado de la centrifugación la muestra se separó en tres fases: una fase inferior, una interfase sólida y una fase acuosa superior, prosiguiendo a recuperar esta última (~280ul). Se añadió 1 volumen de acetato de sodio y 2.5 volúmenes de etanol 100% frio, precipitando por una hora a -20°C. Las muestras se centrifugaron a 14,000xg y se les realizaron dos lavados con una solución de etanol al 75%, el cual se retira una vez terminados estos. La muestra de DNA se resuspendió en H₂O grado biología molecular.

La concentración de DNA obtenido fue determinada cuantificando 2ul de la muestra final un equipo NanoDrop (Thermo Scientific).

9.6. Extracción DNA de tejido adiposo

Se tomaron 50 mg de tejido a los cuales se les añadieron 300 ul de Buffer de Lisis (LB) y se cortaron finamente con tijeras (>1 mm³) y se transfirió a un homogeneizador tipo de Dounce de 2ml (D89938-1SET) y se aplicaron 5 *strokes* con el pistilo A (*Loose*) Y 5 con el pistilo B (*Tight*). Una vez obtenido este homogeneizado se prosiguió a realizar la

extracción de DNA de la misma manera y en paralelo a la extracción de DNA nuclear, partiendo de la adición de RNAsa.

9.7. Extracción de RNA

Se partió de 50 mg de eWAT, los cuales se transfirieron a un tubo de microcentrífuga de 2ml al cual se le añadieron 200 mg de TRizol (Invitrogen, cat. No. 15596018) y una perla *5mm stainless Steel beads* (cat. No. MC9257481) por muestra para homogeneización del tejido en el equipo *Thermo TissueLyzer LT*, programando este a una frecuencia de agitación de 300 Hertz por minuto en dos tantas de un minuto, transfiriendo la muestra a hielo entre estas.

Después de la homogeneización las muestras se centrifugaron por 5 minutos a 12,000xg a 4°C para la separación y descarte de la fracción grasa. Posterior a esto el RNA se aisló de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

9.8. Síntesis de cDNA

Se utilizo el kit *iScript™ reverse transcription supermix* de Bio-rad para la generación del cDNA (cat. No. 1708841), realizando una reacción por muestra donde se partió de 1ug de RNA, al cual se añadió 2ul del *5x iScript Supermix* y se llevó a un volumen final de 10ul. Para la generación del DNA complementario se realizó la reacción de elongación con las siguientes especificaciones: *priming* durante 5 minutos a 25°C, elongación durante 60 minutos a 46°C e inactivación de la enzima a 95°C durante un minuto.

Posterior a la reacción de elongación se añadieron 20ul de H₂O grado biología molecular a cada reacción.

9.9. PCR cuantitativa (qPCR)

Las reacciones se realizaron añadiendo 5 ul del reactivo *2x iTaq SYBR Green Super mix* (Cat.no. 1725121), 0.4 ul (400nm) del primer *Forward* y el primer *Reverse*, y 2ul de cDNA por reacción, llevando a un volumen final de 10ul con H₂O grado biología molecular. Se realizó la reacción de amplificación en el equipo BioRad CFX96 configurando el siguiente programa: Activación de la polimerasa por 30s a 95°C seguido de 48 ciclos de 10s a 95°C y 30s a 60°C. La especificidad de la reacción se verificó mediante un análisis de curva de fusión inmediatamente posterior a los ciclos de amplificación.

9.10. Enriquecimiento de DNA nuclear versus DNA total

Se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento utilizando el método de delta delta Ct, comparando la variación de la expresión del gen ribosomal 18s, con el gen mitocondrial mtCOX partiendo de DNA de dos condiciones orígenes distintos, DNA nuclear y DNA total, donde el promedio del CT del gen ribosomal se normaliza respecto a la expresión del gen mitocondrial. Obtenido este valor se obtiene el diferencial entre los CTs de nuestra muestra de interés (DNA nuclear) versus la muestra control (DNA total), mismo valor que se utiliza como exponente para obtener la variación relativa de la expresión génica en la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

9.11. ATAC-seq

9.11.1. Reacción de transposición

Partiendo de los núcleos aislados, se tomó un volumen de la suspensión equivalente a 25,000 núcleos y se centrifuga a 500x g por 5 minutos a 4°C. Se desecha el sobrenadante y el *pellet* se resuspende en 25 ul de Buffer de transposición (12.5 ul TD Buffer 2x, 0.25 ul Digitonina 1%, 0.25ul Tween 10%, 8.25 ul PBS, 1.25ul Tagment TDE1 enzyme, 2.5 ulH₂O grado biología molecular). La suspensión se incubo a 37°C durante 30 minutos a 750 RPM en el equipo HCM100-Pro tras lo cual se pasa directamente a hielo para impedir que la enzima siga teniendo actividad y se purifica la librería mediante el kit MinElute de Qiagen (Cat. No. 28204) siguiendo las instrucciones del fabricante.

9.11.2. Amplificación de la librería

La amplificación y etiquetado de los fragmentos generados se llevó a cabo preparando una reacción de PCR conteniendo 10ul del DNA fragmentado, 12.5 ul del Master Mix de NEBNext High-Fidelity (2x) y 1.25 ul del adaptador universal i5 y el mismo volumen del adaptador i7 correspondiente. Se realiza una extensión inicial por 5 minutos a 72°C y posteriormente se mantienen las siguientes condiciones durante 5 ciclos: 98 °C por 10 s, 63 °C por 30 s y 72 °C por 1 min. Para las reacciones de extensión y amplificación de la librería se ocupó el equipo Axygen Maxygen II.

Se prosiguió a determinar el número de ciclos adicionales necesarios para la amplificación de nuestra librería de accesibilidad amplificando parte de nuestra librería original (2.5ul) mediante qPCR y determinando el número de ciclos al cual se alcanza a un tercio de la fluorescencia máxima (Figura 6). Durante este proceso las librerías originales se preservan en hielo, las cuales una vez definido el número de ciclos adicionales, se amplificaron

utilizando las mismas condiciones de temperatura y tiempo de las reacciones descritas para la amplificación inicial.

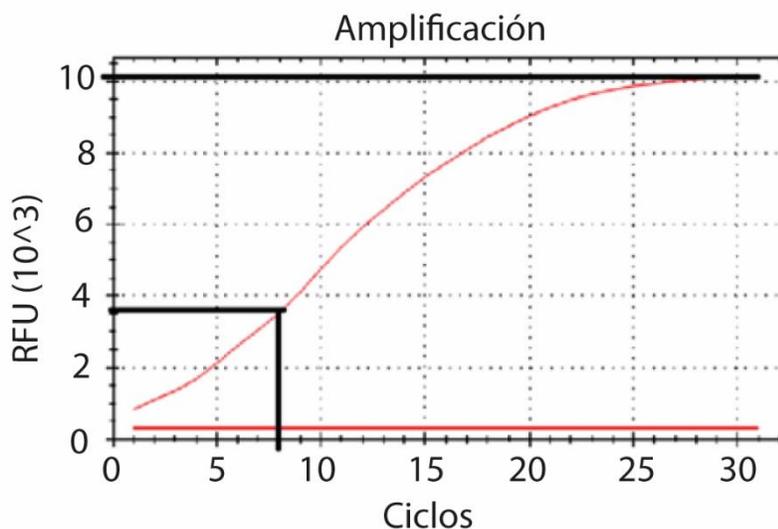


Figura 6. Curva de amplificación de librería de accesibilidad. En este ejemplo, la máxima RFU (Relative Fluorescence Units, eje y) es de $\pm 10,300$ que se alcanzan al ciclo 29 de amplificación (eje x). Se calcula un tercio de la RFU máxima, se traza una recta a la curva partiendo de este resultado y el valor del eje x donde interaccionan la recta y la curva de amplificación determina el número de ciclos extras de amplificación de las librerías.

9.11.3. Purificación de librería amplificada

Subsecuente a la amplificación se removieron los oligonucleótidos utilizados para la reacción de amplificación utilizando el sistema de perlas magnética *AMPure XP Reagent* para la selección de fragmentos. Se agregaron 1.5 volúmenes (33.75ul) de las perlas magnéticas, previamente atemperadas, a la reacción de PCR y se incubaron a temperatura ambiente por 15 minutos. Al finalizar el tiempo de incubación se transfirió la suspensión en un tubo de microcentrífuga de 1.5ml y este se colocó en un separador magnético por 5 minutos, esperando que las perlas se adhirieran a las paredes del tubo lo cual permite retirar la fase acuosa que contiene los fragmentos a descartar. Las perlas magnéticas, se

lavan con una solución de alcohol etílico al 80% para posteriormente retirar todo el etanol residual y resuspender las perlas en buffer TLE (Tris HCl pH 8 10mM, EDTA pH 8 0.1 mM) para despegar los fragmentos de DNA con los fragmentos deseados de estas. Se vuelve a colocar la muestra en un separador magnético y se recupera la fase acuosa la cual contiene la librería preparada.

Las librerías se cuantificaron utilizando un fluorómetro Invitrogen Qubit 4 mediante el kit Qubit™ 1x dsDNA HS Assay Kit (cat. No. Q33231), y se analizó la composición de los fragmentos de esta mediante un equipo agilent 2200 bioanalyzer.

9.11.4. Análisis de datos ATAC-seq

Las secuencias se generaron por Paired End Next Generation Sequencing a través de Novogene Co, mediante el equipo de secuenciación NovaSeq System 6000. Una vez obtenidas las secuencias se alinearon al genoma de referencia de ratón GRCm38 (mm10) utilizando el programa Bowtie2¹⁰⁹. Los picos de accesibilidad se determinaron utilizando *Genrich*, el cual acarrea múltiples ventajas sobre otros *CallPeakers* entre los que se encuentran el ajuste de la Tn5 y la remoción de duplicados utilizando un mismo programa y línea de comando. Los archivos *bigwigs* para la visualización de la señal de los sitios de inserción de la Tn5 (*tracks*) se obtuvieron utilizando la herramienta *BamCoverage* de la suite de Python *deepTools*¹¹⁰. A partir de los archivos *bigwigs* se generaron las regiones de enriquecimiento alrededor de los TSS, tomando un archivo *gtf* con los principales genes transcritos como referencia (mm10.ncbiRefseq.gtf.gz), obteniendo como resultado de este proceso archivos con los valores de posicionamiento de las regiones abiertas de nuestras librerías respecto al sitio de inicio de la transcripción mismos que se graficaron utilizando las herramientas *PlotProfile* y *PlotHeatmap* pertenecientes a *deepTools*.

La distribución de la longitud de los fragmentos generados posterior a su alineamiento se realizó utilizando la herramienta *bamPEFragmentSize* de la suite *deepTools*.

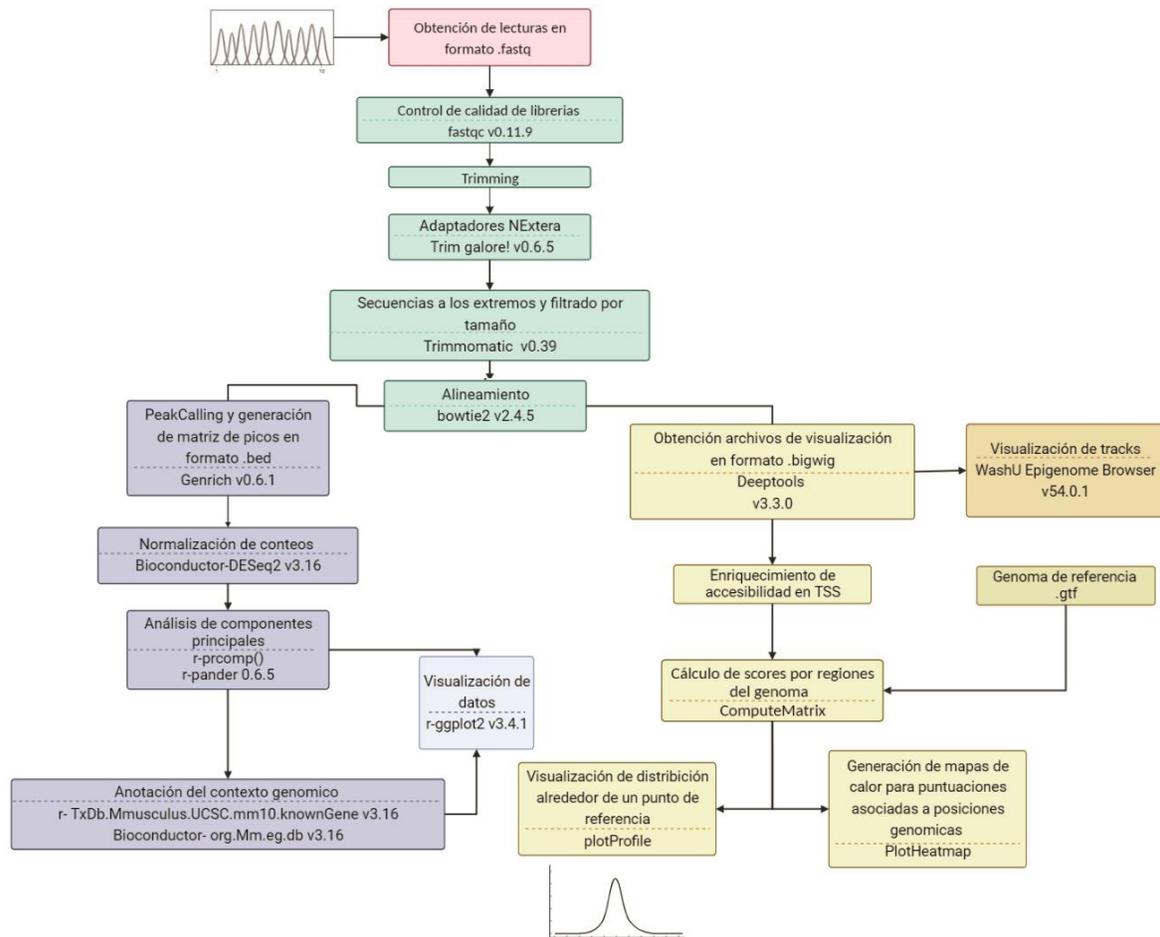


Figura 7. Descripción general de los pasos a seguir para el análisis de datos generados mediante ATAC-seq. Representación esquemática del procesamiento de los datos en librerías de accesibilidad partiendo de las secuencias. fastq (rojo) generadas por el secuenciador. En verde el procesamiento primario en el cual se filtran y alinean las secuencias. En azul generación de matriz de conteos a partir de secuencias alineadas y análisis de componentes principales y anotación de contexto genómica. En amarillo generación de archivos de visualización a partir de secuencias alineadas y análisis de enriquecimiento de accesibilidad en sitios de inicio de la transcripción.

10.Resultados

10.1. Generación del modelo de estudio

Con el fin de estudiar los cambios de accesibilidad a la cromatina en tejido adiposo blanco, el primer paso fue generar tres modelos de estudio utilizando 90 ratones macho de la cepa C57BL/6J.

Por motivos prácticos los modelos de estudio fueron divididos en 3 lotes, de los cuales cada uno contenía diez ratones mantenidos bajo una dieta norma calórica *ad libitum*(NC), diez ratones mantenidos con una dieta obesogénica *ad libitum* (HFAL) y un tercer grupo (HFRD) mantenido con una dieta obesogénica restringiendo el acceso a esta del ZT12 al ZT18 (figura 8).

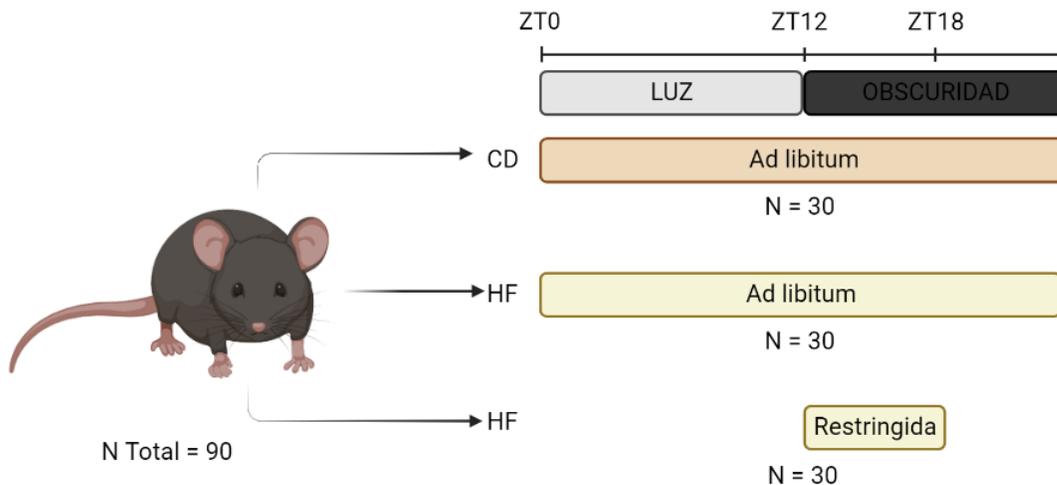


Figura 8. Esquema de trabajo de la generación de los modelos biológicos de estudio. De la n total de 90 animales, se generaron 3 grupos de ratones de 6 semanas de edad con una n de 30 cada uno, a los cuales se les sometió a los distintos regímenes alimenticios CD, HFAL y HFRD.

	<i>n CD</i>	<i>n HFAL</i>	<i>n HFRD</i>	<i>ZT</i>	<i>Estado</i>
<i>Lote 1</i>	10	10	10	4/16	Sacrificio (11- 13/05/22)
<i>Lote 2</i>	10	10	10	0/12	Sacrificio (11- 12/05/22)
<i>Lote 3</i>	10	10	10	8/20	Sacrificio (14/06/22)

Tabla 2. Disposición de los grupos de estudio. CD = Control Diet, HFAL =High Fat Ad libitum, HFRD = Hight Fat restricted

Debido a la complejidad del manejo que conlleva el generar 3 modelos distintos de estudio, cada uno con un número total de 30 ratones por grupo (n=30) por un total de 12 semanas, mismos ratones que se mantenían en constante observación, incluyendo fines de semana y días feriados, el trabajo fue realizado por partes iguales con el alumno de maestría en Ciencias Bioquímicas Luis Tenorio Hernández perteneciente al grupo de estudio de la doctora Mayra Furlan Magaril del Instituto de fisiología de la UNAM, el cual también colaboro en la realización de los TTG, los TSI y en el sacrificio y toma de muestras de los tejidos biológicos por la dificultad que presenta la realización de estas actividades con varios ratones a la vez y con plazos de tiempo establecidos (ver metodología para especificaciones del paradigma experimental). Por tanto, los datos del modelo *in vivo* son parte del trabajo de Maestría de dos estudiantes. Tras el sacrificio de los animales, los tejidos se repartieron entre ambos alumnos, para llevar a cabo los respectivos procedimientos independientes y de acuerdo con los objetivos de cada trabajo de investigación.

Analizando singularidades de los lotes, se observan diferencias significativas en el peso de los modelos del grupo HFAL respecto al grupo CD a partir de la semana 5 para el lote 1 y lote 2 y en la semana 3 para el lote 3 (Figura 9).

En el caso de las diferencias de los pesos entre el grupo HFAL y el grupo HFRD estas se observan significativas a partir de la semana 7 en lo que respecta a los lotes 1 y 2 y a partir de la semana 6 para el lote 3.

Respecto al lote 1 uno se observa una disminución en el peso de los ratones pertenecientes al grupo HFRD en la última semana del pesaje, misma que encuentra su explicación en el fallo de uno de los dispensadores de agua donde se encontraban dos ratones, por lo que la pérdida de peso se debe a deshidratación.

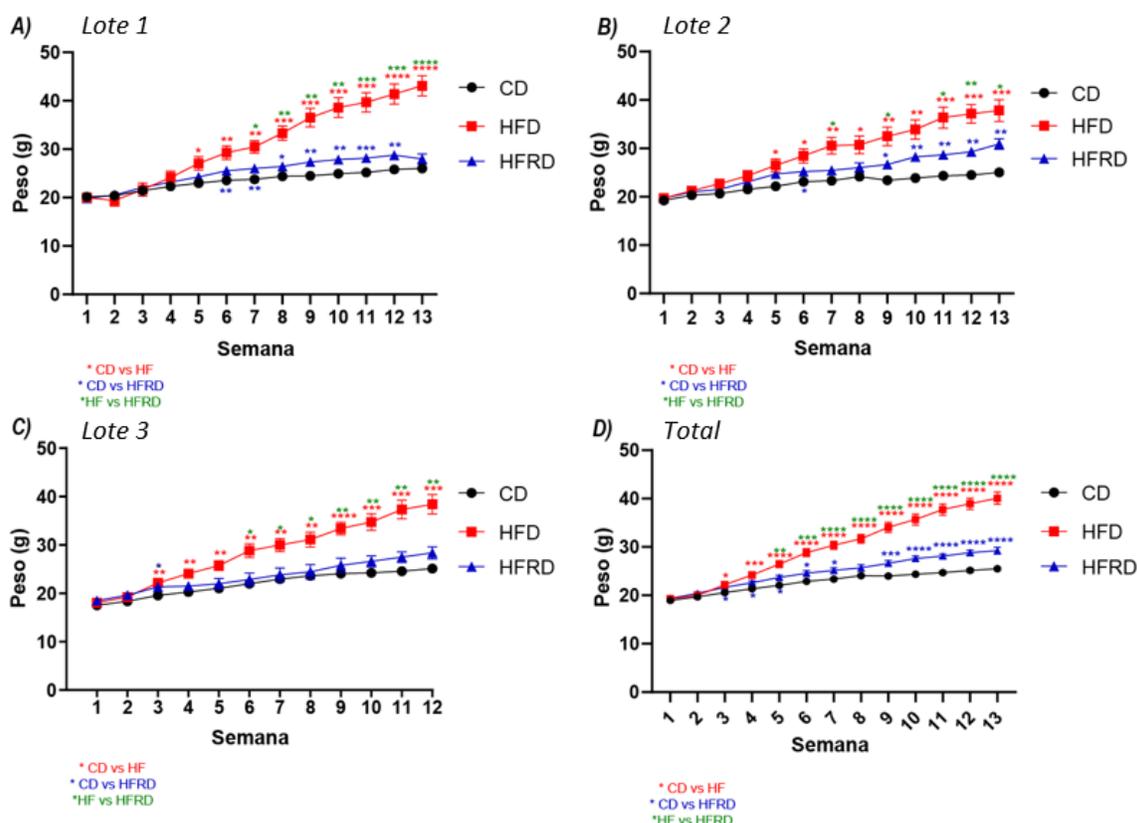


Figura 9. Registro del peso de los distintos grupos de estudio. Grafica del promedio más error estándar (n=30 por grupo), * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001. Se realizó una prueba de ANOVA de dos vías y Bonferroni post hoc comparando contra el grupo CD. CD: Dieta control *ad libitum*, HFD: Dieta alta en grasa *ad libitum*, HFRD: dieta alta en grasa restringida en tiempo

Tomando en cuenta el número total de los modelos de estudio, se observó un incremento significativo en el peso de los ratones del grupo HFAL a partir de la semana 3 del paradigma alimenticio, respecto a los ratones CD; así como un incremento significativo de

peso a partir de la semana 5 respecto al grupo HFRD. En la totalidad de los modelos por grupo, las diferencias significativas entre el grupo CD y el grupo HFRD comenzaron en la semana 6, y a excepción de la semana 8 estas se mantuvieron significativas hasta el final del tiempo establecido para la aplicación de las dietas (Figura 9).

Respecto al consumo de Kcal de alimento, tomando en cuenta la totalidad de nuestro grupo de estudio, no se observaron diferencias significativas entre el grupo CD y el grupo HFRD (exceptuando la semana 3) pese al diferente contenido calórico por gramo que contiene el alimento (3.1 Kcal/gramo para la dieta control versus 5.1 Kcal/gramo para la dieta obesogénica). Las diferencias significativas de estos dos grupos respecto al grupo HFAL comenzó desde el inicio de los paradigmas alimenticios (Figura 10)

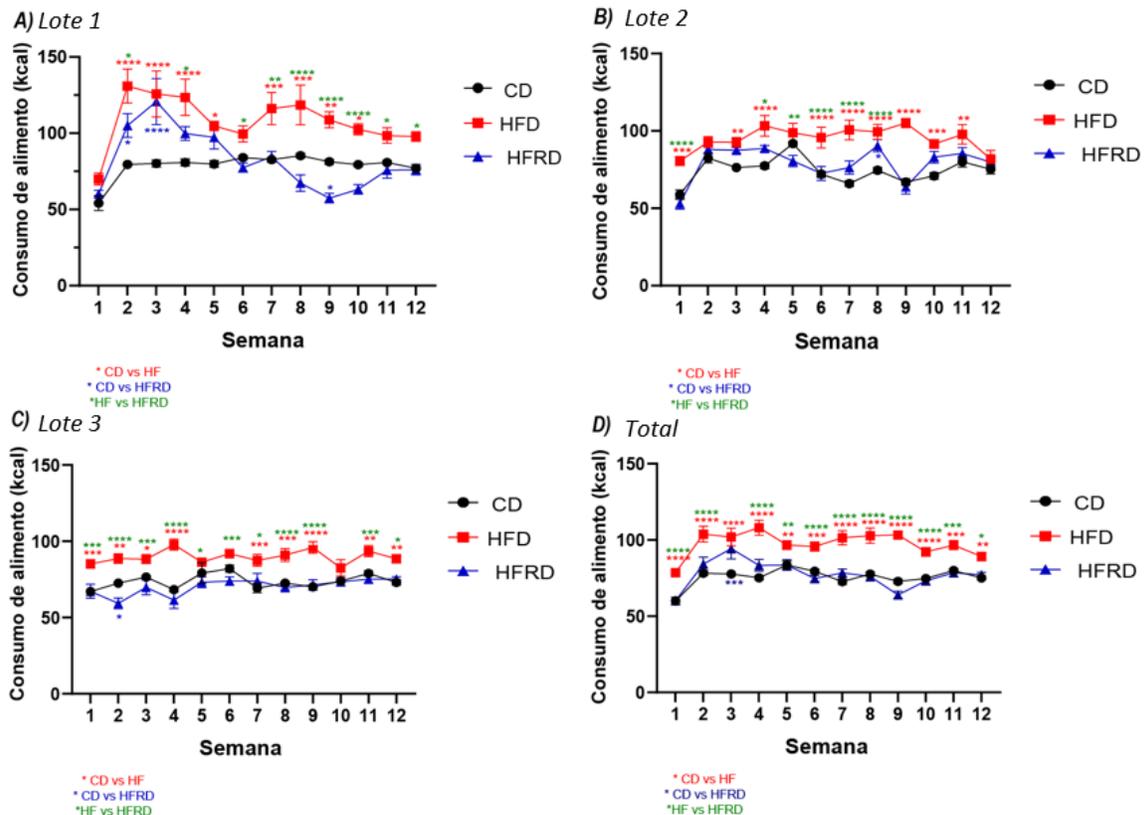


Figura 10. Registro del consumo de Kcal por semana de los distintos grupos de estudio. Grafica del promedio más error estándar (n=30 por grupo), * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001. Se realizó una prueba de ANOVA de dos vías y Bonferroni post hoc comparando contra el grupo CD. CD: Dieta control *ad libitum*, HFD: Dieta alta en grasa *ad libitum*, HFRD: dieta alta en grasa restringida en tiempo

Tomando como factor el promedio del consumo de Kcal por semana por ratón (Figura 11, A), no se encuentran diferencias significativas entre el grupo CD y el grupo HFRD, contrario a lo que se encuentra este estos grupos y el grupo HFAL.

Para verificar que el consumo energético fuera equivalente al peso de los ratones se graficó el consumo promedio de alimento entre el peso de los modelos (Figura 11, B) donde no se observan deferencias significativas entre ninguno de los grupos pudiendo concluir que no existen diferencias en el consumo calórico de nuestros grupos respecto al peso de estos.

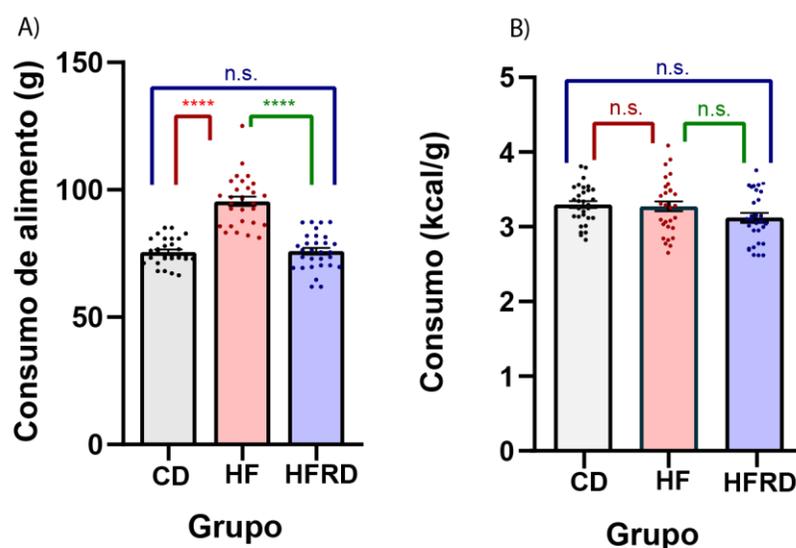


Figura 11. Consumo de alimento total y consumo de alimento respecto al peso de los modelos. A) Promedio de cantidad de consumo de Kcal por semana. B) Promedio de cantidad de consumo de Kcal entre peso del ratón por semana. Promedio + SEM (n = 30 por grupo) * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001. Se realizó una prueba de ANOVA de una y Tukey post hoc comparando contra el grupo CD. CD: Dieta control *ad libitum*, HFD: Dieta alta en grasa *ad libitum*, HFRD: dieta alta en grasa restringida en tiempo.

Corroborando lo anterior se observa que no existen diferencias significativas entre el consumo de Kcal en las primeras 4 semanas (Figura 12) del estudio versus las últimas cuatro semanas, contrario a lo observado a cuando se grafica utilizando como factor

divisor el gramaje de los animales. Esto debido a que el aumento en el peso conlleva a que el cociente vaya disminuyendo pudiendo interpretarse de manera errónea que los modelos consumen menos alimento conforme avanza el experimento, sin embargo, la evidencia ya expuesta comprueba lo contrario.

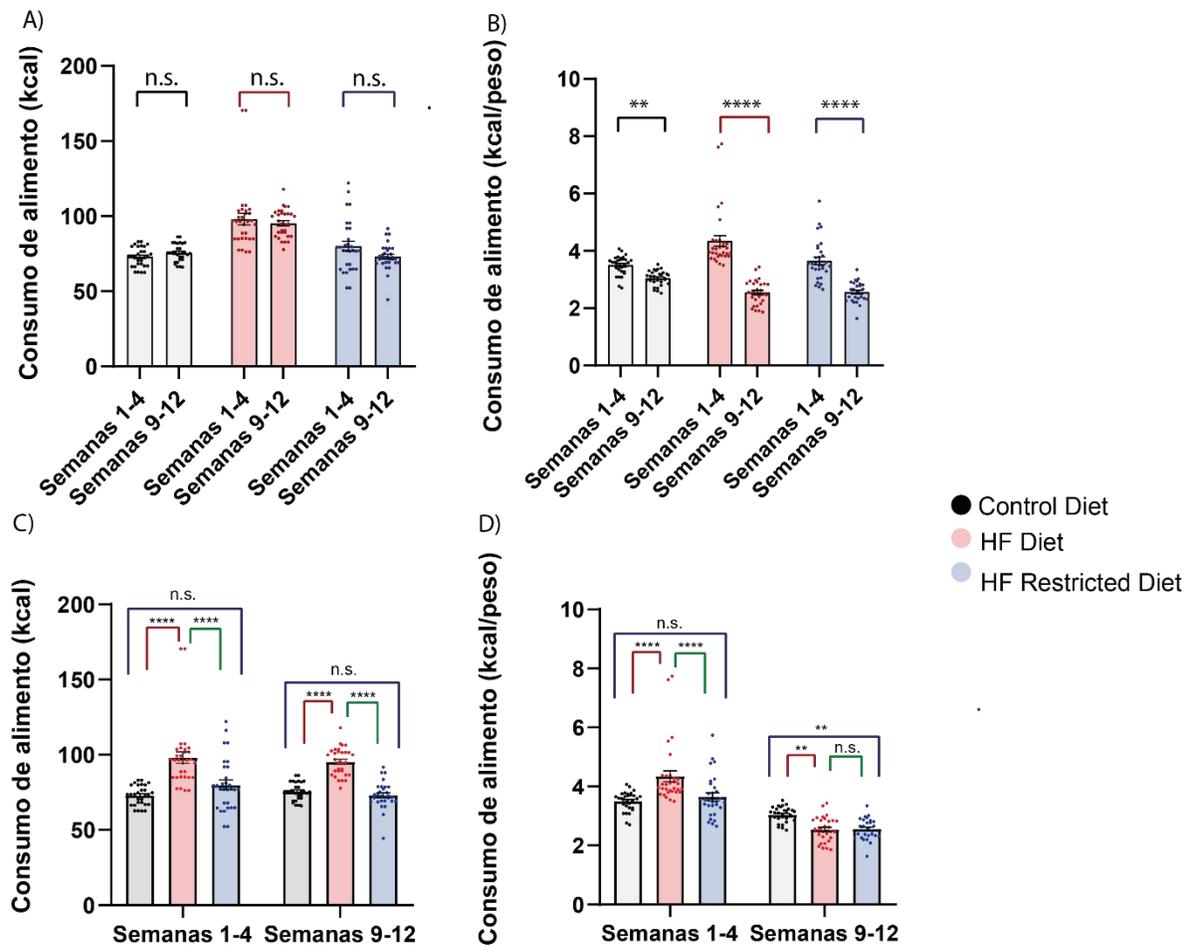
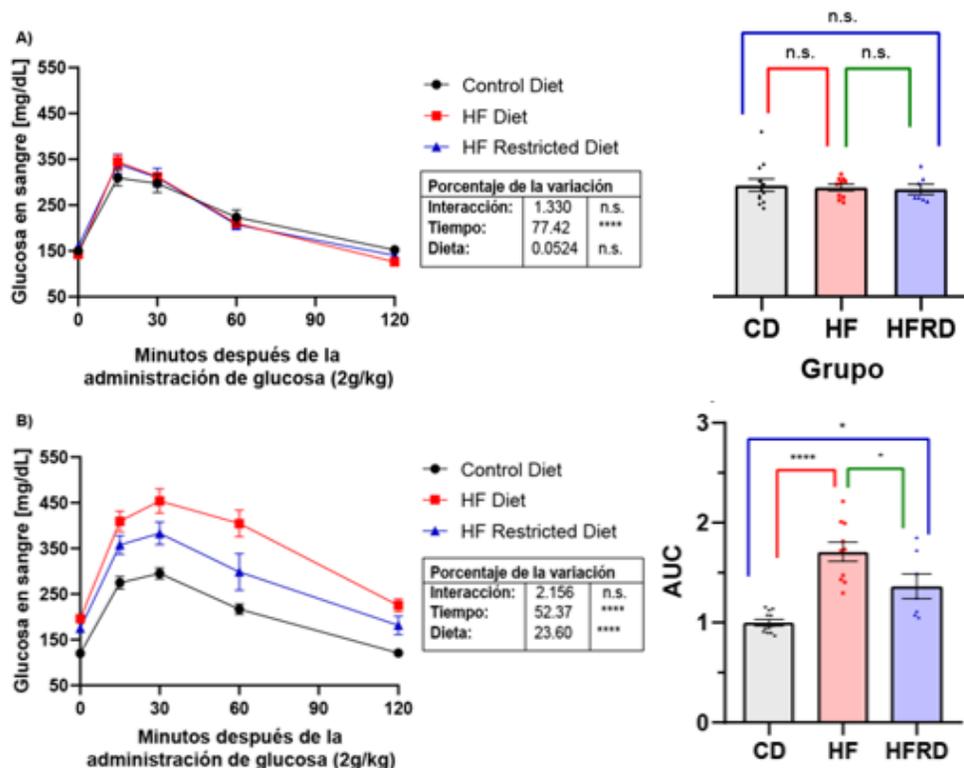


Figura 12. Consumo de alimento total y respecto al peso de los modelos en distintos puntos temporales del estudio. A) y C) Promedio de cantidad de consumo de Kcal entre la semana 1 a 4 y la semana 9 a 12. B) y D) Promedio de cantidad de consumo de Kcal entre peso del ratón entre la semana 1 a 4 y la semana. 9 a 12. Promedio + SEM (n = 30 por grupo) * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001. Se realizó una prueba de ANOVA de una y Tukey post hoc comparando contra el grupo CD. CD: Dieta control *ad libitum*, HFD: Dieta alta en grasa *ad libitum*, HFRD: dieta alta en grasa restringida en tiempo.

Con el fin de corroborar si existen cambios a nivel metabólico ocasionados por una dieta obesogénica y si la restricción temporal de acceso al alimento conlleva un efecto en el estado glicémico de los ratones, se realizaron pruebas de tolerancia a glucosa (TTG) y sensibilidad (TSI) insulina en distintos puntos temporales de los paradigmas alimenticios.

Respecto a las pruebas de tolerancia a la glucosa, los resultados obtenidos muestran que los modelos alimentados con una dieta obesogénica *ad libitum* tienen un disfuncionamiento en el manejo de la glucosa, observándose niveles de concentración en sangre significativamente más altos en los puntos muestreados tras la administración de glucosa vía intraperitoneal en comparación con los ratones control (figura 13) en las pruebas realizadas en la semana 6 (mitad del experimento) y en la semana 12 (final del experimento).



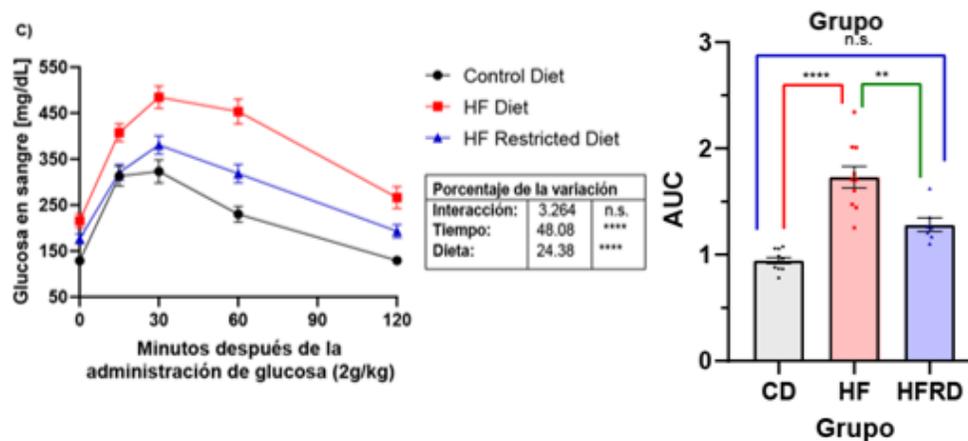


Figura 13. Cambios en la tolerancia de glucosa en los modelos pertenecientes a los distintos grupos de estudio. Concentraciones de glucosa en sangre después de aplicación intraperitoneal de D-glucosa y área bajo la curva (AUC) en la semana 0 (A), semana 6 (B) y semana 12 (C). CD n = 12, HFAL = 10, HFRD n = 7. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001. Para las curvas temporales se realizó ANOVA de dos vías y Bonferroni post hoc. AUC se realizó ANOVA de una vía y Tukey post hoc. CD: Dieta control *ad libitum*, HFD: Dieta alta en grasa *ad libitum*, HFRD: dieta alta en grasa restringida en tiempo

Como se observa en el comportamiento del área bajo la curva, existen diferencias significativas entre todos los grupos en la prueba realizada a mitad del experimento, sin embargo, no se encuentran diferencias significativas entre el grupo CD y el grupo HFRD en la semana 12, concluyendo de esta manera en que los ratones del grupo HFAL no son capaces de regular el metabolismo de la glucosa de manera óptima, efecto que se ve disminuido en el grupo con acceso restringido al alimento.

En lo referente a los pruebas de sensibilidad a la insulina se observa cómo, en el grupo control, existe un decremento en los niveles de glucosa en sangre, mismos que al final de la prueba se restablecen (Figura 14), contrario a lo observado en el grupo HFAL donde, en las pruebas realizadas en la semana 6 muestran una recuperación más paulatina de los niveles de glucosa en sangre e interesantemente en los test llevados a cabo en la semana 12, existe un aumento en la concentración de glucosa sanguínea, indicador del desarrollo de resistencia a la insulina, y la desregulación en el metabolismo de la glucosa ocasionada por la dieta en este grupo.

Analizando el comportamiento del área bajo la curva se observa como la restricción temporal del acceso al alimento parece ser un factor en la sensibilización a la insulina, ya que no se muestran diferencias significativas entre el grupo HFRD y el grupo CD lo cual es un indicador de la optimización de la captación de insulina independiente de la composición de la dieta (figura 14).

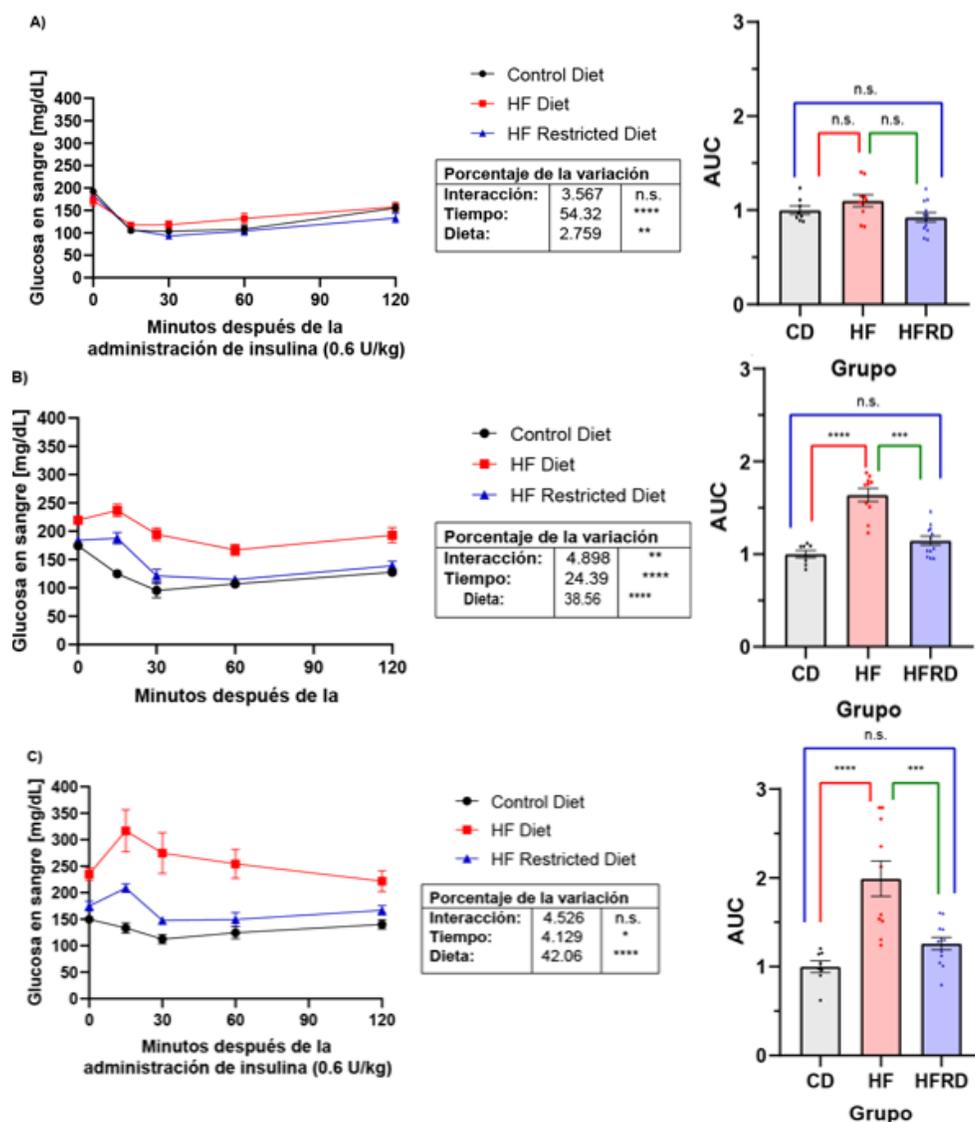


Figura 14. Cambios en la sensibilidad a insulina en los modelos pertenecientes a los distintos grupos de estudio. Concentraciones de glucosa en sangre después de aplicación intraperitoneal de insulina recombinante y área bajo la curva (AUC) en la semana 0 (A), semana 6 (B) y semana 12 (C). CD n = 8, HFAL = 10, HFRD n = 12. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001. Para las curvas temporales se

realizó ANOVA de dos vías y Bonferroni post hoc. AUC se realizó ANOVA de una vía y Tukey post hoc. CD: Dieta control *ad libitum*, HF: Dieta alta en grasa *ad libitum*, HFRD: dieta alta en grasa restringida en tiempo

Tanto los datos del peso de los ratones como los de las pruebas de resistencia a glucosa y de sensibilidad a insulina nos indican que la generación de nuestros modelos (Figura 15) se realizó con éxito.



Figura 15. Diferencias fenotípicas entre ratones de los grupos de estudio. Imagen representativa de las diferencias entre ratones pertenecientes a nuestros tres grupos de estudio al final de la semana 12 de mantenimiento de los regímenes alimenticios. CD: Dieta control *ad libitum*, HFAL: Dieta alta en grasa *ad libitum*, HFRD: dieta alta en grasa restringida en tiempo.

10.2. Estandarización del aislamiento de núcleos de células de tejido adiposo

Debido a las exigencias derivadas como requerimiento de los experimentos subsecuentes (ATAC-seq) y de las propias limitaciones del tejido, la correcta extracción de núcleos provenientes de tejido adiposo resulta fundamental, por lo que la estandarización de un protocolo de extracción se vuelve una actividad prioritaria.

En primera instancia se trabajó en la estandarización de la extracción de nucleostomando como precedente los protocolos descritos por Corces et al.¹¹¹ y por Benitez et al.¹¹² con los que posteriormente se trabajaría para poder realizar el RNA-seq y el ATAC-seq. En los protocolos a tratar se parte del principio de lisar las células mediante el uso del buffer HBU para que se liberen los componentes de los adipocitos incluida la vacuola lipídica y posterior aislamiento de núcleos mediante gradientes de iodixanol. En una práctica control se realizó en paralelo el aislamiento de núcleos de tejido hepático y tejido adiposo.

Partiendo de tejido congelado (20 mg para hígado y ~200 mg para tejido adiposo) se lograron extraer núcleos de células hepáticas y en muy pequeñas cantidades y de calidad deficiente núcleos de tejido adiposo. Se teorizó que el método de homogenización del tejido no era el adecuado debido a las características que presenta este por lo cual en prácticas posteriores se trabajó en mejorar este paso.

Como resultado de estas modificaciones, se obtuvo un mayor número de núcleos comparado con prácticas anteriores: 932,000 núcleos/ml en caso de una muestra proveniente de 280mg de tejido y de 190,000 núcleos/ml respecto a una muestra originaria de 500mg y con una morfología similar a la óptima (Figura 16A y 16B respectivamente).

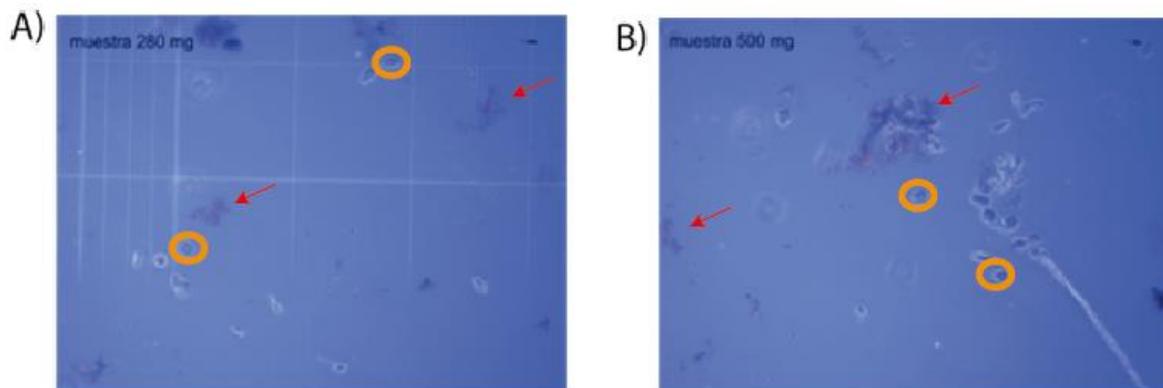


Figura 16. Aislamiento de núcleos por gradiente de iodixanol. Imágenes representativas de los núcleos provenientes de tejido adiposo de 280mg y 500mg (aumento 20x) tras su recuperación del gradiente de iodixanol. Círculos naranjas: núcleos representativos sin morfología óptima, flechas rojas: debris celular.

En paralelo a esto, se implementó el protocolo de extracción de núcleos provenientes de adipocitos descrito por Van Hauwaert ¹¹³ en el que se parte de tejido adiposo congelado para el aislamiento de núcleos. Para este protocolo se utilizaron dos muestras de tejido adiposo blanco, con peso de 240 mg y 400 mg, de las cuales se obtuvieron 101,000 núcleos/ml y 4,320,000 núcleos/ml. Los resultados de dicha prueba se mostraron

alentadores debido a la cantidad de núcleos obtenidos (en especial de la muestra proveniente del tejido con peso de 400mg (figura 17).

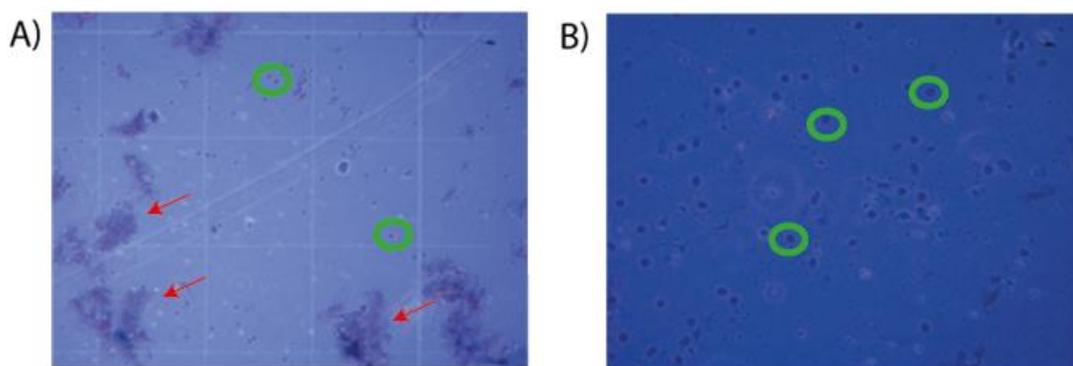
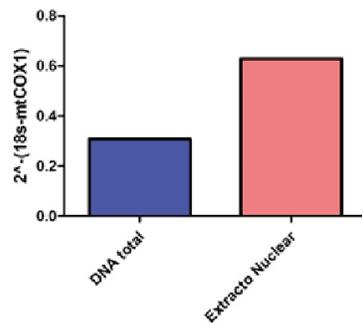


Figura 17. Aislamiento de núcleos por metodología de Van Hauweart. Visualización al microscopio de aislamiento de núcleos teñidos con azul tripano provenientes de muestras de a) 240mg (aumento 10x) y b) 400mg (aumento 20x). Círculos verdes: Núcleos representativos con morfología óptima, flechas rojas: debris celular.

De los núcleos aislados por ambas metodologías se realizó una qPCR para amplificar el gen mitocondrial *COX1*, codificante para la subunidad 1 de la citocromo C oxidasa y otra qPCR para amplificar el gen nuclear *18s*, codificante para el RNA ribosomal 18s lo que nos daría indicios del enriquecimiento del DNA nuclear con respecto al DNA mitocondrial lo cual resulta imperante debido a que el DNA mitocondrial interfiere en los experimentos posteriores y disminuye la calidad de la secuenciación e indirectamente nos arroja como resultado la correcta implementación de esta metodología para el aislamiento de núcleos.

Los resultados del análisis de enriquecimiento muestran un ratio 2:1 para los núcleos aislados mediante el protocolo de gradiente de Iodixanol (figura 18, A) mientras que en el mismo análisis comparando los núcleos aislados mediante el protocolo de Van Hauweart contra el DNA total en tejido adiposo proveniente de ratones bajo una dieta control se observa un enriquecimiento mucho mayor de DNA nuclear.

A)



B)

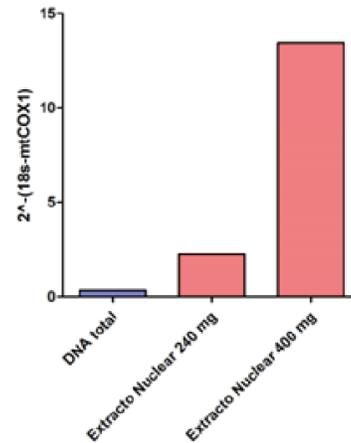


Figura 18. Cociente de amplificación Cox/18S por qPCR en muestras de tejido adiposo blanco. Niveles de amplificación de DNA mitocondrial (mtDNA) medidos por qPCR, en tejido adiposo blanco de ratones control a A) Núcleos aislados mediante protocolo de Córces et al. a partir de 250mg de AT. B) Núcleos aislados mediante protocolo de Van Hauweert et al. a partir de 240 y 400 mg de AT.

Debido a los resultados mostrados tanto en la obtención de núcleos y observación de su morfología y número; como los resultados del enriquecimiento de DNA nuclear se optó por proseguir optimizando el protocolo de Van Hauwert para su posterior uso en la futura obtención de tejido adiposo blanco procedente de nuestros modelos de estudio.

Subsecuentemente se prosiguió a optimizar el aislamiento de núcleos con el objetivo de obtener resultados consistentes; implementando un mayor número de *strokes* con ambos pistilos del homogeneizador y añadiendo tiempos de incubación del homogeneizado en hielo, dando como resultado mejor rendimiento y reproducibilidad en la extracción de núcleos (~2,500,000 núcleos/ml partiendo de 250mg de tejido) (Figura 19). El protocolo final se describe en la sección de metodología.

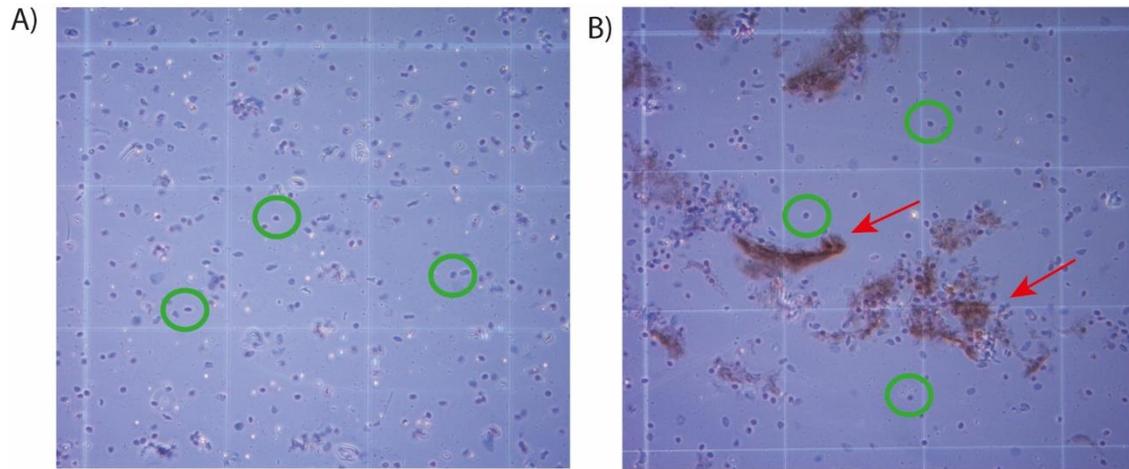


Figura 19. Alistamiento de núcleos de tejido adiposo blanco por método de Van Hauwaert modificado. Visualización al microscopio (Aumento 20x) de aislamiento de núcleos teñidos con azul tripano en relación 1:1 provenientes de muestras de WAT normocalórico A) 250mg y B) 260mg. Círculos verdes: Núcleos representativos con morfología óptima, flechas rojas: debris celular.

Relativo a lo anterior, se observa diferencia significativa al realizar la comparativa entre la cuantificación de núcleos obtenidos mediante el método de Van Hauwaert modificado versus los dos métodos de extracción previamente utilizados (Figura 20).

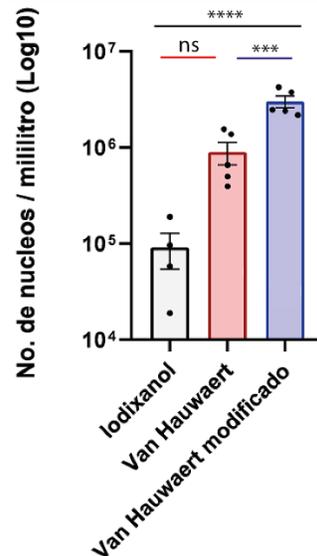


Figura 20. Comparación del número de núcleos obtenidos por los distintos métodos de aislamiento. Promedio de cantidad de núcleos (n) aislados provenientes de tejido adiposo criopreservado utilizando distintos protocolos de extracción partiendo de ≈ 290 mg tejido. Iodixanol, n = 4, \bar{x} = 107,250 n/ml; Van

Hauwaert n = 5 \bar{x} = 896,000 n/ml; Van Hauwaert modificado n =5 \bar{x} = 3,014,000 n/ml. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001. Se realizó ANOVA de una vía y Tukey post hoc.

En conclusión, la estandarización de un protocolo de extracción de tejido adiposo resulto fundamental para garantizar la reproductibilidad de los resultados. Este proceso implicó la selección cuidadosa de los procedimientos y de los reactivos utilizados, así como la optimización de las condiciones de extracción para maximizar el rendimiento de los núcleos obtenidos. En resumen, la estandarización de extracción de núcleos de WAT resulto un paso crítico para la realización de este proyecto.

10.3. Estandarización de la técnica de ATAC-seq

Se realizó la estandarización de la técnica de ATAC-seq la cual aplicada a nuestros modelos nos permitirá determinar el nivel de accesibilidad a la cromatina de los distintos grupos y los cambios generados por los distintos panoramas alimenticios.

Para la prueba se partió del aislamiento de núcleos de tejido adiposo blanco congelado con peso de 160 mg proveniente de un ratón control. Resultado de este aislamiento se obtuvo un conjunto de 245,000 núcleos por mililitro.

Subsecuentemente se obtuvo un volumen equivalente a 24,500 núcleos, mismos que son suficientes para la reacción de transposición la cual fue llevada a cabo tomando como base el protocolo de Corces et al¹¹⁴ , en donde se parte del principio de utilizar una Transposasa hiperactiva Tn5 para insertar secuencias adaptadoras en regiones abiertas de la cromatina, y que se describe en la sección de métodos. La concentración de la librería fue de 16.8 ng/ul, que quedaron resuspendidos en un volumen de 20 ul de buffer TLE.

Para verificar si la transposasa corto adecuadamente la cromatina se analizó el tamaño de las librerías generadas mediante el equipo *TapeStation*-Agilent de la unidad de biología molecular del Instituto de Fisiología Celular, observando que en efecto se había generado un patrón correspondiente a la periodicidad esperada de 180-190 pb debido a la periodicidad nucleosomal (figura 21).



Figura 21. Distribución de tamaños de la librería de ATAC-seq. Visualización de arreglo del tamaño los fragmentos que componen la librería de accesibilidad de WAT control. Diagramas generados por el equipo Agilent 2200 *TapeStation* System.

Complementario a esto se comprobó el resultado del ATAC-seq realizando un qPCR contra regiones control para corroborar la calidad de las librerías generadas (figura 22).

Se utilizaron oligonucleótidos previamente diseñados en el laboratorio sobre regiones control en el hígado. En el caso de los promotores de los genes *Gata1* y *MyoD*, los cuales no deberían tener actividad transcripcional en nuestro tejido de interés debido a que se encuentran involucrados en procesos de diferenciación eritroide y de miogénesis respectivamente, parecen tener un enriquecimiento menor que el DNA genómico lo que nos indicaría que funcionan de igual manera como controles negativos.

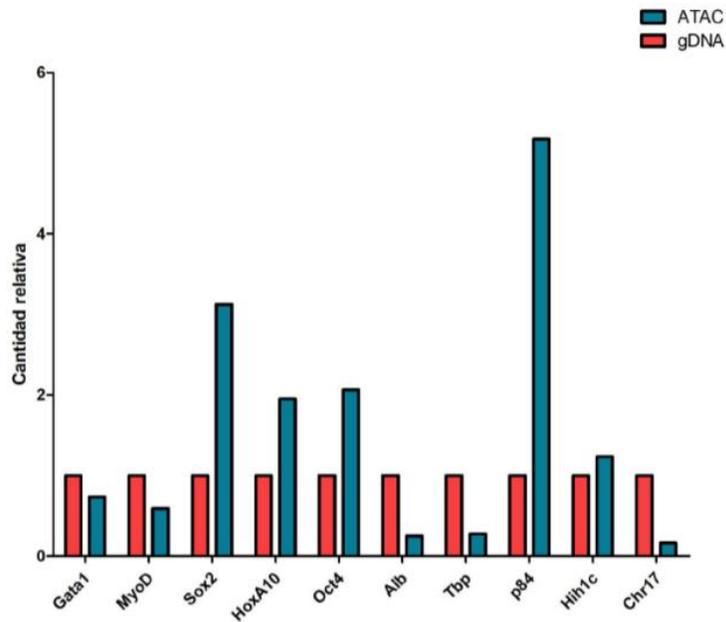


Figura 22. Evaluación de la accesibilidad de regiones específicas del genoma librerías de ATAC-seq. Observación de la amplificación mediante qPCR de genes representativos en tejido adiposo entre secuencias de regiones accesibles a la cromatina en librerías de ATAC (barras azules) y DNA genómico (barras rojas). Expresión de genes de referencia en el DNA genómico normalizada a uno.

En el caso de *Sox2*, *HoxA10* y *Oct4* que son de manera muy general marcadores de pluripotencia se observó un enriquecimiento mayor en la muestra de ATAC-seq comparada con la muestra de DNA genómico lo que probablemente se deba la diversidad de tipos celulares en el tejido adiposo entre los que se encuentran precursores de adipocitos, células mesenquimales estromales y macrófagos, que expresan estos marcadores.

En el caso de la albúmina, no muestra un enriquecimiento de su accesibilidad en concordancia con lo esperado para el tejido adiposo. Con respecto al gen *Tbp*, el cual codifica para la TATA binding protein, y cuya amplificación se esperaba como un control positivo no se observó enriquecimiento alguno. Sin embargo, el promotor de *p84*, un gen requerido para el transporte de mRNAs del núcleo al citoplasma, función necesaria para cualquier línea celular, fue la región más enriquecida, lo que indica su uso de manera correcta como control positivo.

Los resultados obtenidos nos darían indicios de la correcta aplicación de la técnica sin embargo lo óptimo sería la generación de primers específicos para regiones abiertas de la cromatina en tejido adiposo, paso fundamental para la correcta corroboración de las librerías de ATAC.

La librería generada en el ensayo piloto se secuenció utilizando el sistema NovaSeq 6000 de Illumina, obteniendo como resultado de esto el archivo fastq con un total de 304,161,583

de lecturas pareadas. La librería se mapeo en contra del genoma de ratón mm10 para posterior análisis (Tabla 3).

Muestra	Lecturas totales	Lecturas post-trimming	Porcentaje mapeado	Mapeados solo una vez	Picos de accesibilidad
ATAC_piloto	304,161,583	302,330,333	94.05%	66.99%	42,342

Table 3. Panorama de la secuencia de ATAC piloto.

La distribución de fragmentos obtenida con el programa ATACGraph muestra la existencia de un pico alrededor de las 90pb seguida de picos subsecuentes representando nucleosomas y di-nucleosomas, correspondiente a lo esperado (figura 23 A). Se observo la abundancia de regiones accesibles a la cromatina en la proximidad de sitios de inicio de la transcripción (figura 23 B) y la accesibilidad en la longitud de genes (figura 23 C). En lo referente a la accesibilidad próxima a sitios de inicio de la transcripción (TSS) de genes activos se pueden observar un claro enriquecimiento en el centro del TSS, señal disminuye a medida que existe una mayor distancia a esta región.

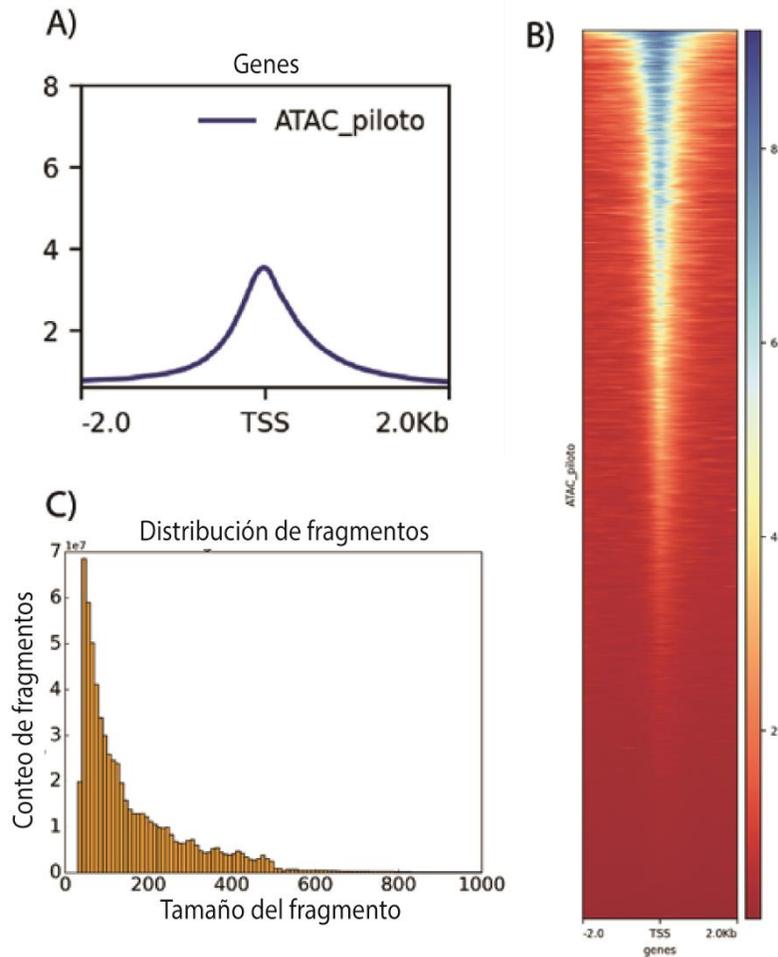


Figura 23. Visualización del análisis de los datos del ATACseq piloto. A) Distribución de tamaño de fragmentos de accesibilidad a cromatina de tejido adiposo B) Accesibilidad alrededor de los sitios de inicio de transcripción C) Accesibilidad en la longitud de genes

Posteriormente se determino la distribución genómica de los picos de accesibilidad a la cromatina y se obtuvo como resultado que la mayoría de los picos de accesibilidad se encuentran en el promotor de los genes, así como en zonas intergenicas y la fracción no codificante de los genes(intrones)(Figura 24).

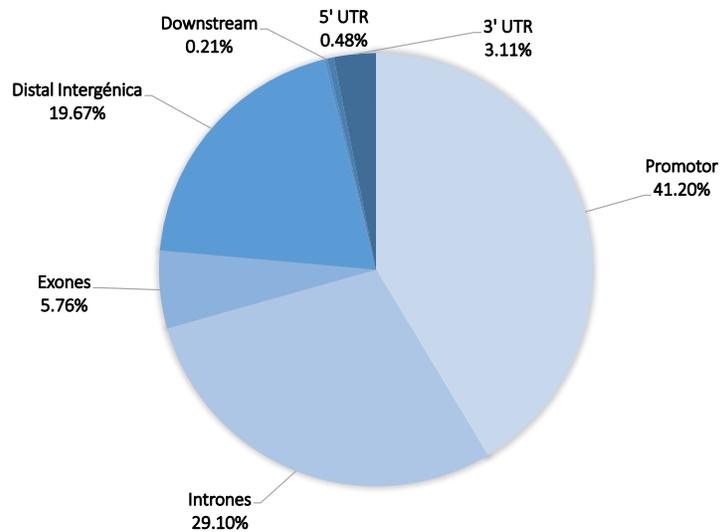
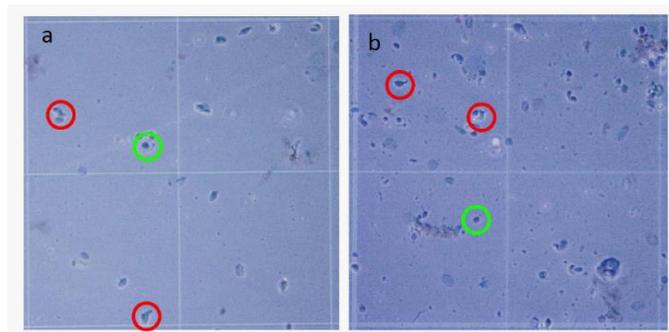


Figura 24. Anotación de los sitios genómicos donde se encuentran los picos de accesibilidad la librería de ATAC-piloto. Distribución genómica de los picos de accesibilidad en las librerías de tejido adiposo proveniente de un ratón alimentado con dieta control ad libitum.

10.4. Generación de librerías de accesibilidad - grupo HF

Se tomo una n de 2 para cada uno de los ZTs (ZT 4 y ZT16) de los cuales se procesaron fragmentos de 450 y 460 mg miligramos para los tejidos provenientes de ratones sacrificados al ZT4 y dos fragmentos de tejido de 450 mg provenientes de ratones sacrificados al ZT16 y se prosiguió con el protocolo antes descrito utilizado en la prueba piloto, para el aislamiento de núcleos correspondientes a nuestros grupos de estudio (Figura 25) de los cuales, una vez extraídos se tomó un volumen equivalente a 25,000 núcleos para realizar la reacción de transposición.



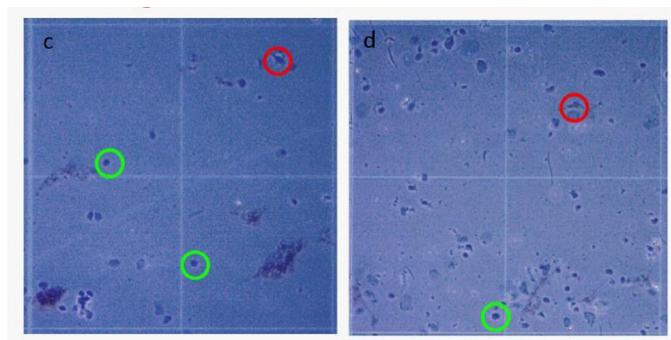


Figura 25. Observación de los núcleos aislados de las muestras de WAT de modelos obesos. tinción mediante azul tripano de A) Replica 1 ZT4. B) Replica dos ZT4. C)Replica uno ZT 16. D) Replica dos ZT16. Círculos verdes, núcleos con morfología óptima. Círculos rojos, núcleos con morfología de mala calidad.

Tras la reacción de transposición, amplificación de la librería y purificación se prosiguió a cuantificar la concentración de las librerías (tabla 4) y a realizar el análisis de calidad y composición de los fragmentos mediante el equipo *TapeStation*-Agilent donde se observó que en el caso de las réplicas correspondientes al ZT4 se presenta un pico alrededor de las 180pb, sin embargo, no se observa el patrón esperado donde se observan picos alrededor de las 360 y 560pb, resultado de la presencia de di nucleosomas y tri nucleosomas y cuya ausencia sea atribuido de manera general a una pobre calidad de la librería.

Librería	Concentración
HFZT4 Replica 1	20.6 ng/μl
HFZT4 Replica 2	21.4 ng/μl
HFZT4 Replica 3	10.2 ng/ μ l
HFZT4 Replica 4	6.24 ng/ μ l
HFZT16 Replica 1	6.66 ng/ μ l
HFZT16 Replica 2	17.7 ng/μl
HFZT16 Replica 3	17.6 ng/μl
HFZT16 Replica 4	19 ng/μl

Tabla 4. Inventario de librerías. librerías de accesibilidad a la cromatina de WAT de ratones del grupo HFAL y concentración cuantificada mediante QUBIT. En negritas librerías que se secuenciaron.

De igual manera, en las librerías correspondientes al ZT16 se obtuvo una limitante en los resultados derivado de la complejidad de la elaboración de librerías de accesibilidad sobre nucleos extraídos de tejido adiposo hipertrófico. En el caso de la réplica número uno no se

obtuvieron picos de accesibilidad lo cual se podría deber a la calidad del material inicial y respecto a la réplica 2 si bien se observa un pico correspondiente a las 180 pb, no se observa el efecto esperado por la presencia de di nucleosomas y tri nucleosomas (figura 26).

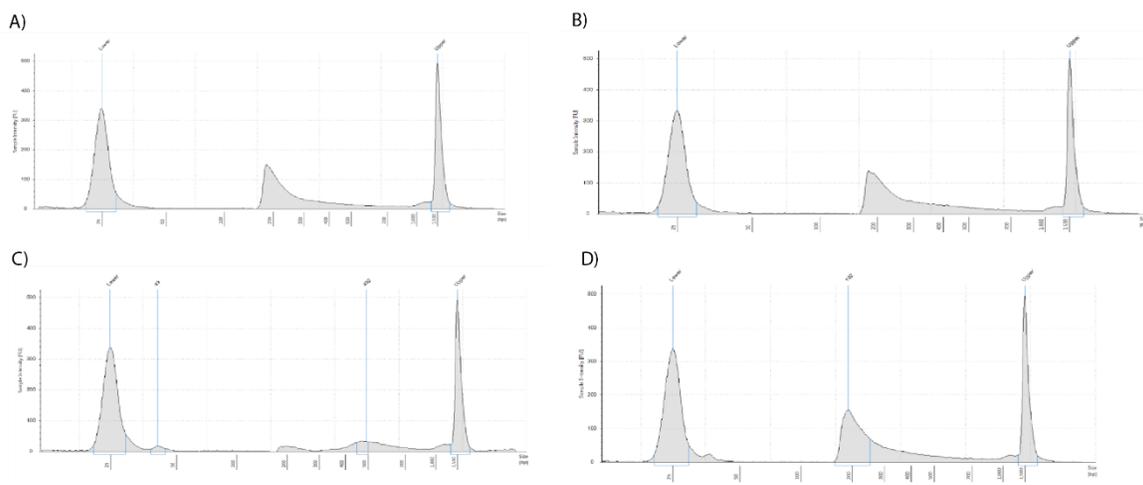


Figura 26. Distribución de tamaño de librerías de ATACseq Ronda 1. Periodicidad de las librerías de accesibilidad. A) Réplica 1 ZT4. B) Réplica 2 ZT4. C) Réplica 1 ZT16. D) Réplica 2 ZT16. Diagramas generados por el equipo Agilent 2200 *TapeStation System*.

Debido a que los resultados de la distribución de tamaños de la librería no fueron los óptimo para aseverar que las librerías de accesibilidad eran de buena calidad, se realizó una segunda ronda de reacciones de transposición con el objetivo de generar 4 nuevas librerías de accesibilidad sin embargo los patrones del tamaño de fragmentos y de periodicidad nucleosomal (Figura 27) son semejantes a las librerías de accesibilidad generadas con anterioridad, ya que no se observa el patrón nucleosomal esperado en ninguna de las librerías generadas para el grupo HF. En este escenario, se teorizó que la reacción de transposición probablemente estaba siendo hiperactiva lo cual contribuiría a que los fragmentos di y tri nucleosomales se cortaran en demasía, por lo cual se implementó una curva de tiempos de incubación con la transposasa con el fin de determinar si un menor tiempo de exposición de la reacción de transposición daba como resultado un patrón óptimo de distribución de fragmentos.

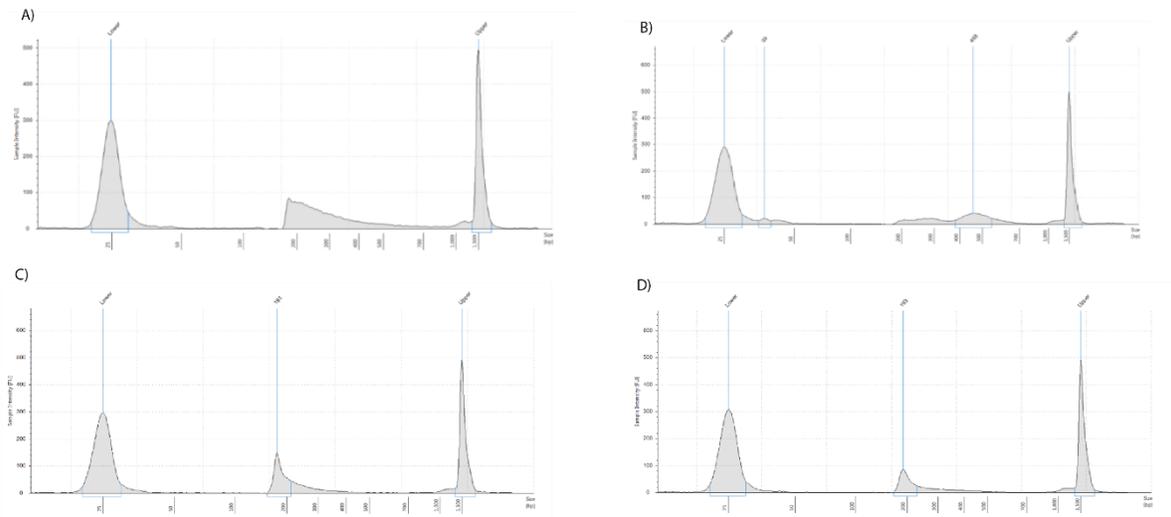


Figura 27. Distribución de tamaño de librerías de ATACseq Ronda 2. Tamaño de los fragmentos que componen las librerías de accesibilidad correspondientes a la segunda ronda de ATACseq. A) Replica 3 ZT4. B) Replica 4 ZT4. C) Replica 3 ZT16. D) Replica 4 ZT16. Diagramas generados por el equipo Agilent 2200 TapeStation System.

10.4.1. Curva de incubación Tn5

Se realizaron dos rondas de ATACs partiendo de dos fragmentos distintos de WAT congelado extraído de un mismo ratón con dieta hipercalórica *ad libitum*.

En la primera ronda de ATACs se partió de un fragmento de 300mg del cual se aislaron núcleos y de la misma suspensión se tomó un volumen equivalente a 25,000 núcleos para las reacciones de transposición. La transposición se llevó a cabo por un total de 2 minutos (Figura 28, A) 5 minutos (Figura 28, B) y 10 minutos (Figura 28, C) para posteriormente continuar con el protocolo de la generación de la metodología de la misma manera que en ocasiones previas.

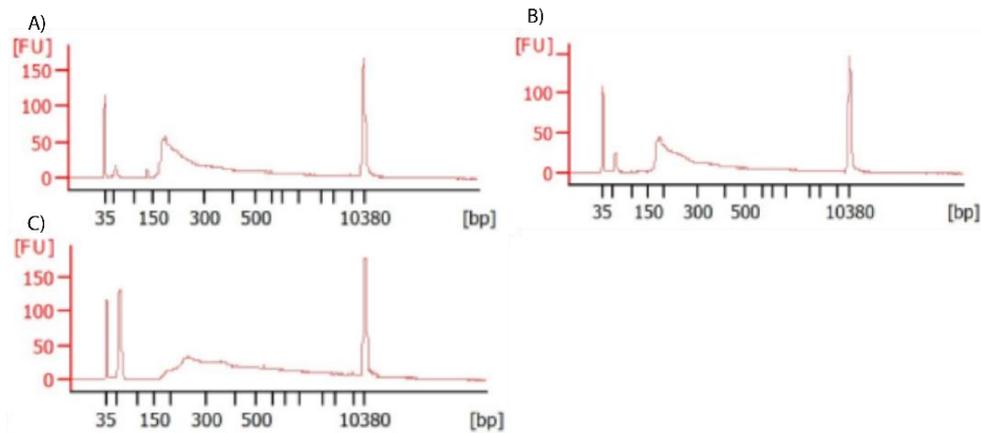


Figura 28. Distribución de tamaño de librerías de accesibilidad. Tamaño de los fragmentos que componen las librerías de accesibilidad correspondientes a la curva de exposición a la Tn5. A) 2 minutos. B) 5 minutos. C) 10 minutos. Diagramas generados por el equipo Agilent 2100 BioAnalyzer System.

Una segunda ronda de ATAcS se llevó a cabo partiendo de un fragmento de WAT de 320mg para el aislamiento de núcleos. De la misma suspensión de núcleos se tomó un volumen equivalente a 25,000 para las reacciones de transposición, las cuales se llevaron a cabo por un total de 15 minutos (Figura 29, A), 20 minutos (Figura 29, B), 25 minutos (Figura 29, C) y 30 minutos (Figura 29, D).

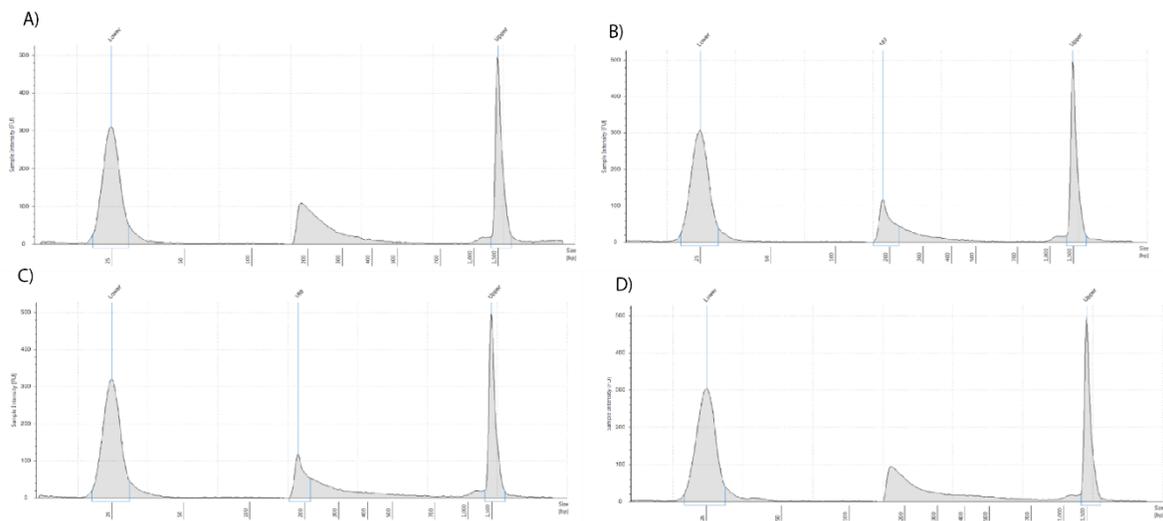


Figura 29. Distribución de tamaño de librerías de accesibilidad. Tamaño de los fragmentos que componen las librerías de accesibilidad correspondientes a la curva de exposición a la Tn5. A) 15 minutos. B) 20 minutos. C) 25 minutos. D) 30 minutos. Diagramas generados por el equipo Agilent 2200 TapeStation System.

Debido a que no se encontraron diferencias en los patrones de distribución de los fragmentos de las librerías de accesibilidad se concluyó que el tiempo de exposición a la transposasa no es un factor diferenciador en la generación del patrón nucleosomal, por lo que se prosiguió a secuenciar a poca profundidad (~ 15,000,000 lecturas pareadas), para verificar si las librerías preparadas para el grupo HF son de utilidad.

Con lo anterior se concluyó que el tiempo de reacción con la transposasa no era el factor determinante para la generación de los patrones de distribución de los fragmentos que componen las librerías de accesibilidad.

10.5. Análisis de las librerías de accesibilidad del grupo HF

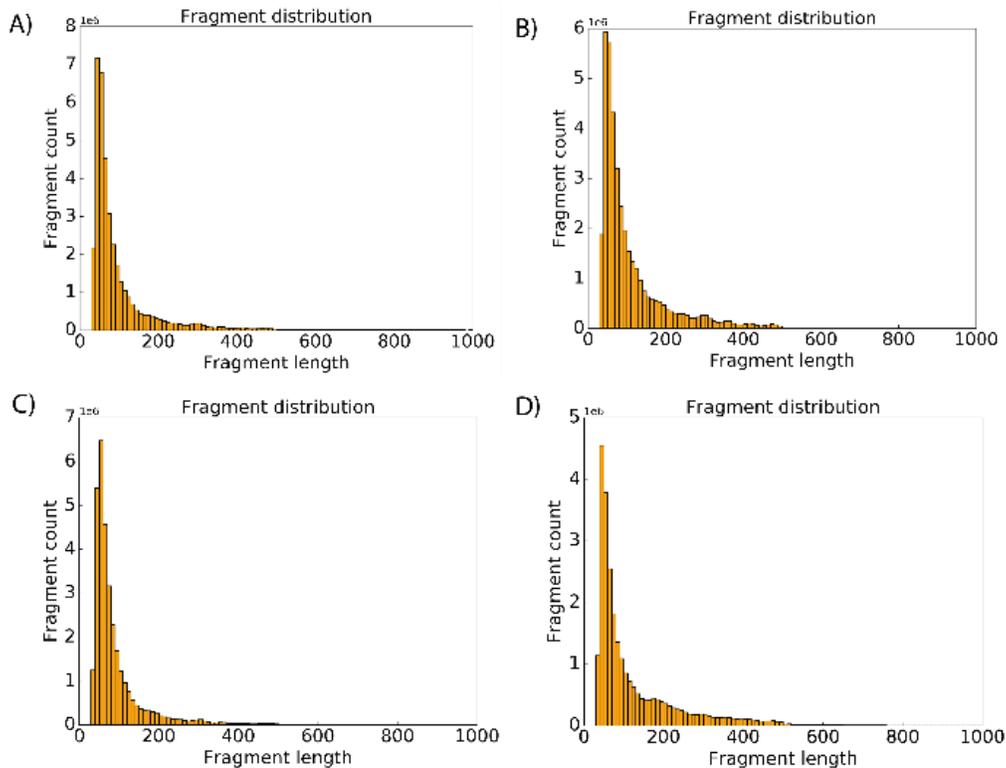
Debido a las concentraciones de las librerías, así como a los patrones que mostraban en el *Bioanalyzer* se decidieron secuenciar 2 librerías correspondientes al ZT4 y 3 librerías correspondientes al ZT16 (Tabla 4, negritas), denominadas a partir de ahora HF4_1, HF4_2, HF16_2, HF16_2 y HF16_3 respectivamente.

En una primera instancia se trataron las secuencias en crudo para removerles los adaptadores y se hizo una selección de fragmentos con longitudes que van de los 35 a los 90 pares de bases (Apéndice, Control de calidad de secuencias), que por consenso general es lo mínimo requerido para realizar un alineamiento, en cual fue aplicado utilizando el genoma de ratón mm10 como genoma de referencia.

Muestra	Lecturas totales	Lecturas post-trimming	Porcentaje Mapeado	Mapeados solo una vez	Picos de accesibilidad
HF4_1	16781798	16522039	95.12%	75.71%	44579
HF4_2	14570637	14368870	97.44%	72.70%	31336
HF16_1	15637284	15493470	96.86%	79.29%	57580
HF16_2	17909030	17639770	73.50%	59.33%	56769
HF16_3	15724054	15547151	82.39%	66.39%	54361

Tabla 5. Panorama de las secuencias de las librerías de accesibilidad a la cromatina. Se muestra el número de lecturas totales, el número de lecturas posterior y al trimming y el filtrado por tamaño, así como el porcentaje mapeado. También se muestran los picos de accesibilidad por muestra.

Se observa cómo se tuvieron una cantidad elevada de lecturas mapeadas sobre las cuales se realizarían los análisis bioinformáticos posteriores. En la distribución de las secuencias alineadas (Figura 30) se observa una distribución aproximada a lo esperada donde hay un enriquecimiento anterior alrededor de los 90 pares de bases y de los 180 pares de bases, indicando fragmentos en regiones libres de nucleosomas y mono-nucleosomas respectivamente.



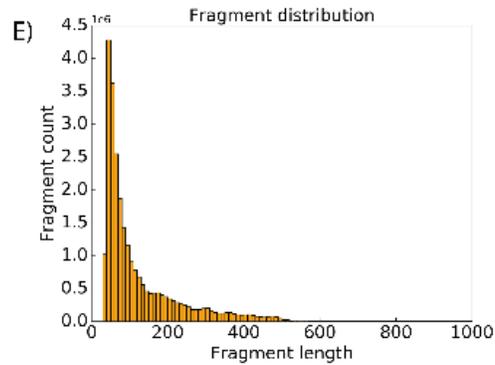


Figura 30. Distribución de los fragmentos de las librerías. Se muestra la distribución de los tamaños de los fragmentos que componen las librerías de manera posterior al alineamiento contra el genoma de referencia mm10. A) HF4_1. B) HF4_2) C) HF16_1 D) HF16_2 E) HF16_3

El mayor factor para asegurar la generación satisfactoria de la librería de ATAC-seq es la verificación del enriquecimiento de inserciones de la transposasa en regiones de accesibilidad a la cromatina conocidas (TSS enrichment), por lo que tras el paso de alineamiento se prosiguió a realizar un análisis de enriquecimiento en estas secciones utilizando datos públicos de secuencias consenso accesibles en el genoma comparando nuestros archivos pareados a este. Se puede observar como en las librerías pertenecientes al grupo HF16 se muestra un mayor enriquecimiento en los sitios adyacentes (-2kb, +2kb) a los sitios de inicios de la transcripción (Figura 31).

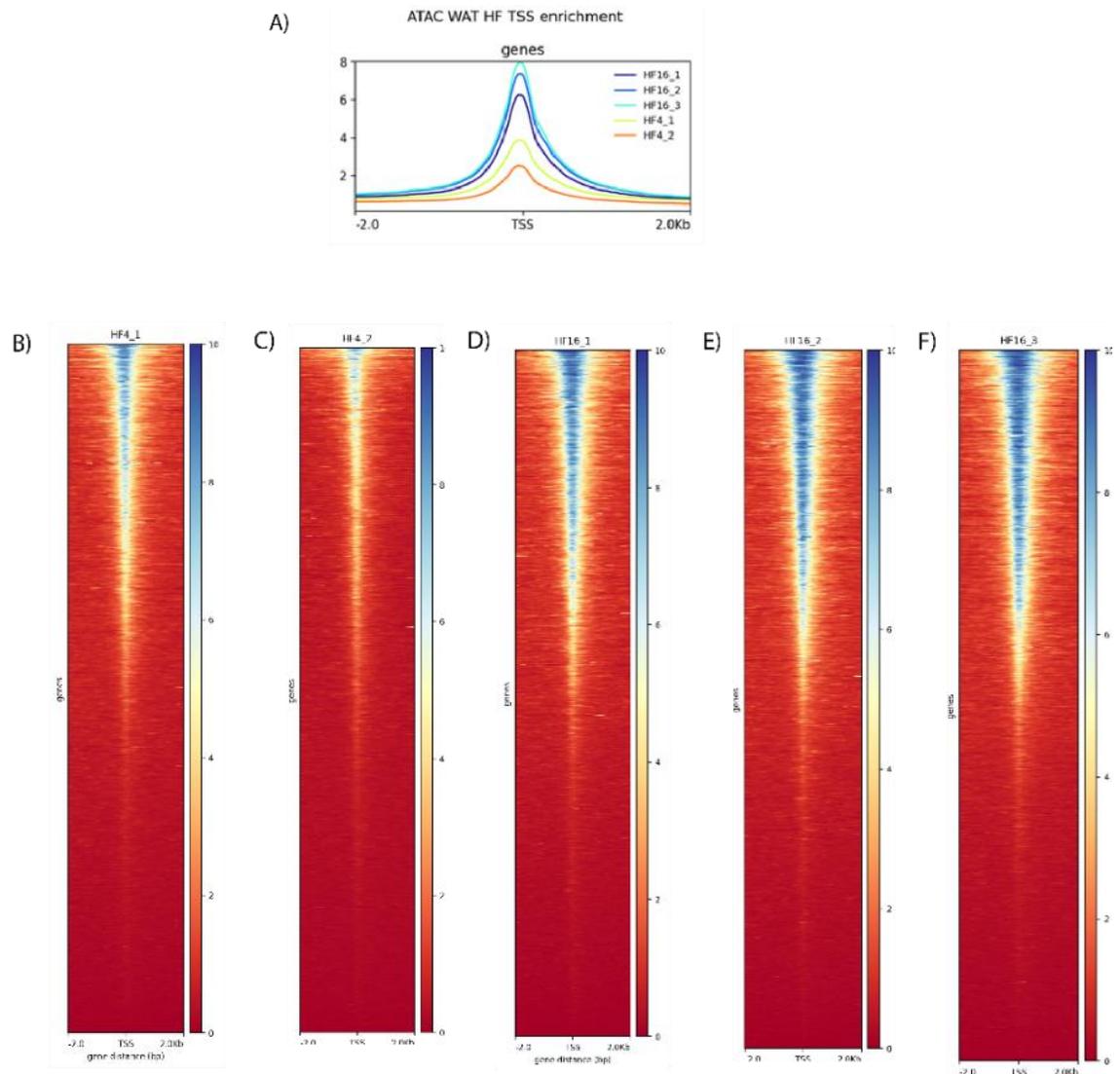


Figura 31. Análisis de enriquecimiento de los sitios adyacentes al TSS. Plot (A) y Heatmaps (B-F) de las regiones enriquecidas alrededor (-2kb, +2kb) de los sitios de inicio de la transcripción en las librerías de accesibilidad a la cromatina del grupo HF.

Al igual que con la librería de ATACseq piloto, se realizó un estudio de determinación de los picos de accesibilidad en el genoma de referencia (Figura 32) obteniendo como resultado que la distribución de la mayoría de los picos se distribuye entre el promotor de los genes, zonas intergenicas e intrones. La frecuencia de los picos de accesibilidad se mostro comparable entre las distintas librerías, confirmando la reproductibilidad entre los replicados.

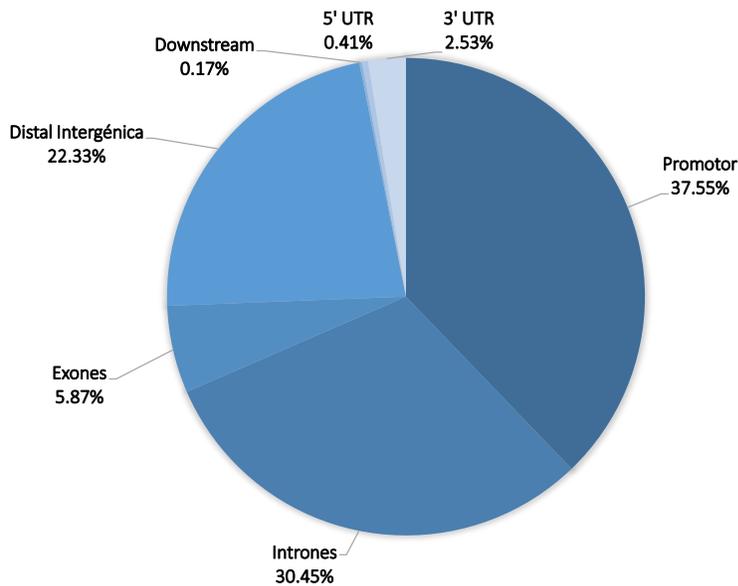
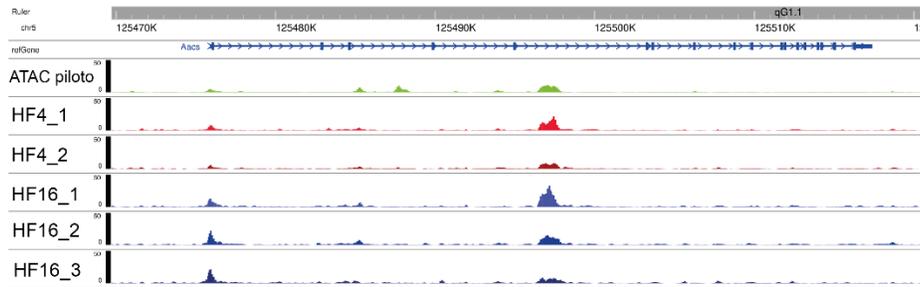


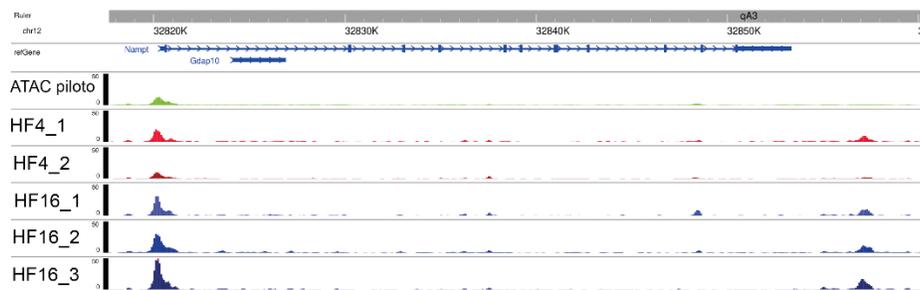
Figura 32. Anotación de los sitios genómicos donde se encuentran los picos de accesibilidad. Distribución genómica de los picos de accesibilidad en las librerías generadas mediante ATACseq sobre núcleos aislados de tejido adiposo de ratones alimentados con dieta obesogénica *ad libitum*. El porcentaje de señal de accesibilidad que se encuentra en cada región se indica en la figura.

Se realizó una visualización de los *tracks* sobre genes que se espera estuvieran activos en WAT (controles positivos) como lo son el gen *Aacs* (Figura 33, A), el cual codifica para la acetoacetyl coA sintetasa, enzima crucial en la síntesis de colesterol. Entre los otros *tracks* observados se encuentra el gen codificante para la adipocina Visfatina, *Nampt* (Figura 33, B) y *track* del gen *housekeeping* ribosomal *Rps13* (Figura 33, C), los que muestran picos de accesibilidad en el sitio de inicio de la transcripción. Por último se muestra al gen *Srebf-1* (Figura 33, D) codificante para el factor de transcripción SREBF1, proteína crucial en la biosíntesis de esteroides. Dicho gen cuenta con dos promotores, lo que provoca que se generen distintas isoformas de la proteína y en los *tracks* correspondientes a nuestras librerías de accesibilidad se muestran picos de accesibilidad en ambos promotores.

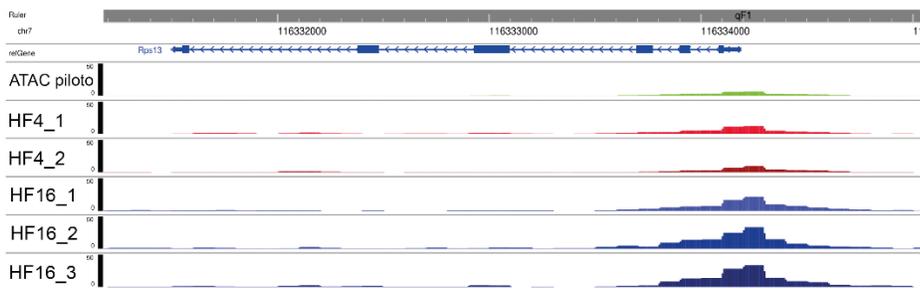
A) *Aacs*



B) *Nampt*



C) *Rps13*



D) *Srebf1*

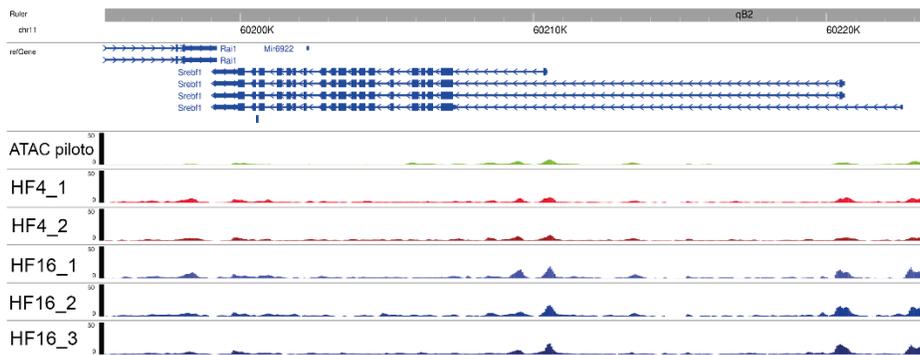


Figura 33. Datos de ATAC-seq en distintos genes representativos con accesibilidad en WAT. Visualizaciones en WashU Epigenome Browser de la intensidad de señal de las regiones accesibles de la cromatina para los genes controles positivos: A) *Aacs*. B) *Nampt*. C) *Rps13* y D) *Srebf1*. Tracks en orden descendente: ATAC piloto, HF4_1, HF4_2, HF16_1, HF16_2, HF16_3, ATAC_piloto.

Complementariamente, también se realizó la visualización de genes que se sabe no se expresan en WAT por lo que fueron utilizados como controles, como son el gen de *Alb* (Figura 34, A), codificante para Albumina, el cual se transcribe en tejido hepático, el gen *Grin2a* (Figura 34, B) codificante para un receptor de glutamato expresado solo en células de sistema nervioso central y el gen *Myog* (Figura 34, C), codificante para la Miogenina, factor de transcripción específico de musculo que induce la miogénesis.

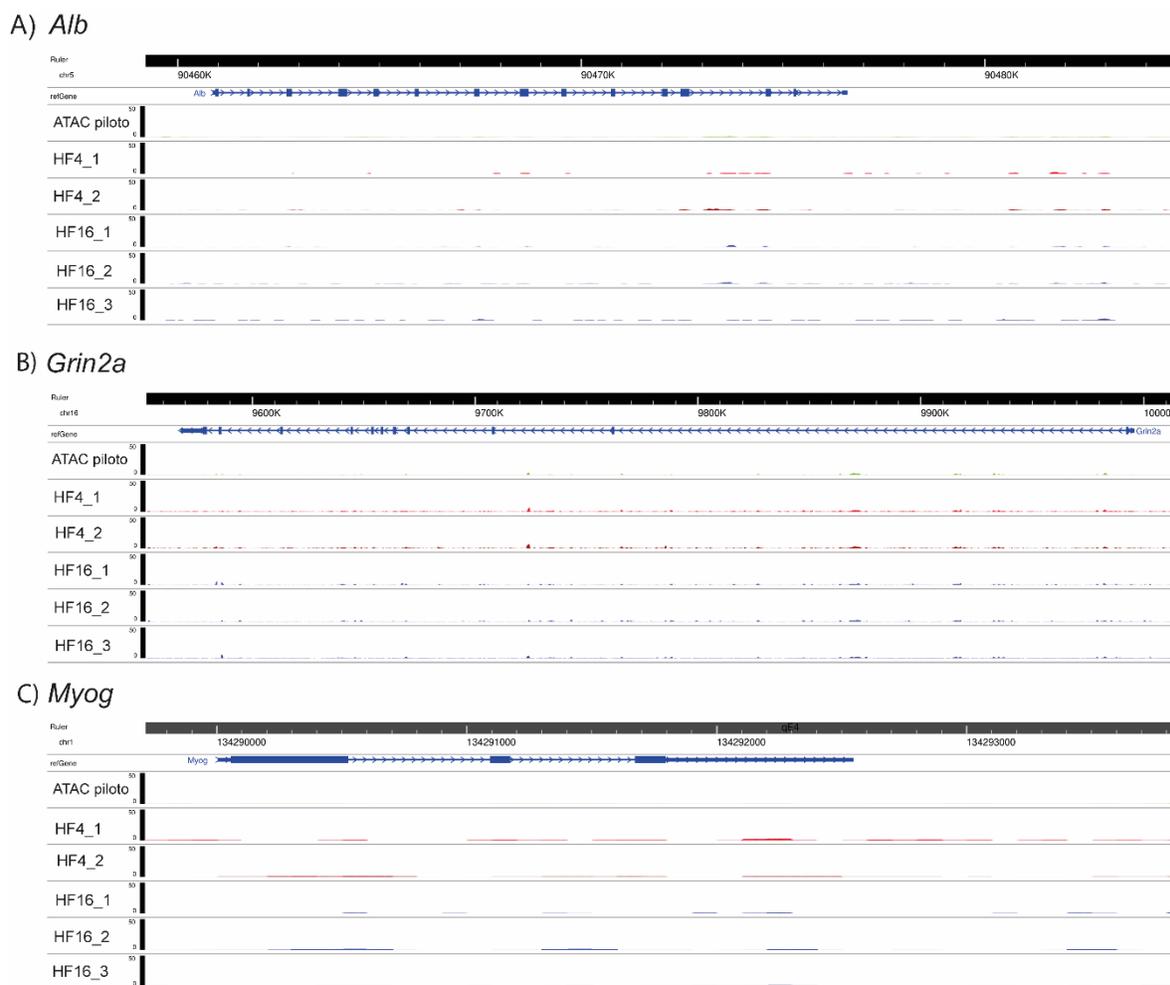


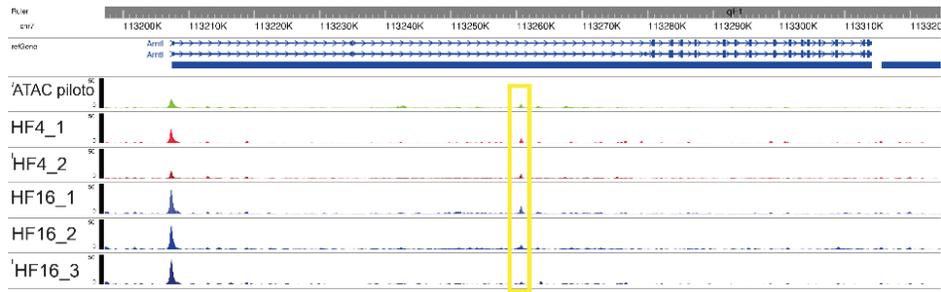
Figura 34. Datos de ATAC-seq en distintos genes sin accesibilidad en WAT. Visualizaciones en WashU Epigenome Browser de la intensidad de señal de las regiones accesibles de la cromatina para los genes controles negativos: A) *Alb*, B) *Grin2a* Y C) *Myog*. Tracks en orden descendente: ATAC piloto, HF4_1, HF4_2, HF16_1, HF16_2, HF16_3, ATAC_piloto.

Es importante mencionar que, en el caso de los genes utilizados como controles positivos, no se observan picos de accesibilidad a lo largo de la longitud del gen lo que indica, en el caso específico de los segmentos de las visualizaciones de los datos de estas librerías, que no existen picos de accesibilidad inespecíficos generados por una posible hiper exposición a la transposasa. Lo mismo se puede concluir de la visualización de los segmentos de la visualización de los controles negativos, donde no se obtienen picos de accesibilidad, señal de una buena calidad en las librerías de accesibilidad.

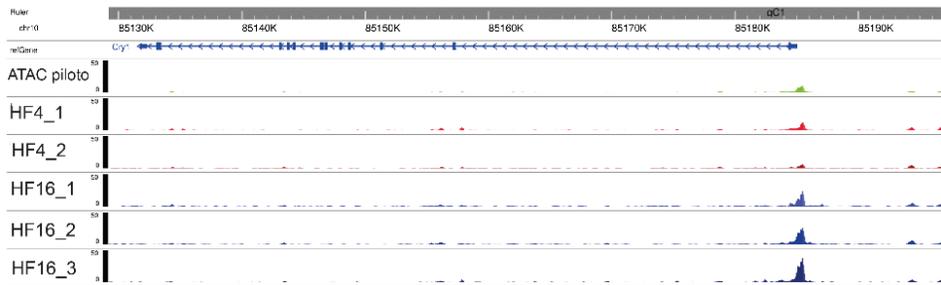
Complementariamente se realizó la visualización de genes codificantes para los elementos moleculares del reloj circadiano. Se observó el *track* correspondiente a *Arntl* (Figura 35, A), gen codificante para la proteína perteneciente al reloj circadiano BMAL1 y en cuyos *track* se observa un pico al inicio del sitio de transcripción, así como un pico de accesibilidad río abajo (resaltado en amarillo), propio de un enhancer previamente descrito de este gen.

También se observaron los *tracks* correspondientes a los genes de reloj *Cry1* (Figura 35, B) y *Cry2* (Figura 35, C), *Per1* (Figura 35, D) y *Per2* (Figura 35, E), codificantes para las proteínas CRY1, CRY2, PER1 y PER2, respectivamente y cuyos transcritos tienen un pico cercano al ZT16. En los *tracks* de visualización de los genes mencionados con anterioridad se observa una mayor amplitud en los picos de accesibilidad de las librerías del HF16 en comparativa de las realizadas al ZT4.

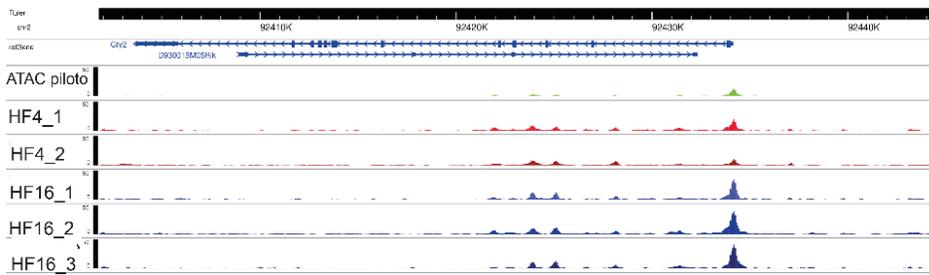
A) *Arntl*



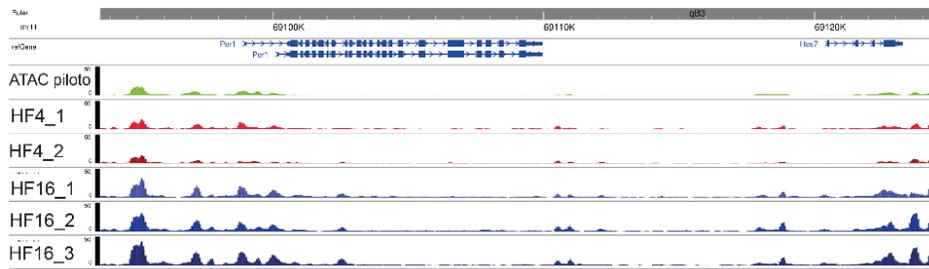
B) *Cry1*



C) *Cry2*



D) *Per1*



E) *Per2*

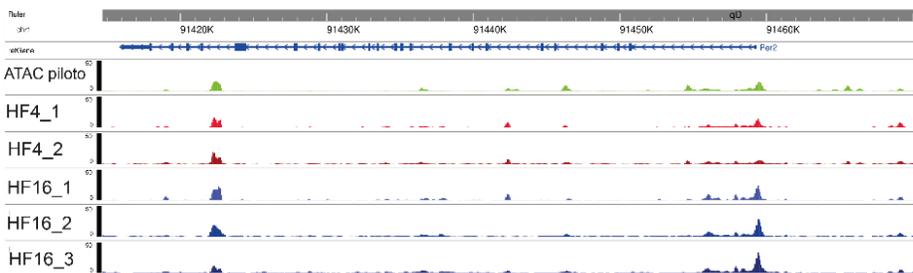
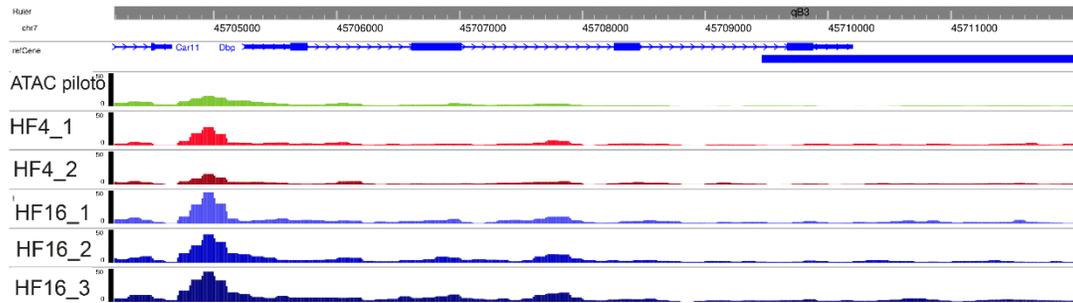


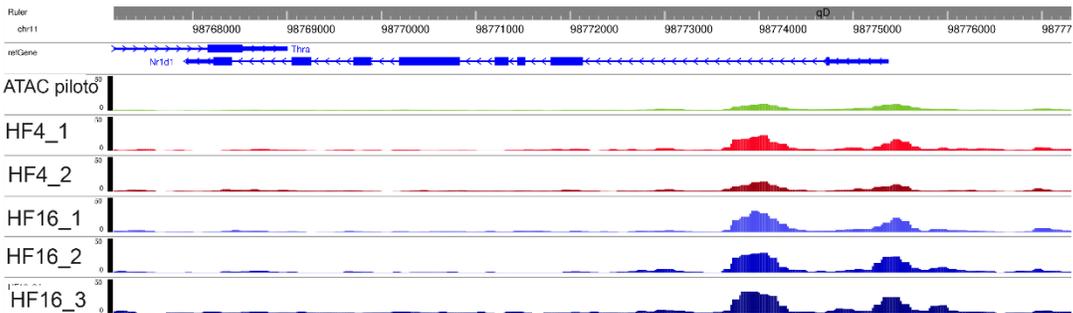
Figura 35. Datos de ATAC-seq en genes codificantes para elementos del reloj circadiano. Visualización en WashU Epigenome Browser de la intensidad de señal de las regiones accesibles de la cromatina para los genes codificantes para elementos del reloj molecular: A) *Arntl* B) *Cry2* C) *Nr1d1* D) *Per2* E) *Rora*,

De la misma manera se observaron los elementos del reloj circadiano *Dbp* (Figura 36, A), *Nr1d1* (Figura 36, B) y *Rora* (Figura 36, C), codificantes para las proteínas DBP, REVERB α y ROR α respectivamente.

A) *Dbp*



B) *Nr1d1*



C) *Rora*

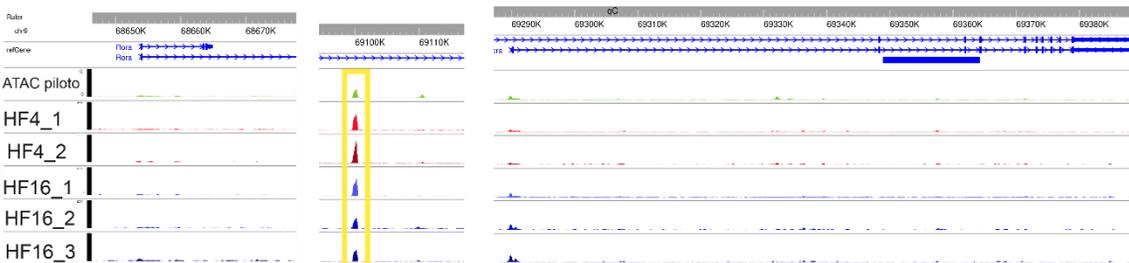


Figura 36. Visualización de genes codificantes para elementos del reloj circadiano. Visualización en WashU Epigenome Browser de la intensidad de señal de las regiones accesibles de la cromatina para los genes codificantes para elementos del reloj molecular: A) *Arntl* B) *Cry2* C) *Nr1d1* D) *Per2* E) *Rora*

Respecto al *track* relacionado al gen *Rora*, se observa que este tiene un pico de accesibilidad en una región intrónica cercana a una asociada con marcas de histonas asociadas a *enhancers*, la cual cuenta con una mayor amplitud en las librerías pertenecientes al ZT4, comparadas contra las librerías del ZT16.

Por último, se verifico por un análisis de componentes principales (PCA) (Figura 37), el agrupamiento de los datos obtenidos de las distintas librerías de accesibilidad de nuestros grupos de estudio. Se observa como en el PC1, el cual explica la mayor parte de la varianza en nuestros sets de datos, este divide a la librería HF16_3 y la librería del HF4_2 del resto de las librerías y como el PCR2 agrupa claramente a las librerías HF16_2 y HF_3 las cuales fueron generadas a la par.

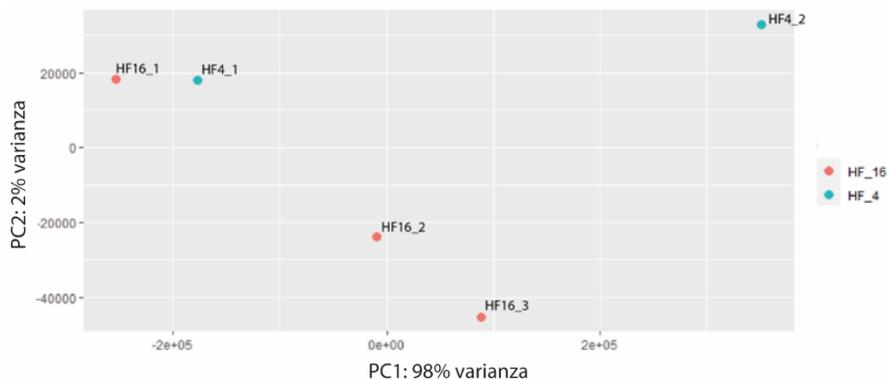


Figura 37. Agrupamiento de los sets de datos de accesibilidad a la cromatina. Análisis de componentes principales de las librerías de accesibilidad de WAT del grupo HFAL. Eje x, componente principal 1 conteniendo el 98.0% de la varianza. Eje y, componente principal 2, conteniendo el 2% de la varianza.

Los resultados del análisis de PCA muestran que las librerías tienen patrones de accesibilidad diferentes y por lo tanto es posible distinguir en los dos puntos temporales basándose en las zonas accesibles a la cromatina, lo que puede ayudar a comprender las diferencias que se dan en el eje temporal de un mismo grupo de estudio.

11. Discusión

En el presente trabajo se ha abordado la problemática de generar herramientas para dilucidar los factores moleculares que regulan los cambios adaptativos en la accesibilidad a la cromatina en el tejido adiposo blanco como resultado de una alimentación restringida en el tiempo. La investigación de la obesidad, así como de sus tratamientos, cobra importancia debido a la gran cantidad de padecimientos que se encuentran asociados a esta patología¹¹⁵. Típicamente, el déficit calórico es el tratamiento de primera elección en el tratamiento de la obesidad, sin embargo, restricciones en el acceso temporal al alimento sin la necesidad de modificar el aporte nutricional, han surgido como alternativas prometedoras, sin embargo, los mecanismos moleculares que acompañan los efectos fisiológicos de las dietas restringidas en tiempo se mantienen inciertos.

Para completar el objetivo principal de este proyecto se generaron tres modelos murinos distintos y se estandarizaron las técnicas necesarias para el estudio de la accesibilidad a la cromatina en tejido adiposo blanco, lo cual nos brindara información acerca del enriquecimiento de zonas accesibles a la cromatina entre grupos bajo distintos paradigmas alimenticios, así como los cambios ocasionados por los distintos paradigmas alimenticios y posibles factores moleculares involucrados en la generación y regulación de dichos cambios.

En una primera instancia, se completó el mantenimiento, monitoreo y posterior sacrificio de una cohorte de 90 ratones divididos en tres grupos de estudio. Los paradigmas alimenticios a los que fueron sometidos los ratones comenzaron a las 4 semanas de edad de los modelos, momento a partir del cual se mantuvieron por 12 semanas, tiempo suficiente para que el grupo de ratones con una alimentación obesogénica sin restricciones de acceso al alimento genere obesidad, así como los cambios fisiológicos asociados a esta¹¹⁶ y para acentuar los efectos generados por la restricción temporal de acceso al alimento, en concordancia con estudios realizados previamente sobre modelos murinos⁸⁰, en los que a pesar de llevar un registro por un mayor intervalo de tiempo (18

semanas) las diferencias fenotípicas en los ratones se encuentran bien marcadas desde las 12 semanas, tanto en los ratones con una dieta obesogénica *ad libitum* como con dieta restringida en tiempo.

Es importante mencionar que la dieta obesogénica utilizada, la cual contiene partes iguales de grasas saturadas y monoinsaturadas ($\pm 14\%$), ha sido utilizada con anterioridad en estudios con modelos murinos donde se demuestra que esta genera manifestaciones más pronunciadas de obesidad comparado con dietas ricas en otros tipos de ácidos grasos y otras dietas obesogénicas¹¹⁸ lo que la coloca como ideal para la generación de un modelo de obesidad inducida por la dieta.

Un debate existe entre cual es el periodo óptimo de restricción al alimento en modelos animales. En modelos murinos, diversos protocolos de alimentación que van desde las 8 horas a las 12 horas de restricción al alimento durante la fase activa de los ratones 79,¹¹⁹ muestran efectos protectores en contra de la obesidad y las patologías asociadas a esta independientemente de la ingesta calórica, sin embargo, en modelos humanos protocolos de restricción de acceso al alimento de hasta 4 horas han mostrado efectos benéficos^{120,121}. La decisión de restringir el alimento a 6 horas durante la fase activa se tomó con la intención de acentuar los cambios observados en estudios previos y dilucidar los factores moleculares que dirigen estos cambios.

Analizando los datos del monitoreo semanal del peso de los modelos se obtuvo que el grupo CD, el cual no tenía restricción temporal al alimento, obtuvo un aumento de peso respecto a la primera semana del paradigma alimenticio versus la última semana con un valor porcentual de 34%, en tanto que los ratones pertenecientes al grupo HF alimentado con una dieta obesogénica *ad libitum* tuvieron un aumento promedio del 108% a lo largo de las 12 semanas del protocolo, observándose que el aumento gradual de peso se mostró constante a lo largo de las 12 semanas de alimentación obesogénica a los que fue sometido este lote de ratones. El grupo HFRD mostro un aumento de peso del 51% a lo largo del protocolo esto sin varianza significativa en la ingesta calórica relativa al peso,

respecto al grupo HFAL, lo que indica el efecto protector de la ingesta restringida en tiempo referente al aumento del peso.

Diferencias significativas en el peso de los modelos pertenecientes a los distintos grupos, se muestran a partir de la semana 3, manteniéndose esta significancia hasta el final del experimento. La ganancia de peso del grupo HFRD fue menor a la observada en estudios previos con restricciones temporales que van de 9⁷⁹ a 12 horas ¹²² lo que se acompaña de efectos benéficos en la prevención del desarrollo de obesidad y otros marcadores metabólicos.

Analizando los datos de los TTG y el TSI, los animales pertenecientes al grupo CD recuperan los niveles de glucosa basal transcurridos los 120 minutos tras la inyección de glucosa o insulina intraperitoneal respectivamente. Un efecto similar se muestra en los modelos del grupo HFRD, contrario a lo observado en las pruebas realizadas en los modelos alimentados con una dieta obesogénica *ad libitum*, que si bien, transcurridos 120, la recuperación de los niveles de glucosa se acerca a los niveles iniciales, su recuperación es más paulatina y parten de niveles de glucosa basal más altos que los grupos anteriores. Observando el comportamiento del área bajo la curva, en el caso de los TTG y TSI, hay una clara diferencia significativa en lo que corresponde a los grupos CD y HFRD comparados contra los ratones del grupo HF en las pruebas realizadas tanto en la semana 6 del protocolo de alimentación como en la semana 12, lo que corresponde a la generación de resistencia a la insulina, característica ampliamente descrita en un modelo de obesidad inducida por la dieta¹²³. Interesantemente se presenta diferencia significativa en el TTG entre los grupos CD y HFRD a la mitad del protocolo de generación del modelo, sin embargo esta significancia desaparece al final del régimen alimenticio, lo que se complementa con que no se observa significancia alguna en ningún punto temporal del TSI, indicando que una restricción temporal de acceso al alimento, aun cuando la composición de esta dieta sea obesogénica y no se tengan diferencias en el consumo calórico respecto al grupo de alimentación *ad libitum*, se mejora la tolerancia a la ingesta de glucosa y aumenta la sensibilidad a insulina en valores comparables a los obtenidos por

una alimentación normocalórica, lo que comprueba al efecto protector de la restricción temporal de acceso al alimento independientemente del contenido energético del alimento.

Si bien no se conoce el mecanismo exacto por el cual una dieta restringida en tiempo genera estos efectos no es del todo claro, algunas de las vías propuestas implican a mTOR y la fosforilación de la cinasa S6, así como a otros mecanismos de censado de nutrientes como AMPK, CREB, y Sirtuinas los cuales tienen relación con el reloj circadiano y con proteínas modificadoras de la cromatina, siendo este un posible campo para investigar a futuro^{124,125}.

Lo anterior expuesto nos indica la correcta generación de un modelo de obesidad inducida por la dieta y un modelo murino para el estudio de los efectos a nivel molecular de la restricción temporal de acceso al alimento.

Respecto al estudio de la cromatina en WAT, la generación de herramientas para el aislamiento de núcleos íntegros provenientes de tejido crio preservado resulto fundamental para la correcta aplicación del protocolo de ATAC-seq y la generación de librerías de calidad. Aunque antecedentes recientes establecen un protocolo de ATAC-seq partiendo de núcleos extraídos de tejido fijado en formalina y embebido en parafina¹²⁶ en demasía la complejidad del protocolo y la calidad de las librerías disminuye en comparación de otros materiales de partida como tejido fresco o criopreservado.

A su vez, múltiples beneficios resultan del empleo de ATAC-seq respecto a otros métodos de estudio del perfil de accesibilidad a la cromatina, como lo son DNase-seq y MNase-seq¹²⁷. Entre los beneficios que presenta la técnica de ATAC-seq se encuentran el de que el flujo de trabajo del protocolo se realiza con una mayor sencillez y un menor coste comparado con otros protocolos así como que se es capaz de lograr librerías de accesibilidad con un numero de células tan bajo como 500, contrario a las otras técnicas que requieren un numero mucho mayor de células de inicio.

En lo referente al aislamiento nuclear, la extracción por gradiente de iodixanol ha sido ampliamente descrita para fraccionamiento celular en distintos tejidos¹²⁸ y teniéndose como antecedente directo en el laboratorio el uso de este método para el aislamiento de núcleos de tejido hepático (datos no publicados) esta fue la opción primaria para la obtención del material que utilizaríamos para el ATAC-seq, sin embargo, su implementación en tejido adiposo blanco se tornó complicada, obteniendo muy pobres resultados tras la aplicación del protocolo original así como de múltiples modificaciones posteriores a los métodos de disgregación tisular. Paralelamente, el método de aislamiento nuclear estandarizado por el grupo de trabajo de Van Hauwaert¹²⁹, protocolo específicamente diseñado para su empleo en WAT inguinal, se implementó resultando en un incremento considerable de eficiencia respecto al protocolo de extracción mediante gradiente de iodixanol sin embargo se mostraba poca reproducibilidad, variando ampliamente los resultados obtenidos en el aislamiento nuclear, variaciones que se incrementaban al momento de trabajar con tejido adiposo proveniente de ratones obesos. Si bien no se cuentan con antecedentes de la extracción de núcleos en tejido adiposo de ratones obesos, se tiene el conocimiento de que la composición del microambiente del tejido obeso de individuos obesos cambia respecto al tejido adiposo de individuos sanos, caracterizándose el incremento en componentes de la matriz extracelular como Colágeno VI y la generación de fibrosis, esto aunado al cambio en el perfil de células que componen este tejido^{130,131}, lo que directamente afecta la eficiencia de los métodos de aislamiento de núcleos en WAT.

Las modificaciones posteriores, las cuales consistieron en cambios en los métodos de disgregación y homogeneización del tejido, muestran mejoras sustanciales mostrándose un aumento en el número de núcleos obtenidos (Figura 19) así como resultados replicables en tejido proveniente de modelos sanos y modelos obesos. Protocolos similares han sido utilizados para el aislamiento de núcleos de WAT epididimal¹³² con el objetivo de su uso en experimentos de *single cell RNA seq*, demostrando la eficacia y potencial de esta técnica de extracción nuclear.

Respecto al ATACseq, los factores a tomar en cuenta para asegurar una buena calidad en la construcción de la librería de accesibilidad se componen principalmente de la a) longitud de los fragmentos físicos que resultan tras la reacción de transposición, de b) la complejidad de la librería y de c) el enriquecimiento de las inserción de la transposasa en regiones donde se tiene claridad de la accesibilidad a la cromatina, como lo pueden ser los sitios de inicio de la transcripción (TSS) debido al antecedente de que los promotores son regiones constitutivamente enriquecidas en la cromatina accesible¹³³; siendo esta ultima el factor indispensable para asegurar la correcta preparación de los protocolos de ATACseq¹³⁴.

Respecto a la longitud de fragmentos idónea, se utilizó un sistema de microelectroforesis para conocer la composición física de la librería, generándose un patrón con picos correspondientes a la periodicidad nucleosomal, lo cual no se observa en las librerías correspondientes a las librerías de ATAC provenientes de WAT de ratones obesos, sin embargo, cuando estos datos son procesados y alineados a un genoma de referencia, patrones en la longitud de las secuencias alineadas se pueden observar similares a los obtenidos en datos publicados como es el caso del Atlas de tejidos de ratón generados por Liu C, et al. 2019¹³⁵

En lo referente al el control de calidad de las librerías de accesibilidad, según criterios del proyecto ENCODE (*Encyclopedia of DNA Elements*), un score superior a 7 referente al enriquecimiento de picos en sitios abiertos de la cromatina, específicamente para librerías provenientes de células de ratón¹³⁶ indica una buena calidad en la preparación de la librería de accesibilidad, esto partiendo de datos con una profundidad de secuenciación de 25 millones de lecturas, utilizando 50,000 núcleos para la reacción de transposición. Las librerías pertenecientes tanto al ATAC control como a los grupos HF pertenecientes al ZT 4, tienen un score menor al optimo lo que se podría deber a la profundidad de la secuenciación de nuestras librerías, al método utilizado para su análisis o a la calidad del material de partida. Estudios comparativos entre el método utilizado para el control de calidad, basado en el empleado por Lu R, et al. 2021¹³⁷ y el pipeline sugerido por el

programa ENCODE para el procesamiento de dato de ATAC podría dar un mejor indicio de la calidad de las librerías¹³⁸.

Respecto a la complejidad de la librería, uno de estándares ampliamente utilizados es el NRF (*Non-reductand Fragments*) el cual determina fragmentos mapeados al genoma en solo una ocasión sobre el número total de lecturas (Tabla 5, Mapeados solo una vez). Este estándar tiene un valor de mínimo 70% para librerías aceptables, lo que cumplen las librerías del ATAC_piloto, así como las librerías correspondientes al grupo HF_4 y la librería HF16_1, sin embargo, las librerías HF16_2 y HF163 no cumplen con estos criterios, lo cual podría deberse al bajo porcentaje de lecturas pareadas al genoma nuclear, empero, este criterio no es determinante para el descarte de las librerías según referencias antes descritas.

La elección de la profundidad de secuenciación, teniendo nuestras librerías alrededor de 15 millones de lecturas útiles, se tomó debido a que se ha reportado este valor como suficiente para llevar a cabo los análisis de calidad, sin embargo, una secuenciación mayor es necesaria para obtener realizar el análisis de *footprinting*, lo que indicaría el posicionamiento de factores de transcripción en los sitios abiertos de la cromatina o de posicionamiento nucleosomal, dejando abierta la posibilidad de encontrar mucha mayor información en estas librerías. Lo anterior expuesto indica que secuenciar a baja profundidad fue una buena elección para estudiar la calidad de nuestras librerías de accesibilidad.

Uno de los parámetros ampliamente estudiados y aceptados para la ubicación de *enhancers* son las marcas de histonas asociada a la mono-metilación de la H3K4 y la acetilación de la H3K27¹³⁹ mismas marcas que también se han asociado a sitios de transcripción activa. Comparando nuestros *tracks* de accesibilidad con datos de CHIP-seq previamente publicados de la marca de histonas H3K27ac en WAT de ratones normocalóricos¹⁴⁰ y ratones alimentados con una dieta obesogénica ¹⁴¹ así como la marca H3K4me1 en WAT de ratones normocalóricos ¹⁴², se observa que en efecto existe una correlación entre los picos de accesibilidad de nuestras librerías de ATACseq y las marcas

de histonas antes mencionadas así como se muestra en uno de los *enhancers* rio abajo del sitio de inicio de transcripción descritos para el gen *Arntl* (Figura 38 A), gen cuya transcripción comienza cerca del ZT16 y encuentra un pico al ZT0¹⁴³

En el gen circadiano *Rora*, el cual previamente se ha descrito tiene un pico de transcripción que oscila entre el ZT8 al ZT12 dependiente del tejido¹⁴³ muestra picos de accesibilidad más marcados en las librerías de accesibilidad correspondientes al ZT4 (Figura 38 B, caja amarilla) en un sitio intrónico cercano a un *enhancer* que se encuentra regulado a la alza en ratones HF (Figura 38 B, caja naranja).

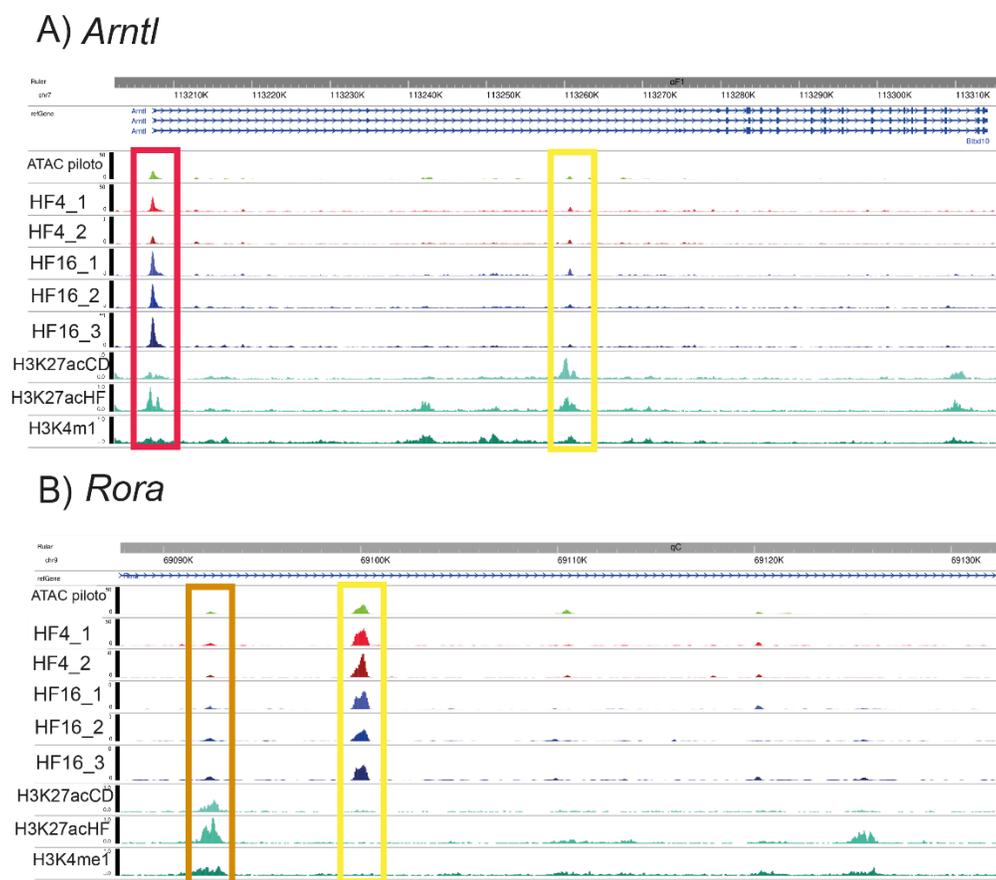


Figura 38. Datos de ATAC-seq y ChIP-seq en genes del reloj circadiano en WAT. Visualización en WashU Epigenome Browser de la intensidad de señal de las regiones accesibles de la cromatina y para las marcas de histonas H3K27ac de ratones normocalóricos y bajo dieta obesogénica y la marca H3K4me1 para los genes codificantes para elementos del reloj molecular: A) *Arntl* y B) *Rora*

Si bien existe un enriquecimiento en los sitios de inicio de la transcripción para todos los genes visualizados, no ocurre lo mismo con los picos de accesibilidad que se asocian a *enhancers*, sin embargo, para comprobar esto y determinar si es un efecto generado al momento de la realización de las librerías de accesibilidad o un efecto biológico generado por la dieta alta en grasas en ese punto temporal se necesita realizar estudios de anotación de la ubicación de *enhancers* y de la amplitud de los picos de accesibilidad asociados a estos.

Por los resultados obtenidos se concluye el avance en la generación de herramientas para el estudio de la accesibilidad en tejido adiposo blanco y se abre la posibilidad para el mejoramiento de la aplicación de la técnica de *ATACseq* así como de optimizaciones en el análisis de los datos generados.

El presente trabajo sienta las bases para múltiples estudios. En una primera instancia, el obtener librerías de *ATAC-seq* de los tejidos adiposos de los distintos grupos de estudio en distintos puntos temporales se vuelve una prioridad ya que con esto se tendrían datos de accesibilidad diferencial provocados por la dieta, los motivos de DNA enriquecidos en estas zonas accesibles, así como la posibilidad de descifrar los elementos que se encuentran generando los cambios en la accesibilidad y la construcción de redes regulatorias mediante *footprinting*.

Datos de transcriptómica de los tejidos adiposos en los mismos ZTs para transcritos nacientes darían indicios de los cambios en vías metabólicas y redes génicas ocasionados por los distintos regímenes alimenticios, y cuya integración con datos generados por *ATACseq* para verificar si los TF encontrados se expresan diferencialmente y su papel y estudiar la relación en los cambios entre la estructura de la cromatina y cambios en los patrones de expresión génica, lo que se podría complementar con estudios de orden fisiológico y de composición del tejido adiposo de nuestros distintos grupos de estudio, tal y como lo reportan Xhang et al. 2018. en un estudio donde se rastrea la distribución del tejido adiposo y la utilización de metabolitos³⁸ ya que se ha demostrado que estos depósitos cuentan con distintas funciones metabólicas, así como de liberación diferencial

de adipocinas ¹⁴⁴ complementaria a opciones de estudio en el remodelamiento de metabolitos provocados por los distintos regímenes alimenticios, en distintos puntos temporales.

12. Conclusiones

-Un paradigma de alimentación obesogénica con restricción temporal de acceso al alimento a 6 horas durante la fase activa, mantenido constantemente durante 12 semanas protege en contra del aumento de peso y mejora el estado metabólico de los modelos murinos respecto a una alimentación obesogénica *ad libitum*.

-El aislamiento de núcleos y la estandarización de un protocolo para su realización resulta fundamental para aplicar técnicas moleculares en el tejido adiposo blanco de ratones sanos y ratones obesos.

-La accesibilidad a la cromatina de tejido adiposo blanco proveniente de ratones alimentados con una dieta obesogénica *ad libitum* muestra diferencias en la amplitud de los picos en dos puntos temporales distintos.

13. Bibliográfia

1. Dunlap, J. C. Molecular Bases for Circadian Clocks. *Cell* **96**, 271–290 (1999).
2. Xu, S., Akioma, M. & Yuan, Z. Relationship between circadian rhythm and brain cognitive functions. *Frontiers of Optoelectronics* **14**, 278–287 (2021).
3. Smolensky, M. H., Hermida, R. C. & Portaluppi, F. Circadian mechanisms of 24-hour blood pressure regulation and patterning. *Sleep Med Rev* **33**, 4–16 (2017).
4. Tsang, A. H., Barclay, J. L. & Oster, H. Interactions between endocrine and circadian systems. *J Mol Endocrinol* **52**, R1–R16 (2014).
5. Marcheiva, B. *et al.* Circadian Clocks and Metabolism. in 127–155 (2013). doi:10.1007/978-3-642-25950-0_6.
6. Patke, A., Young, M. W. & Axelrod, S. Molecular mechanisms and physiological importance of circadian rhythms. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**, 67–84 (2020).
7. Kinouchi, K., Mikami, Y., Kanai, T. & Itoh, H. Circadian rhythms in the tissue-specificity from metabolism to immunity: insights from omics studies. *Mol Aspects Med* **80**, (2021).
8. Golombek, D. A. & Rosenstein, R. E. Physiology of circadian entrainment. *Physiol Rev* **90**, 1063–1102 (2010).
9. Wright, K. P. *et al.* Entrainment of the human circadian clock to the natural light-dark cycle. *Current Biology* **23**, 1554–1558 (2013).
10. Stephan, F. K. The ‘Other’ Circadian System: Food as a Zeitgeber. *J Biol Rhythms* **17**, 284–292 (2002).
11. Sahar, S. & Sassone-Corsi, P. The Epigenetic Language of Circadian Clocks. in (2013). doi:10.1007/978-3-642-25950-0_2.
12. Welsh, D. K., Takahashi, J. S. & Kay, S. A. Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annu Rev Physiol* **72**, (2010).
13. Rosenwasser, A. M. & Turek, F. W. Neurobiology of Circadian Rhythm Regulation. *Sleep Med Clin* **10**, (2015).
14. Pickard, G. E. & Sollars, P. J. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **162**, 59–90 (2012).
15. Hastings, M. H., Maywood, E. S. & Brancaccio, M. Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Nat Rev Neurosci* **19**, (2018).
16. LeGates, T. A., Fernandez, D. C. & Hattar, S. Light as a central modulator of circadian rhythms, sleep and affect. *Nat Rev Neurosci* **15**, (2014).

17. Herzog, E. D., Aton, S. J., Numano, R., Sakaki, Y. & Tei, H. Temporal precision in the mammalian circadian system: a reliable clock from less reliable neurons. *J Biol Rhythms* **19**, 35–46 (2004).
18. Mohawk, J. A., Green, C. B. & Takahashi, J. S. Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annu Rev Neurosci* **35**, (2012).
19. Ralph, M. R., Foster, R. G., Davis, F. C. & Menaker, M. Transplanted Suprachiasmatic Nucleus Determines Circadian Period. *Science (1979)* **247**, 975–978 (1990).
20. Balsalobre, A., Damiola, F. & Schibler, U. A Serum Shock Induces Circadian Gene Expression in Mammalian Tissue Culture Cells. *Cell* **93**, (1998).
21. Balsalobre, A., Damiola, F. & Schibler, U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* **93**, 929–937 (1998).
22. Yoo, S. H. *et al.* PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 5339–5346 (2004).
23. Yamazaki, S. *et al.* Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* **288**, 682–685 (2000).
24. Albrecht, U. & Eichele, G. The mammalian circadian clock. *Curr Opin Genet Dev* **13**, (2003).
25. Gekakis, N. *et al.* Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* **280**, (1998).
26. Reppert, S. M. & Weaver, D. R. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* **418**, (2002).
27. Lee, C., Etchegaray, J. P., Cagampang, F. R., Loudon, A. S. & Reppert, S. M. Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell* **107**, (2001).
28. Takahashi, J. S. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nat Rev Genet* **18**, (2017).
29. Duez, H. & Staels, B. Nuclear receptors linking circadian rhythms and cardiometabolic control. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**, (2010).
30. Papazyan, R., Zhang, Y. & Lazar, M. A. Genetic and epigenomic mechanisms of mammalian circadian transcription. *Nat Struct Mol Biol* **23**, (2016).
31. Ueda, H. R. *et al.* System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nat Genet* **37**, (2005).
32. Marcheva, B. *et al.* Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature* **466**, 627–631 (2010).
33. Cho, H. *et al.* Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB- α and REV-ERB- β . *Nature* **485**, (2012).

34. Karatsoreos, I. N., Bhagat, S., Bloss, E. B., Morrison, J. H. & McEwen, B. S. Disruption of circadian clocks has ramifications for metabolism, brain, and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 1657–1662 (2011).
35. Gimble, J. M., Sutton, G. M., Ptitsyn, A. A., Floyd, Z. E. & Bunnell, B. A. Circadian rhythms in adipose tissue. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **14**, (2011).
36. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet* **387**, (2016).
37. Williams, E. P., Mesidor, M., Winters, K., Dubbert, P. M. & Wyatt, S. B. Overweight and Obesity: Prevalence, Consequences, and Causes of a Growing Public Health Problem. *Curr Obes Rep* **4**, (2015).
38. Zhang, F. *et al.* An Adipose Tissue Atlas: An Image-Guided Identification of Human-like BAT and Beige Depots in Rodents. *Cell Metab* **27**, (2018).
39. Oelkrug, R., Polymeropoulos, E. T. & Jastroch, M. Brown adipose tissue: physiological function and evolutionary significance. *J Comp Physiol B* **185**, 587–606 (2015).
40. Lee, P., Greenfield, J. R., Ho, K. K. Y. & Fulham, M. J. A critical appraisal of the prevalence and metabolic significance of brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **299**, 601–606 (2010).
41. Brendle, C. *et al.* Correlation of Brown Adipose Tissue with Other Body Fat Compartments and Patient Characteristics: A Retrospective Analysis in a Large Patient Cohort Using PET/CT. *Acad Radiol* **25**, 102–110 (2018).
42. Emont, M. P. *et al.* A single-cell atlas of human and mouse white adipose tissue. *Nature* **2022 603:7903** **603**, 926–933 (2022).
43. Scheja, L. & Heeren, J. The endocrine function of adipose tissues in health and cardiometabolic disease. *Nat Rev Endocrinol* **15**, (2019).
44. Wensveen, F. M., Valentić, S., Šestan, M., Turk Wensveen, T. & Polić, B. Interactions between adipose tissue and the immune system in health and malnutrition. *Semin Immunol* **27**, (2015).
45. Arner, P. Catecholamine-induced lipolysis in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* **23 Suppl 1**, 10–13 (1999).
46. Horowitz, J. F. & Klein, S. Whole body and abdominal lipolytic sensitivity to epinephrine is suppressed in upper body obese women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **278**, (2000).
47. Lowell, B. B. & Bachman, E. S. Beta-Adrenergic receptors, diet-induced thermogenesis, and obesity. *J Biol Chem* **278**, 29385–29388 (2003).
48. Grundy, S. M. Adipose tissue and metabolic syndrome: too much, too little or neither. *Eur J Clin Invest* **45**, 1209–1217 (2015).

49. Zhang, Y. *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425–432 (1994).
50. Scherer, P. E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G. & Lodish, H. F. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 26746–26749 (1995).
51. Narayana, S. V. L. *et al.* Structure of Human Factor D: Complement System Protein at 2.0 Å Resolution. *J Mol Biol* **235**, 695–708 (1994).
52. Blomberg, R., Beiting, D. P., Wabitsch, M. & Puré, E. Fibroblast activation protein restrains adipogenic differentiation and regulates matrix-mediated mTOR signaling. *Matrix Biol* **83**, 60–76 (2019).
53. Wang, G. X. *et al.* The brown fat-enriched secreted factor Nrg4 preserves metabolic homeostasis through attenuation of hepatic lipogenesis. *Nature Medicine* **20**, 1436–1443 (2014).
54. Grolla, A. A., Travelli, C., Genazzani, A. A. & Sethi, J. K. Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase, a new cancer metabokine. *Br J Pharmacol* **173**, 2182 (2016).
55. Steppan, C. M. *et al.* The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* **409**, 307–312 (2001).
56. Weiner, J., Zieger, K., Pippel, J. & Heiker, J. T. Molecular Mechanisms of Vaspin Action – From Adipose Tissue to Skin and Bone, from Blood Vessels to the Brain. *Adv Exp Med Biol* **1111**, 159–188 (2019).
57. Goralski, K. B. *et al.* Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *J Biol Chem* **282**, 28175–28188 (2007).
58. Yan, Q. W. *et al.* The adipokine lipocalin 2 is regulated by obesity and promotes insulin resistance. *Diabetes* **56**, 2533–2540 (2007).
59. Fischer-Posovszky, P., Wang, Q. A., Asterholm, I. W., Rutkowski, J. M. & Scherer, P. E. Targeted Deletion of Adipocytes by Apoptosis Leads to Adipose Tissue Recruitment of Alternatively Activated M2 Macrophages. *Endocrinology* **152**, 3074–3081 (2011).
60. Chait, A. & den Hartigh, L. J. Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. *Front Cardiovasc Med* **7**, (2020).
61. Weisberg, S. P. *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation* **112**, 1796 (2003).
62. Fuentes, L., Rószter, T. & Ricote, M. Inflammatory Mediators and Insulin Resistance in Obesity: Role of Nuclear Receptor Signaling in Macrophages. *Mediators Inflamm* **2010**, 1–10 (2010).

63. Strissel, K. J. *et al.* Adipocyte Death, Adipose Tissue Remodeling, and Obesity Complications. *Diabetes* **56**, 2910–2918 (2007).
64. Li, Q., Hata, A., Kosugi, C., Kataoka, N. & Funaki, M. The density of extracellular matrix proteins regulates inflammation and insulin signaling in adipocytes. *FEBS Lett* **584**, 4145–4150 (2010).
65. Lee, Y. S. *et al.* Increased adipocyte O₂ consumption triggers HIF-1 α , causing inflammation and insulin resistance in obesity. *Cell* **157**, 1339–1352 (2014).
66. James, D. E., Stöckli, J. & Birnbaum, M. J. The aetiology and molecular landscape of insulin resistance. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2021 22:11 22**, 751–771 (2021).
67. Arkan, M. C. *et al.* IKK- β links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nature Medicine* **2005 11:2 11**, 191–198 (2005).
68. Shi, H. *et al.* TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* **116**, 3015–3025 (2006).
69. Pagano, E. S., Spinedi, E. & Gagliardino, J. J. White Adipose Tissue and Circadian Rhythm Dysfunctions in Obesity: Pathogenesis and Available Therapies. *Neuroendocrinology* **104**, 347–363 (2017).
70. Kusminski, C. M., Bickel, P. E. & Scherer, P. E. Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. *Nature Reviews Drug Discovery* **2016 15:9 15**, 639–660 (2016).
71. Rutkowski, J. M., Stern, J. H. & Scherer, P. E. The cell biology of fat expansion. *Journal of Cell Biology* **208**, 501–512 (2015).
72. Hruby, A. & Hu, F. B. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics* **33**, (2015).
73. Bray, G. A., Frühbeck, G., Ryan, D. H. & Wilding, J. P. H. Management of obesity. *Lancet* **387**, (2016).
74. Wu, T., Gao, X., Chen, M. & van Dam, R. M. Long-term effectiveness of diet-plus-exercise interventions vs. diet-only interventions for weight loss: a meta-analysis. *Obes Rev* **10**, (2009).
75. Mindikoglu, A. L., Opekun, A. R., Gagan, S. K. & Devaraj, S. Impact of Time-Restricted Feeding and Dawn-to-Sunset Fasting on Circadian Rhythm, Obesity, Metabolic Syndrome, and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterol Res Pract* **2017**, 1–13 (2017).
76. Longo, V. D. & Panda, S. Fasting, Circadian Rhythms, and Time-Restricted Feeding in Healthy Lifespan. *Cell Metab* **23**, (2016).
77. Rothschild, J., Hoddy, K. K., Jambazian, P. & Varady, K. A. Time-restricted feeding and risk of metabolic disease: a review of human and animal studies. *Nutr Rev* **72**, (2014).

78. Patterson, R. E. & Sears, D. D. Metabolic Effects of Intermittent Fasting. *Annu Rev Nutr* **37**, (2017).
79. Sutton, E. F. *et al.* Early Time-Restricted Feeding Improves Insulin Sensitivity, Blood Pressure, and Oxidative Stress Even without Weight Loss in Men with Prediabetes. *Cell Metab* **27**, (2018).
80. Brandhorst, S. *et al.* A Periodic Diet that Mimics Fasting Promotes Multi-System Regeneration, Enhanced Cognitive Performance, and Healthspan. *Cell Metab* **22**, (2015).
81. Hatori, M. *et al.* Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. *Cell Metab* **15**, (2012).
82. Regmi, P. & Heilbronn, L. K. Time-Restricted Eating: Benefits, Mechanisms, and Challenges in Translation. *iScience* **23**, (2020).
83. Zhang, R., Lahens, N. F., Ballance, H. I., Hughes, M. E. & Hogenesch, J. B. A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, (2014).
84. Qu, M., Duffy, T., Hirota, T. & Kay, S. A. Nuclear receptor HNF4A transrepresses CLOCK:BMAL1 and modulates tissue-specific circadian networks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, (2018).
85. Zhang, R., Lahens, N. F., Ballance, H. I., Hughes, M. E. & Hogenesch, J. B. A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 16219–16224 (2014).
86. Dyar, K. A. *et al.* Atlas of Circadian Metabolism Reveals System-wide Coordination and Communication between Clocks. *Cell* **174**, 1571-1585.e11 (2018).
87. Shostak, A., Husse, J. & Oster, H. Circadian regulation of adipose function. *Adipocyte* **2**, 201 (2013).
88. Delezie, J. *et al.* The nuclear receptor REV-ERB α is required for the daily balance of carbohydrate and lipid metabolism. *The FASEB Journal* **26**, 3321–3335 (2012).
89. Challet, E. The circadian regulation of food intake. *Nat Rev Endocrinol* **15**, 393–405 (2019).
90. Strubbe, J. H. & van Dijk, G. The temporal organization of ingestive behaviour and its interaction with regulation of energy balance. *Neurosci Biobehav Rev* **26**, 485–498 (2002).
91. Silver, R., Balsam, P. D., Butler, M. P. & LeSauter, J. Food anticipation depends on oscillators and memories in both body and brain. *Physiol Behav* **104**, 562–571 (2011).
92. Lewis, P., Oster, H., Korf, H. W., Foster, R. G. & Erren, T. C. Food as a circadian time cue — evidence from human studies. *Nature Reviews Endocrinology* **2020 16:4 16**, 213–223 (2020).

93. Damiola, F. *et al.* Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev* **14**, (2000).
94. Chaix, A., Lin, T., Le, H. D., Chang, M. W. & Panda, S. Time-Restricted Feeding Prevents Obesity and Metabolic Syndrome in Mice Lacking a Circadian Clock. *Cell Metab* **29**, (2019).
95. Eckel-Mahan, K. L. *et al.* Reprogramming of the circadian clock by nutritional challenge. *Cell* **155**, (2013).
96. Guan, D. *et al.* Diet-Induced Circadian Enhancer Remodeling Synchronizes Opposing Hepatic Lipid Metabolic Processes. *Cell* **174**, (2018).
97. Olins, D. E. & Olins, A. L. Chromatin history: our view from the bridge. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2003 4:10 **4**, 809–814 (2003).
98. McGinty, R. K. & Tan, S. Nucleosome structure and function. *Chem Rev* **115**, 2255–2273 (2015).
99. Klemm, S. L., Shipony, Z. & Greenleaf, W. J. Chromatin accessibility and the regulatory epigenome. *Nature Reviews Genetics* 2018 20:4 **20**, 207–220 (2019).
100. Thurman, R. E. *et al.* The accessible chromatin landscape of the human genome. *Nature* 2012 489:7414 **489**, 75–82 (2012).
101. Tamaru, H. Confining euchromatin/heterochromatin territory: jumonji crosses the line. *Genes Dev* **24**, 1465 (2010).
102. Doi, M., Hirayama, J. & Sassone-Corsi, P. Circadian Regulator CLOCK Is a Histone Acetyltransferase. *Cell* **125**, 497–508 (2006).
103. Katada, S. & Sassone-Corsi, P. The histone methyltransferase MLL1 permits the oscillation of circadian gene expression. *Nature Structural & Molecular Biology* 2010 17:12 **17**, 1414–1421 (2010).
104. Pacheco-Bernal, I., Becerril-Pérez, F. & Aguilar-Arnal, L. Circadian rhythms in the three-dimensional genome: implications of chromatin interactions for cyclic transcription. *Clin Epigenetics* **11**, (2019).
105. Multhaup, M. L. *et al.* Mouse-human experimental epigenetic analysis unmasks dietary targets and genetic liability for diabetic phenotypes. *Cell Metab* **21**, 138–149 (2015).
106. Leung, A., Trac, C., Du, J., Natarajan, R. & Schones, D. E. Persistent Chromatin Modifications Induced by High Fat Diet. *J Biol Chem* **291**, 10446 (2016).
107. Hu, R. D. *et al.* Chromatin accessibility analysis identifies the transcription factor ETV5 as a suppressor of adipose tissue macrophage activation in obesity. *Cell Death & Disease* 2021 12:11 **12**, 1–11 (2021).

108. Nair, V. D. *et al.* Differential analysis of chromatin accessibility and gene expression profiles identifies cis-regulatory elements in rat adipose and muscle. *Genomics* **113**, 3827–3841 (2021).
109. Langmead, B. & Salzberg, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* **9**, 357 (2012).
110. Ramírez, F., Dündar, F., Diehl, S., Grüning, B. A. & Manke, T. deepTools: a flexible platform for exploring deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* **42**, W187–W191 (2014).
111. Corces, M. R. *et al.* An improved ATAC-seq protocol reduces background and enables interrogation of frozen tissues. *Nat Methods* **14**, (2017).
112. Benitez, G. J. & Shinoda, K. Isolation of Adipose Tissue Nuclei for Single-Cell Genomic Applications. *J Vis Exp* (2020) doi:10.3791/61230.
113. van Hauwaert, E. L. *et al.* Isolation of nuclei from mouse white adipose tissues for single-nucleus genomics. *STAR Protoc* **2**, 100612 (2021).
114. Corces, M. R. *et al.* An improved ATAC-seq protocol reduces background and enables interrogation of frozen tissues. *Nat Methods* **14**, 959–962 (2017).
115. Williams, E. P., Mesidor, M., Winters, K., Dubbert, P. M. & Wyatt, S. B. Overweight and Obesity: Prevalence, Consequences, and Causes of a Growing Public Health Problem. *Curr Obes Rep* **4**, 363–370 (2015).
116. Montgomery, M. K. *et al.* Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding. *Diabetologia* **56**, 1129–1139 (2013).
117. Hatori, M. *et al.* Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. *Cell Metab* **15**, 848–860 (2012).
118. Rodríguez-Correa, E., González-Pérez, I., Clavel-Pérez, P. I., Contreras-Vargas, Y. & Carvajal, K. Biochemical and nutritional overview of diet-induced metabolic syndrome models in rats: what is the best choice? *Nutrition & Diabetes* **2020 10:1** **10**, 1–15 (2020).
119. Sundaram, S. & Yan, L. Time-restricted feeding reduces adiposity in mice fed a high-fat diet. *Nutrition Research* **36**, 603–611 (2016).
120. Stote, K. S. *et al.* A controlled trial of reduced meal frequency without caloric restriction in healthy, normal-weight, middle-aged adults. *Am J Clin Nutr* **85**, 981–988 (2007).
121. Carlson, O. *et al.* Impact of reduced meal frequency without caloric restriction on glucose regulation in healthy, normal-weight middle-aged men and women. *Metabolism* **56**, 1729–1734 (2007).
122. Chaix, A., Zarrinpar, A., Miu, P. & Panda, S. Time-Restricted Feeding Is a Preventative and Therapeutic Intervention against Diverse Nutritional Challenges. *Cell Metab* **20**, 991–1005 (2014).

123. Martins, T. *et al.* Murine Models of Obesity. *Obesities 2022, Vol. 2, Pages 127-147* **2**, 127–147 (2022).
124. Efeyan, A., Comb, W. C. & Sabatini, D. M. Nutrient-sensing mechanisms and pathways. *Nature* **517**, 302–310 (2015).
125. Manoogian, E. N. C. & Panda, S. Circadian rhythms, time-restricted feeding, and healthy aging. *Ageing Res Rev* **39**, 59–67 (2017).
126. Zhang, H. *et al.* Profiling chromatin accessibility in formalin-fixed paraffin-embedded samples. *Genome Res* **32**, 150–161 (2022).
127. Minnoye, L. *et al.* Chromatin accessibility profiling methods. *Nature Reviews Methods Primers* **1**, 10 (2021).
128. Graham, J. M. Rapid purification of nuclei from animal and plant tissues and cultured cells. *ScientificWorldJournal* **2**, 1551–1554 (2002).
129. van Hauwaert, E. L. *et al.* Isolation of nuclei from mouse white adipose tissues for single-nucleus genomics. *STAR Protoc* **2**, (2021).
130. Martyniak, K. & Masternak, M. M. Changes in Adipose Tissue Cellular Composition During Obesity and Aging as a Cause of Metabolic Dysregulation. *Exp Gerontol* **94**, 59 (2017).
131. Fuster, J. J., Ouchi, N., Gokce, N. & Walsh, K. Obesity-induced changes in adipose tissue microenvironment and their impact on cardiovascular disease. *Circ Res* **118**, 1786–1807 (2016).
132. Sárvári, A. K. *et al.* Plasticity of Epididymal Adipose Tissue in Response to Diet-Induced Obesity at Single-Nucleus Resolution. *Cell Metab* **33**, 437-453.e5 (2021).
133. Buenrostro, J. D., Giresi, P. G., Zaba, L. C., Chang, H. Y. & Greenleaf, W. J. Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nature Methods* **10**, 1213–1218 (2013).
134. Grandi, F. C., Modi, H., Kampman, L. & Corces, M. R. Chromatin accessibility profiling by ATAC-seq. doi:10.1038/s41596-022-00692-9.
135. Liu, C. *et al.* An ATAC-seq atlas of chromatin accessibility in mouse tissues. *Scientific Data* **6**, 1–10 (2019).
136. ATAC-seq Data Standards and Processing Pipeline – ENCODE. <https://www.encodeproject.org/atac-seq/>.
137. Lu, R. J. H. *et al.* ATACgraph: Profiling Genome-Wide Chromatin Accessibility From ATAC-seq. *Front Genet* **11**, (2021).
138. Grandi, F. C., Modi, H., Kampman, L. & Corces, M. R. Chromatin accessibility profiling by ATAC-seq. *Nat Protoc* **17**, 1518–1552 (2022).

139. Zentner, G. E. & Scacheri, P. C. The Chromatin Fingerprint of Gene Enhancer Elements. *J Biol Chem* **287**, 30888 (2012).
140. GSM1561376: H3K27ac ChIP-seq, Epididymal white adipose tissue; Mus mu... - SRA - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/?term=SRX800009>.
141. GSM4634566: adipocyte HFD H3K27ac ChIP rep 1; Mus musculus; ChIP-Seq - SRA - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/?term=SRX8605836>.
142. GSM2221579: H3K4me1 ChIP-seq, Epididymal white adipose tissue; Mus mu... - SRA - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/?term=SRX1890262>.
143. Akashi, M. & Takumi, T. The orphan nuclear receptor ROR α regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. *Nature Structural & Molecular Biology* **2005 12:5 12**, 441–448 (2005).
144. Balistreri, C. R., Caruso, C. & Candore, G. The Role of Adipose Tissue and Adipokines in Obesity-Related Inflammatory Diseases. *Mediators Inflamm* **2010**, (2010).

14. Apéndices

14.1. Composición de las dietas

2018



Teklad Global 18% Protein Rodent Diet

Product Description- 2018 is a fixed formula, non-autoclavable diet manufactured with high quality ingredients and designed to support gestation, lactation, and growth of rodents. 2018 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. **Also available certified (2018C) and irradiated (2918). For autoclavable diet, refer to 2018S (Sterilizable) or 2018SX (Extruded & Sterilizable).**

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	%	0.4
Cystine	%	0.3
Lysine	%	0.9
Histidine	%	0.4
Arginine	%	1.0
Tryptophan	%	0.2

Teklad Diets are designed and manufactured for research purposes only.



© 2015 Envigo

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, magnesium oxide, vitamin E acetate, menadione sodium bisulfite complex (source of vitamin K activity), manganous oxide, ferrous sulfate, zinc oxide, niacin, calcium pantothenate, copper sulfate, pyridoxine hydrochloride, riboflavin, thiamin mononitrate, vitamin A acetate, calcium iodate, vitamin B₁₂ supplement, folic acid, biotin, vitamin D₃ supplement, cobalt carbonate.

Standard Product Form: **Pellet**

Vitamins		
Vitamin A ^{e,1}	IU/g	15.0
Vitamin D ₃ ^{e,9}	IU/g	1.5
Vitamin E	IU/kg	110
Vitamin K ₃ (menadione)	mg/kg	50
Vitamin B ₁ (thiamin)	mg/kg	17
Vitamin B ₂ (riboflavin)	mg/kg	15
Niacin (nicotinic acid)	mg/kg	70
Vitamin B ₆ (pyridoxine)	mg/kg	18
Pantothenic Acid	mg/kg	33
Vitamin B ₁₂ (cyanocobalamin)	mg/kg	0.08
Biotin	mg/kg	0.40
Folate	mg/kg	4
Choline	mg/kg	1200
Fatty Acids		
C16:0 Palmitic	%	0.7
C18:0 Stearic	%	0.2
C18:1ω9 Oleic	%	1.2
C18:2ω6 Linoleic	%	3.1
C18:3ω3 Linolenic	%	0.3
Total Saturated	%	0.9
Total Monounsaturated	%	1.3
Total Polyunsaturated	%	3.4
Other		
Cholesterol	mg/kg	--

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

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

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

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

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

¹ 1 IU vitamin A = 0.3 µg retinol

⁹ 1 IU vitamin D = 25 ng cholecalciferol

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

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

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

58Y1

DESCRIPTION

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

Intended for rodents in a laboratory setting.

CAUTION: Contains a new animal drug for investigational use only in laboratory research animals or for tests in vitro. Not for use in humans.

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

Product Forms Available* Catalog

1/2" Pellet	0058126
1/2" Pellet, Irradiated	1816507-286
1/2" Pellet, Irradiated, Stocked †	0056833
Meal	1810473
Meal, Irradiated	1810742

† Available in 10 kg increments. All other forms made to order.

*Other Forms Available On Request

INGREDIENTS (%)

Lard	31.6600
Casein - Vitamin Tested	25.8450
Maltodextrin	16.1530
Sucrose	8.8470
Powdered Cellulose	6.4610
Soybean Oil	3.2310
Potassium Citrate, Tribasic Monohydrate	2.1320
Calcium Phosphate	1.6800
DIO Mineral Mix	1.2920
AIN-76A Vitamin Mix	1.2920
Calcium Carbonate	0.7110
L-Cystine	0.3880
Choline Bitartrate	0.2580
FD&C Blue No. 1	0.0500

*See page 2 for Expanded Ingredient Listings

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

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

DIO Rodent Purified Diet w/45% Energy From Fat - Red

1/2" Pellet - Catalog # 58125 (58V8)
1/2" Pellet, Irradiated - Catalog # 55629 (58V8)
Meal - Catalog # 1810729 (58V8)
Meal, Irradiated - Catalog # 1810730 (58V8)

FEEDING DIRECTIONS

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

CAUTION:

Perishable - store properly upon receipt. For laboratory animal use only; NOT for human consumption.

6/25/2021

NUTRITIONAL PROFILE ¹

Protein, %	23.1	Minerals	
Arginine, %	0.90	Calcium, %	0.79
Histidine, %	0.67	Phosphorus, %	0.59
Isoleucine, %	1.24	Potassium, %	0.77
Leucine, %	2.24	Magnesium, %	0.07
Lysine, %	1.88	Sodium, %	0.15
Methionine, %	0.67	Chloride, %	0.25
Cystine, %	0.48	Fluorine, ppm	1.2
Phenylalanine, %	1.24	Iron, ppm	64
Tyrosine, %	1.31	Zinc, ppm	46
Threonine, %	1.00	Manganese, ppm	76
Tryptophan, %	0.29	Copper, ppm	7.8
Valine, %	1.47	Cobalt, ppm	0.0
Alanine, %	0.71	Iodine, ppm	0.27
Aspartic Acid, %	1.66	Chromium (added), ppm	2.6
Glutamic Acid, %	5.28	Molybdenum, ppm	2.11
Glycine, %	0.50	Selenium, ppm	0.29
Proline, %	3.04		
Serine, %	1.43	Vitamins	
Taurine, %	0.00	Vitamin A, IU/g	5.2
		Vitamin D-3 (added), IU/g	1.3
		Vitamin E, IU/kg	67.2
		Vitamin K, ppm	0.65
		Thiamin, ppm	6.2
		Riboflavin, ppm	8.7
		Niacin, ppm	39
		Pantothenic Acid, ppm	21
		Folic Acid, ppm	2.8
		Pyridoxine, ppm	7.5
		Biotin, ppm	0.3
		Vitamin B-12, mcg/kg	17
		Choline Chloride, ppm	1,290
		Ascorbic Acid, ppm	0.0

Fat, %	34.9
Cholesterol, ppm	301
Linoleic Acid, %	4.70
Linolenic Acid, %	0.39
Arachidonic Acid, %	0.06
Omega-3 Fatty Acids, %	0.39
Total Saturated Fatty A	13.68
Total Monounsaturated Fatty Acids, %	14.00
Polyunsaturated Fatty Acids, %	5.15

Fiber (max), %	6.5
-----------------------	------------

Carbohydrates, %	25.9
-------------------------	-------------

Energy (kcal/g) ²	5.10	
From:	kcal	%
Protein	0.924	18.1
Fat (ether extract)	3.140	61.6
Carbohydrates	1.036	20.3

1. Formulation based on calculated values from the latest ingredient analysis information. Since nutrient composition of natural ingredients varies and some nutrient loss will occur due to manufacturing processes, analysis will differ accordingly. Nutrients expressed as percent of ration on an As-Fed basis except where otherwise indicated.
2. Energy (kcal/gm) - Sum of decimal fractions of protein, fat and carbohydrate x 4,9,4 kcal/gm respectively.

NOTE: When assayed, actual levels may vary from calculated values.

TestDiet

www.testdiet.com

14.2. Oligonucleotidos ATAC-seq

Ad1_noMX:	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCGTCGGCAGCGTCAGATGTG
Ad2.1_TAAGGCGA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCGCCTTAGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
Ad2.7_CTCTCTAC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTAGAGAGGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
Ad2.8_CAGAGAGG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCCTCTCTGGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
Ad2.9_GCTACGCT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGCGTAGCGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
Ad2.10_CGAGGCTG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCAGCCTCGGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
Ad2.11_AAGAGGCA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGCCTTTGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
Ad2.12_GTAGAGGA	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCCTCTACGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
Ad2.13_GTCGTGAT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATATCACGACGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
Ad2.14_ACCACTGT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACAGTGGTGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
Ad2.15_TGGATCTG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCAGATCCAGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
Ad2.16_CCGTTTGT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACAAACGGGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT

14.3. Oligonucleótidos control de regiones abiertas

Gen	Forward	Reverse
Alb	AAACACCTTTTTCCACCTTGAGT	TCAGCACAGATCCACAGTCTT
H1h1c	ATGGCTACAAAACGCGATGC	AACACAATGCAACTGAGGGC
Tbp	GCATTATAGAAAAGGCAGTTGACAGT	TTTGGACGACGGATCACATG
p84	GCTGACAACACGAAACACCC	AGGTTGGGAGCAAAGAGACG
Chr17	AGGGAGAAAAGAATCAAAGGCTCT	TGGGTTGTGGAATGGAGGTTTA
Gata1	ACCGTGTCTCTCCCTGATG	GTCAGGAGTGCTTATCCCCAG
MyoD	AGGCTCTGGTCACCTGATC	ACAGCCAGTGTTCTCAACTCT
Oct4	CAATGGCTGTCTTGTCTGG	GTTCTTGCTTACCCACCCGT
Sox2	TCAGGGTTGGGAGTTAGAAAAGAGC	CAGGTGTGGCTCAAGGAACC
HoxA10	AGTGGATGCTTTACTTCTGACCTG	TGGGCAGTCAGTAGCTCTCT

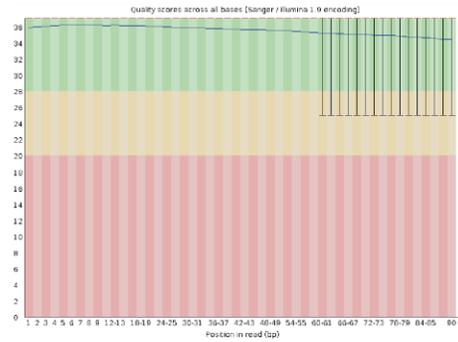
14.4. Oligonucleótidos control de regiones abiertas específicos de tejido adiposo

Gen	Forward	Reverse
AdipoQ	TATATGGGACAGGGGTCCAG	CCTGTGGTTGTCTCCACTT
InsR	CTCCGTGAGAAGGTCTCTGG	A AGCTCTGGACTCTGGGATTG
Srebf1	CACCTTCGATGTCGTTCAA	CCGGGGAACCTTTTCTTAAC
AacS	AACAGAGCAACACCCGTTAA	CTTGAGACCACGCCCTCTT
Grin2A	AGGGCTTAAACATGGGGTTC	GGAGGTTCAAACATGGAGA

14.5. Control de calidad de secuencias

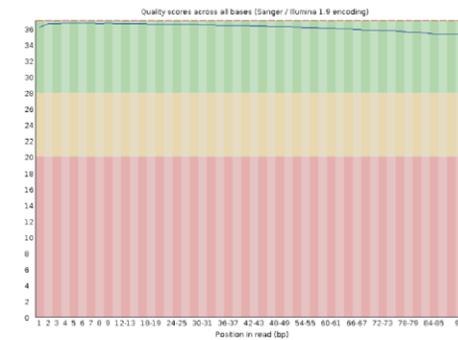
HF4_1 Lectura Pareada 1

Measure	Value
Filename	trim_HF4_1_1.fq.gz
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	16522039
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	35-90
%GC	51



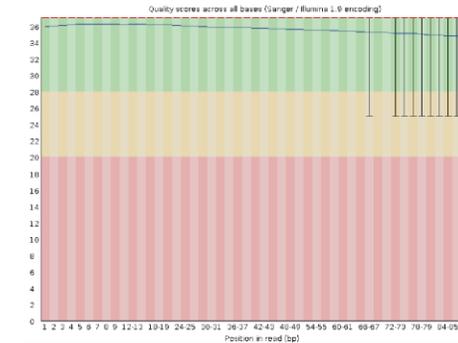
HF4_1 Lectura Pareada 2

Measure	Value
Filename	trim_HF4_1_2.fq.gz
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	16522039
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	35-90
%GC	51



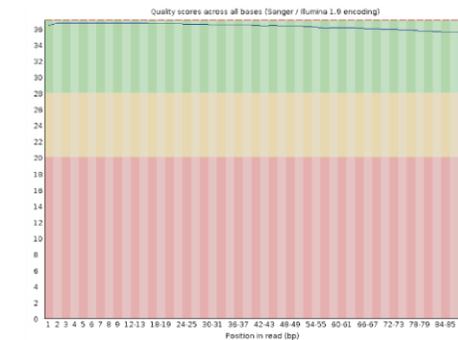
HF4_2 Lectura Pareada 1

Measure	Value
Filename	trim_HF4_2_1.fq.gz
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	14368870
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	35-90
%GC	48



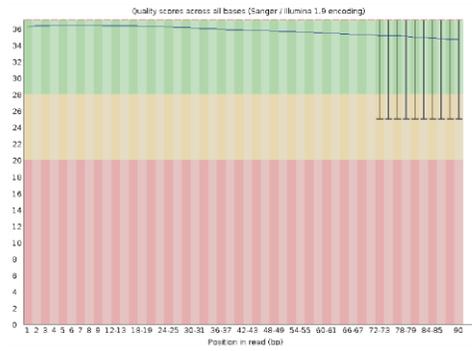
HF4_2 Lectura Pareada 2

Measure	Value
Filename	trim_HF4_2_2.fq.gz
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	14368870
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	35-90
%GC	48



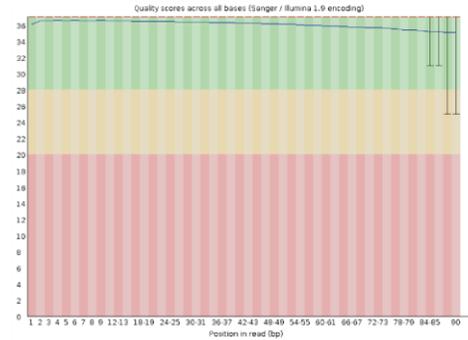
HF16_1 Lectura Pareada 1

Measure	Value
Filename	trim_HF16_1_1.fq.gz
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	15493470
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	35-90
%GC	53



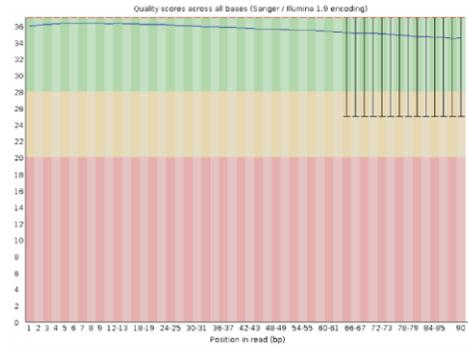
HF16_1 Lectura Pareada 2

Measure	Value
Filename	trim_HF16_1_2.fq.gz
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	15493470
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	35-90
%GC	53



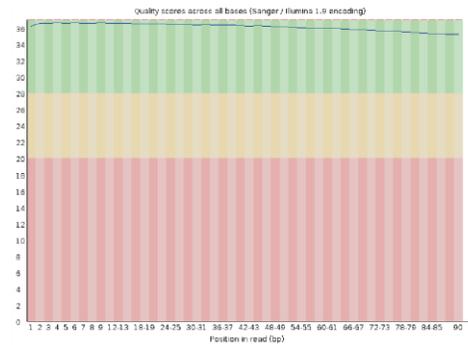
HF16_2 Lectura Pareada 1

Measure	Value
Filename	trim_HF16_2_1.fq.gz
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	17639770
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	35-90
%GC	54



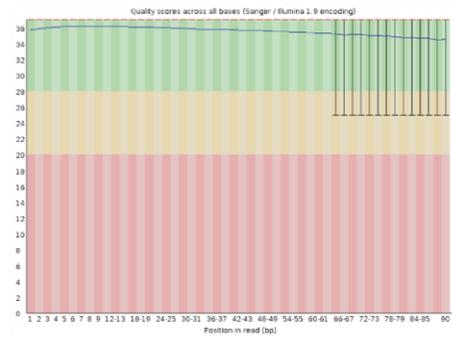
HF16_2 Lectura Pareada 2

Measure	Value
Filename	trim_HF16_2_2.fq.gz
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	17639770
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	35-90
%GC	54



HF16_3 Lectura Pareada 1

Measure	Value
Filename	trim_HF16_3_1.fq.gz
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	15547151
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	35-90
%GC	53



HF16_3 Lectura Pareada 2

Measure	Value
Filename	trim_HF16_3_2.fq.gz
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	15547151
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	35-90
%GC	53

