



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Análisis de la estructura de la cromatina de tejido adiposo blanco de ratón en un modelo de alimentación restringida en tiempo

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Biol. Luis Tenorio Hernández

TUTORA PRINCIPAL:

Dra. Mayra Furlan Magaril
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

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

Dra. Viviana del Carmen Valadez Graham
[Instituto de Biotecnología](#)

Ciudad de México. marzo, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



CGEP/PMDCBQ/694
0179D6-6424C70124A23
Asunto: Jurado de examen

TENORIO HERNÁNDEZ LUIS
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del **27 de marzo de 2023**, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Maestría en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**Análisis de la estructura de la cromatina de tejido adiposo blanco de ratón en un modelo de alimentación restringida en tiempo**", dirigida por el/la Dr(a). **FURLAN MAGARIL MAYRA**.

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

DIMITROVA DINKOVA TZVETANKA	PMDCBQ	PRESIDENTE
TOVAR Y ROMO LUIS BERNARDO	PMDCBQ	SECRETARIO
ARRIAGA CANON CRISTIAN GABRIEL OLIVERIO	PMDCBQ	VOCAL
DÍAZ VILLASEÑOR ANDREA SACHI	PMDCBQ	VOCAL
ROMERO CORDOBA SANDRA LORENA	PMDCBQ	VOCAL

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 28 de marzo de 2023

Coordinadora
Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz

Agradecimientos académicos

El presente trabajo fue realizado bajo asesoría y dirección de la Dra. Mayra Furlan Magaril, en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Agradezco ampliamente su invaluable guía, apoyo y minuciosa orientación durante cada etapa del desarrollo del presente proyecto. Admiro su compromiso con las labores científicas, la formación y enseñanzas para los estudiantes bajo su asesoramiento que hacen que cada trabajo realizado en su laboratorio se realice bajo un estricto rigor científico y constituyan aportes relevantes y novedosos para la investigación científica.

Agradezco también a la Dra. Lorena Aguilar Arnal, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, quien además de formar parte del comité tutor de mis estudios de maestría es colaboradora del proyecto y siguió muy de cerca el trabajo, todo lo relacionado a la generación y caracterización de los modelos biológicos se realizó gracias a su dirección.

Agradezco a la Dra. Viviana del Carmen Valadez Graham, en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, parte del comité tutor. Todos sus comentarios y retroalimentación respecto al proyecto resultaron en discusiones enriquecedoras para el mismo.

Quiero agradecer a la M. en C. Rosario Pérez Molina, técnica académica del laboratorio. Gracias a su entusiasta trabajo, dedicación y apoyo a los estudiantes es que todo en el laboratorio puede realizarse apropiadamente. Agradezco también a mis amigos y compañeros del laboratorio Abraham Román, Amaury Aguilar, Sherlyn Claudio, Ayerim Esquivel, Aura Stephenson, Eduardo Blanco, Andrés Penagos, Karina Jácome, Juan Manuel Tzompantzi de Ita, Juan Carlos Gómora y Franklin Cruz, ya que cada uno de ellos me han dejado importantes enseñanzas tanto dentro como fuera del laboratorio.

Agradezco a la M. en C. Marcia Bustamante Zepeda, a mi compañero del proyecto y amigo Mauricio Alberto Basulto Almeida, a la Dra. Lucía Mendoza Viveros, a la Unidad de Modelos Biológicos del IIB dirigida por el Dr. Daniel Garzón Cortés y con gran apoyo de los M.V.Z. Rubí Zavala y Filipo Paczka. El trabajo y apoyo de cada uno de ellos resultó crucial para el desarrollo del proyecto que trabajé en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Se reconoce la ayuda fundamental para la realización del proyecto de la Unidad de Bioinformática y Manejo de la Información del IFC, a cargo del Dr. César Augusto Poot, de la Unidad de Biología Molecular del IFC a cargo de la Dra. Laura Ongay Larios, del Bioterio del IFC a cargo de la M.V.Z. Claudia V. Rivera Cerecedo, y de la Red de Apoyo a la Investigación (RAI).

Agradezco al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas por permitirme continuar mi formación científica. Igualmente agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por ser beneficiario del programa de Becas Nacionales para Estudios de Posgrado 2021 con número de CVU 1101439.

El presente trabajo se realizó con financiamiento y apoyo de PAPIIT no. IN210323, a CONACyT a través de los proyectos no. 303068 y el fondo Fronteras de la Ciencia de CONACyT no. 15758.

Lista de abreviaturas

3C	Captura Conformacional de Cromosomas
<i>Arntl</i>	Aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1
AUC	Área bajo la curva, del inglés; <i>Area under the curve</i>
BMAL1	Brain and muscle ARNT-Like 1
CCGs	Genes controlados por el reloj; del inglés: Clock controlled genes
CD	Dieta control o normocalórica; del inglés: <i>Control Diet</i>
CRY1/2	Cryptochrome1/2
CTCF	CCCTC-Binding factor
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
HFD	Dieta alta en grasa; del inglés: <i>High-fat diet</i>
HiC	Captura Conformacional de Cromosomas del genoma completo
mRNA	RNA mensajero
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa; del inglés: Polymerase chain reaction
PER1/2/3	Period1/2/3
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
SCN	Núcleo supraquiasmático; del inglés: <i>Suprachiasmatic nucleus</i>
TRE	Alimentación restringida en tiempo; del inglés: Time restricted eating
TRF	Alimentación restringida en tiempo; del inglés: <i>Time restricted feeding</i>
TAD	Dominio topológicamente asociado; del inglés: <i>Topologically associating domain</i>
WAT	Tejido adiposo blanco; del inglés: <i>White Adipose Tissue</i>
ZT	<i>Zeitgeber Time</i>

Índice de Contenido

I. Resumen	1
II. Introducción	5
1. Padecimientos metabólicos, creciente incidencia.....	5
2. Plasticidad del tejido adiposo blanco en la salud y en el desarrollo de padecimientos metabólicos.....	5
3. Dieta restringida en tiempo en tratamiento y prevención de padecimientos metabólicos	7
4. Ritmos circadianos en la salud y en la enfermedad	9
4.1. Las señales nutricionales sincronizan a los relojes periféricos	10
4.2. Reloj molecular y Genes Controlados por el Reloj.....	14
4.3. Reprogramación de transcriptomas rítmicos inducida por la dieta.....	16
5. Transiciones en la cromatina en el contexto circadiano y ante señales nutricionales.....	18
5.1. Regulación epigenética, ritmicidad circadiana y metabolismo.....	18
5.2. Organización tridimensional del genoma.....	20
5.3. Oscilaciones circadianas en la topología del genoma.....	23
III. Planteamiento del problema.....	26
IV. Hipótesis	26
V. Objetivo general	26
VI. Objetivos particulares	27
VII. Metodología.....	28
1. Establecimiento y caracterización de los modelos biológicos	29
2. Preparación de bibliotecas de Hi-C	32
3. Análisis bioinformático de datos de Hi-C	38
VIII. Resultados	42
1. Distintas señales nutricionales producen estados metabólicos específicos en un modelo murino de alimentación restringida en tiempo	42
2. Establecimiento de protocolo de Hi-C en tejido adiposo blanco de animales alimentados bajo distintos paradigmas, ZT4 y ZT16.....	48
3. Análisis bioinformático, control de calidad de las secuencias	59
4. La compartimentación del genoma en tejido adiposo de ratones alimentados con dieta alta en grasa es altamente estable en los puntos de muestreo circadiano	63
5. Los Dominios Topológicamente Asociados de WAT de animales alimentados con HFD muestran diferencias circadianas en función de su orden de anidamiento	66
6. Los genes dentro de subdominios rítmicos de WAT de animales alimentados con HFD participan en procesos relevantes en el contexto de la obesidad.....	69
IX. Discusión.....	75
1. Generación del modelo de alimentación restringida en tiempo.....	75
2. Estandarización y ejecución del protocolo de Hi-C para tejido adiposo	75
3. Análisis bioinformático de datos de Hi-C en WAT, grupo HFD	76
3.1. Compartimentos cromatínicos en general estables entre el día y la noche.....	76
3.2. Dominios topológicamente asociados estables y subdominiosdinámicos en el día y la noche	78
X. Conclusiones	80
XI. Perspectivas	81
XII. Anexos	83
XIII. Referencias	99

I. Resumen

Las enfermedades metabólicas, como la obesidad, la diabetes tipo 2 y el síndrome metabólico, se han convertido en un creciente problema de salud. Con el objetivo de tratar y prevenir estos padecimientos y las complicaciones a las que predisponen se han implementado e investigado intervenciones como la alimentación restringida en el tiempo. Esta dieta consiste en el consumo de alimentos en ventanas de 4-12 horas durante el día y sin implicar una reducción en la ingesta calórica. Esta intervención en la alimentación mejora los rasgos metabólicos asociados con enfermedades metabólicas.

Una propiedad biológica que respalda y explica una regulación positiva del metabolismo debido al tiempo de ingesta de los alimentos es la ritmicidad circadiana. Se ha demostrado que las señales nutricionales, entendidas tanto por la composición de la dieta como el horario de la ingesta, interactúan estrechamente con los ritmos circadianos. Esto es especialmente cierto para tejidos metabólicos, por ejemplo, el tejido adiposo blanco (por sus siglas en inglés: WAT), particularmente importante para el desarrollo de padecimientos metabólicos. A nivel molecular, los ritmos circadianos emergen por la expresión génica periódica de un determinado conjunto de genes relevantes para la fisiología de cada tipo celular. Los transcriptomas rítmicos son propensos a ser reprogramados por señales nutricionales ya sea de forma adversa (dietas obesogénicas) o benéfica (dietas restringidas en tiempo). Para que los eventos de reprogramación en la expresión génica ocurran, necesariamente hay cambios en los mecanismos que regulan la transcripción.

En este trabajo se generó y caracterizó un modelo en ratón de alimentación restringida en tiempo. Una vez establecido el modelo obtuvimos un conjunto de datos genómicos que permiten la exploración de mecanismos que regulan la transcripción a través de la organización tridimensional del genoma en el WAT. Esto se logró con el protocolo de Hi-C, que se estandarizó para WAT de ratones bajo paradigmas de alimentación distintos (Dieta control CD, dieta obesogénica HFD y dieta obesogénica restringida en tiempo tr-HFD) y a dos momentos opuestos del día (ZT4 y ZT16). Se generaron un total de 12 bibliotecas de Hi-C, sin embargo, en este trabajo incluimos solo la comparación temporal de la estructura de la cromatina de WAT de animales alimentados con HFD a dos niveles de organización del genoma.

El primer nivel estudiado fue el de los compartimentos cromatínicos que son regiones del genoma lejanas de manera lineal pero que se agregan en el espacio tridimensional debido a compartir estados transcripcionales similares. El resultado fue que los compartimentos son en general estables en los dos puntos temporales de estudio y para HFD en particular.

El segundo nivel de organización del genoma estudiado corresponde a los dominios y subdominios topológicamente asociados que son estructuras en las que se organiza el genoma y limitan las interacciones dentro de estos dominios. Encontramos que los subdominios anidados muestran un comportamiento dinámico a lo largo del día y en su interior hay genes importantes en procesos sobre-representados en condiciones de obesidad para el tejido adiposo blanco. Estos procesos incluyen la inflamación y otros procesos inmunes, el metabolismo de lípidos, metabolismo y actividad de hormonas, el balance energético y proceso de silenciamiento post-transcripcional. Además, encontramos enriquecido el motivo de unión al DNA de los receptores y reguladores transcripcionales PPAR en los subdominios que muestran ritmicidad circadiana. Existe evidencia que señala la importancia de estos factores en integrar el metabolismo, la ritmicidad circadiana y la progresión de padecimientos metabólicos.

Metabolic diseases, such as obesity, type 2 diabetes, and metabolic syndrome, have become a growing health problem. In order to treat and prevent these conditions and the complications to which they predispose, interventions such as time-restricted eating have been implemented and investigated. This diet consists of eating food in windows of 4-12 hours during the day and without involving a reduction in caloric intake. This dietary intervention improves metabolic traits associated with metabolic diseases.

A biological property that supports and explains a positive regulation of metabolism due to the timing of food intake is circadian rhythmicity. Nutritional cues, understood both by diet composition and timing of ingestion, have been shown to closely interact with circadian rhythms. This is especially true for metabolic tissues, for example, white adipose tissue (WAT), particularly important for the development of metabolic disorders. At the molecular level, circadian rhythms emerge from the periodic gene expression of a certain set of genes relevant to the physiology of each cell type. Rhythmic transcriptomes are prone to be reprogrammed by nutritional signals either adversely (obesogenic diets) or beneficially (time-restricted diets). In order to accomplish reprogramming in gene expression, transcriptional regulation mechanisms are needed.

In this work we generated and characterized a time-restricted feeding mouse model, we obtained a set of genomic data that allows the exploration of mechanisms that regulate transcription through the three-dimensional organization of the genome in WAT. This was achieved with the Hi-C protocol, standardized here for WAT of mice under different feeding paradigms (control diet CD, obesogenic diet HFD, and time-restricted obesogenic diet tr-HFD) and at two opposite times of day (ZT4 and ZT16). A total of 12 Hi-C libraries were generated, however, in this work we included only the temporal comparison of chromatin structure of HFD-fed animals WAT at two levels of genome organization.

The first level studied was the chromatin compartments, which are regions of the genome that are linearly distant but that aggregate in three-dimensional space due to sharing similar transcriptional states. The result was that the compartments are generally stable at the two study time points and for HFD in particular.

The second level of organization of the genome studied corresponds to topologically associated domains and subdomains, which are structures in which the genome is organized and the interactions within these domains are constrained. We found that the nested subdomains show a dynamic behavior throughout the day and within them are important genes in over-represented processes in obesity conditions for white adipose tissue. These processes include inflammation and other immune processes, lipid metabolism, hormone metabolism and activity, energy balance, and

post-transcriptional silencing processes. In addition, we found an enrichment for the DNA-binding motif of receptors and transcriptional regulators PPARs in subdomains showing circadian rhythmicity. There is evidence that points to the importance of these factors in integrating metabolism, circadian rhythmicity and the progression of metabolic disorders.

II. Introducción

1. Padecimientos metabólicos, creciente incidencia

En los últimos años se ha observado una creciente incidencia de enfermedades metabólicas crónicas que muestran comorbilidad entre sí como el sobrepeso, obesidad, diabetes tipo 2 y síndrome metabólico¹. Adicionalmente estos padecimientos constituyen una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial², debido a las complicaciones de salud a las que predisponen y que a menudo se relacionan entre sí. Estas incluyen procesos inflamatorios en diversos órganos, alteraciones en la microbiota intestinal, cardiopatía coronaria, insuficiencia cardíaca, accidentes cerebrovasculares, ciertos tipos de cáncer, complicaciones respiratorias, falla renal, esteatohepatitis no alcohólica, enfermedades neurológicas y riesgos psicosociales³.

En el contexto de México también existe una prevalencia considerable de padecimientos metabólicos. Datos de la población mexicana durante el año 2021 del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP)⁴ indican que la prevalencia de sobrepeso y obesidad en población adulta, de 20 años o más, fue del 72.4%. Mientras que la prevalencia de diabetes en población adulta fue de 15.8%. Estos datos remarcan la importancia de investigaciones orientadas a comprender este tipo de padecimientos en nuestro país.

Generalmente se acepta que las principales causas de los padecimientos metabólicos yacen en malos hábitos alimenticios, como la sobrenutrición a partir de alimentos hipercalóricos y altamente procesados⁵, así como estilos de vida sedentarios⁶. Sin embargo, es necesaria una comprensión más profunda y que considere de manera más completa la biología que subyace el desarrollo de dichas enfermedades, así como de las estrategias para prevenirlas y tratarlas.

2. Plasticidad del tejido adiposo blanco en la salud y en el desarrollo de padecimientos metabólicos

La creciente incidencia de los padecimientos metabólicos ha dirigido la atención al estudio del tejido adiposo blanco (WAT; por sus siglas en inglés), ya que es un órgano complejo que tiene un papel preponderante en la regulación e integración del metabolismo energético de todo el organismo, tanto en homeostasis como en el desarrollo de dichas enfermedades⁷⁻⁹. El tejido adiposo regula funciones como la homeostasis energética balanceando, de acuerdo con las necesidades del organismo, los procesos opuestos de lipogénesis (asimilación y síntesis de ácidos

grasos y triglicéridos, cuando el consumo energético excede al gasto energético) y lipólisis (el catabolismo y liberación de glicerol y ácidos grasos, cuando el gasto energético supera al consumo)⁹. A su vez, las moléculas liberadas durante este proceso participan en el metabolismo de otros tejidos¹⁰. El tejido adiposo blanco también ejerce una función endócrina esencial al secretar adipocinas que funcionan como hormonas o citocinas y que regulan procesos como la ingesta de alimento (por ejemplo, Leptina), la sensibilidad o resistencia a la insulina (por ejemplo, adiponectina, resistina, RBP4, lipocalina) y la respuesta inmune (por ejemplo, TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-8, IL-18, sFRP5)¹¹.

En condiciones de obesidad ocurre una serie de alteraciones en el tejido adiposo blanco que en conjunto definen la pato-fisiología del propio tejido y del organismo (**Figura 1**). La alteración más evidente es un aumento en masa del tejido adiposo, se debe a que los adipocitos incrementan su tamaño al almacenar más grasa en respuesta a un desbalance energético, a este fenómeno se le ha denominado hipertrofia, y está fuertemente implicado en el desarrollo de las complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad como mayores niveles de inflamación en tejido adiposo, fibrosis e hipoxia^{7,12}. Por el contrario la hiperplasia, proceso por el cual la expansión del tejido se da por un aumento en el número de células, se ha asociado a una respuesta plástica que protege contra efectos adversos metabólicos¹³. Sin embargo, se requieren más estudios para determinar los diferentes mecanismos biológicos que promuevan uno u otro proceso en un contexto patológico.

Las alteraciones adversas en la fisiología del tejido adiposo durante el desarrollo de padecimientos metabólicos incluyen: (1) la activación de una respuesta inflamatoria crónica y sistémica^{14,15}, (2) la infiltración de macrófagos al tejido adiposo blanco y su activación a un estado pro inflamatorio¹⁶ asociado también a procesos de muerte celular en adipocitos¹⁷, (3) alteraciones en los niveles de citocinas de manera local, en el tejido adiposo, y/o en circulación sistémica, siendo el caso de altos niveles de TNF- α ¹⁸, CRP, TGF e interleucinas proinflamatorias^{19,20}, bajos niveles de adiponectina^{21,22}, alteraciones en señalización mediada por leptina²³ y (4) alteraciones en el metabolismo de lípidos que resultan en una tasa de recambio de lípidos disminuida con una

²⁴.

En conjunto estas alteraciones conducen a una disfunción en el tejido adiposo cuya consecuencia son las complicaciones que caracterizan a los padecimientos metabólicos. Es por ello que estudios de los mecanismos responsables de dicha disfunción del tejido adiposo son sumamente importantes para desarrollar estrategias terapéuticas en contra de la creciente

incidencia de enfermedades metabólicas. En ese sentido es igualmente importante explorar y entender el efecto de intervenciones en el estilo de vida que han probado ser eficaces para la prevención y tratamiento de dichos padecimientos.

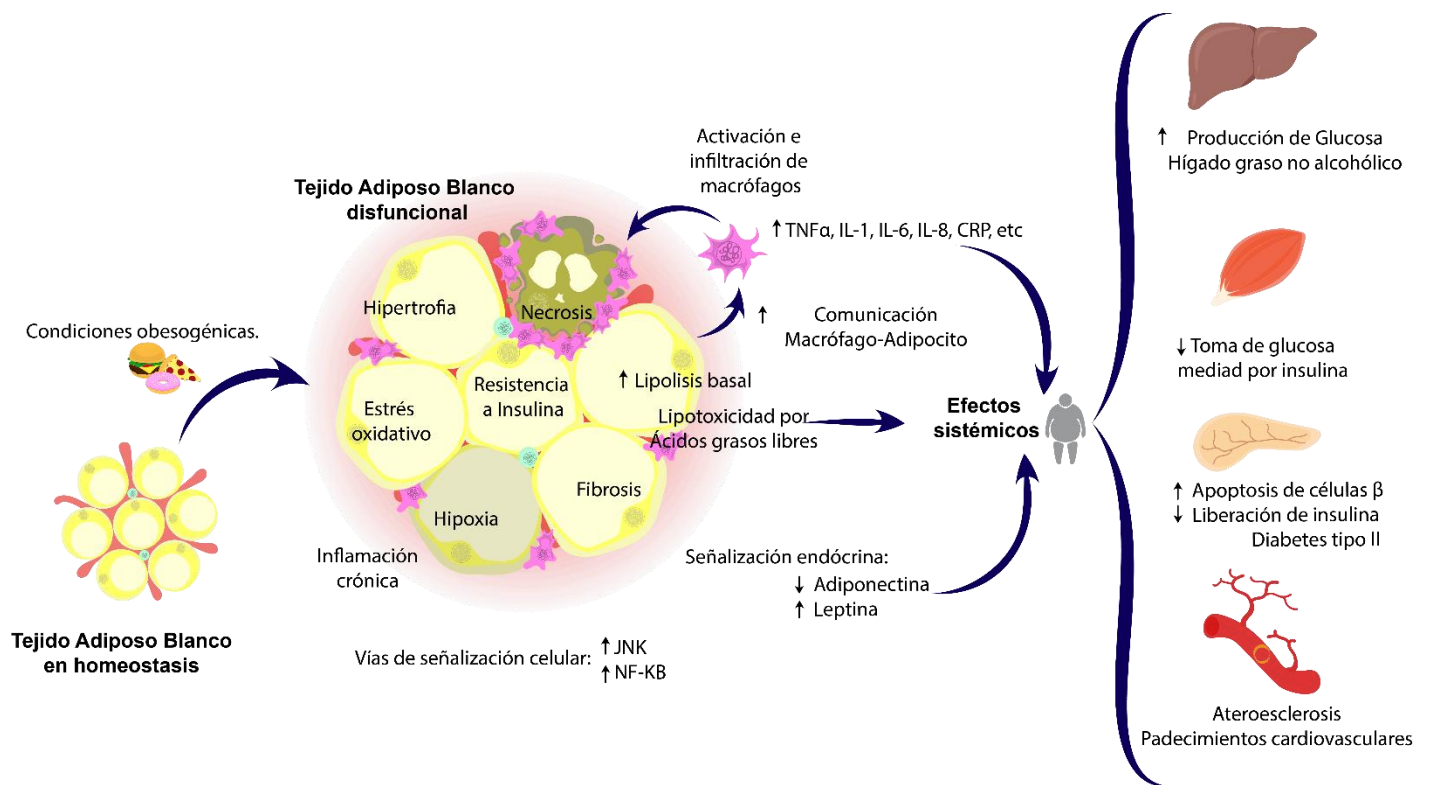


Figura 1. Respuestas del tejido adiposo blanco ante condiciones obesogénicas (exceso calórico). Se esquematizan los diferentes procesos que ocurren en el tejido adiposo que definen su disfunción y conducen a efectos sistémicos adversos en los padecimientos metabólicos. Revisado en: ⁷⁻⁹.

3. Dieta restringida en tiempo en el tratamiento y prevención de padecimientos metabólicos

La mayoría de estrategias para prevenir y tratar los padecimientos metabólicos se han centrado en una disminución de las calorías consumidas en la dieta⁶, sin embargo, un creciente número de evidencias apuntan a que no sólo es importante qué comemos sino también cuándo lo comemos. El riesgo de padecer obesidad y diabetes tipo 2 aumenta tanto por hábitos de alimentación principalmente nocturna (siendo el caso de las trabajadoras y los trabajadores de turnos nocturnos)^{25,26}, como por hábitos de alimentación errática en ventanas de tiempo que pueden llegar a extenderse hasta alrededor de 18 horas^{27,28}. Es por ello que una intervención que

ha mostrado ser muy prometedora para el tratamiento y prevención de padecimientos metabólicos es la dieta restringida en tiempo (por sus siglas en inglés: TRE al referirse a humanos, y TRF para modelos animales) aún ante los retos nutricionales inherentes de una alimentación típica occidental (alta en grasas y carbohidratos, particularmente azúcares refinados). Las dietas TRE y TRF consisten en el consumo de alimentos en ventanas de 4-12 horas durante la fase activa de las 24 horas y sin implicar una reducción en la ingesta calórica²⁹.

La administración de una dieta restringida en tiempo mejora considerablemente parámetros metabólicos en pacientes con enfermedades metabólicas (**Figura 2**). Estas mejoras incluyen: Disminución en el peso y contenido de grasa corporal, disminución en la resistencia a la insulina, mejor tolerancia a la glucosa, disminución de la presión sanguínea, disminución en indicadores de estrés oxidativo y de inflamación³⁰⁻³². De igual forma, se han observado mejoras metabólicas en modelos murinos de obesidad inducida por la dieta³³⁻³⁶.

Pese a ser una intervención relativamente sencilla; la biología detrás de los beneficios metabólicos de la restricción temporal de la alimentación es muy compleja, ya que involucra un gran número de procesos biológicos a diferentes escalas, desde la orgánica, celular, la molecular y epigenética. Un fenómeno biológico que impacta directamente todos estos aspectos y explica de manera fundamental la regulación del metabolismo debido al tiempo de alimentación son los ritmos circadianos.

Alimentación restringida en tiempo

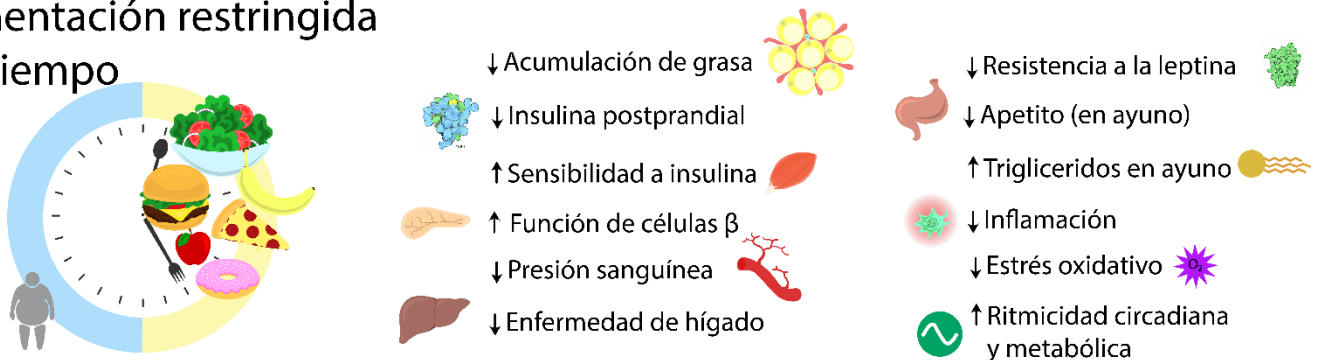


Figura 2. Beneficios metabólicos alcanzados con la dieta restringida en tiempo. Se enlistan una serie de procesos metabólicos que disminuyen o aumentan a través de la intervención en la dieta. Estos procesos se oponen a lo que ocurre durante los padecimientos metabólicos. Revisado en ^{30,33}

4. Ritmos circadianos en la salud y en la enfermedad

El movimiento de rotación de la tierra tiene como consecuencia fluctuaciones en el ambiente, por ejemplo, ciclos de luz y oscuridad así como fluctuaciones en la temperatura entre otras, con una periodicidad cercana a las 24 horas.

Los seres vivos, así como los procesos biológicos que forman parte de su fisiología han evolucionado bajo estas condiciones oscilantes, por lo tanto, los organismos han desarrollado ritmos biológicos que les permiten sincronizarse diariamente con el ambiente mediante señales externas como la luz, denominadas *Zeitgebers* (palabra alemana que significa: Dador de tiempo). De esta forma los organismos se han adaptado y pueden anticiparse a las fluctuaciones periódicas en el ambiente.

A estas oscilaciones se les han denominado ritmos circadianos³⁷. La palabra circadiano tiene un origen etimológico en el latín *circa diem*, que significa: Alrededor de un día. En el caso de los mamíferos podemos encontrar ritmos en los ciclos de sueño/vigilia, de ayuno/alimentación, en la concentración de hormonas circulantes, en el metabolismo tejido-específico y en la expresión de genes³⁸, por destacar algunos procesos biológicos.

Los ritmos circadianos, además de ser sincronizados por señales externas, son autosuficientes y endógenos³⁹. Autosuficientes se refiere a que las oscilaciones continuarán aún en ausencia del *Zeitgeber*, cuya función es sólo la de sincronizar las oscilaciones con el medio ambiente, ya que la ritmicidad ocurre de manera autosustentada por el organismo. Ser endógenos se refiere a que estas oscilaciones se desencadenan fisiológicamente de manera independiente a las señales externas.

En el campo de estudio circadiano el tiempo se mide a partir de la incidencia de la señal sincronizadora o *Zeitgeber*. Las unidades de tiempo son típicamente horas y se denominan ZT (siglas para *Zeitgeber Time*), por ejemplo, el ZT0 es el momento en que se encienden las luces y ZT12 al momento que estas se apagan en un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Dado que los ritmos circadianos se tratan de fenómenos cíclicos es posible modelar matemáticamente su comportamiento y describir una serie de características inherentes a su naturaleza oscilatoria⁴⁰. Estas características son el periodo, la amplitud y la fase. El periodo es el tiempo transcurrido para que un evento o medición dada de este vuelva a ocurrir, al tratarse de fenómenos circadianos el periodo es cercano a las 24 horas. La amplitud es la diferencia entre los

valores máximos y los valores mínimos medidos del fenómeno circadiano. Por último, la fase se refiere al punto temporal de referencia en relación con el fenómeno circadiano, por ejemplo, al ZT en el que la medición del fenómeno circadiano alcanza su valor máximo se conoce como acrofase y al del valor mínimo nadir.

4.1. Las señales nutricionales sincronizan a los relojes periféricos.

De manera fisiológica, el sistema circadiano de los mamíferos se encuentra organizado como una red jerárquica. El reloj central es el núcleo supraquiasmático (por sus siglas en inglés, SCN). El SCN recibe impulsos nerviosos desde la retina en respuesta a la luz y sincroniza al resto de tejidos u osciladores periféricos mediante diversos mecanismos neuroendocrinos⁴¹. La sincronía entre el organismo y su ambiente, así como entre el reloj central y los osciladores periféricos es importante para sostener la homeostasis del metabolismo y el balance energético⁴². Por otro lado, la desincronización circadiana está asociada a diversos padecimientos como trastornos de sueño, desórdenes psiquiátricos, enfermedades cardiovasculares, cáncer, y de manera relevante para el presente proyecto padecimientos metabólicos crónicos como obesidad, diabetes tipo 2 y síndrome metabólico⁴³.

El metabolismo y la señalización asociados con la alimentación se encuentran bajo una fuerte regulación circadiana. Por ejemplo las hormonas que orquestan la homeostasis energética como la insulina⁴⁴⁻⁴⁶, glucagón⁴⁴, leptina⁴⁷, grelina⁴⁸, la hormona adrenocorticotrópica y el cortisol⁴⁹, muestran robustas oscilaciones circadianas. En el caso de hormonas con funciones antagónicas su secreción se encuentra en antifase una de la otra, por ejemplo, la insulina y el glucagón, que controlan la homeostasis en el metabolismo de glucosa. La insulina se secreta en mayor cantidad durante la fase de vigilia y alimentación en la que hay una mayor cantidad de glucosa circulante proveniente de la alimentación, por lo que favorece que las células de órganos sensibles a esta hormona internalicen la glucosa. Por el contrario, el glucagón se secreta durante la fase de sueño y ayuno, su función es la de mantener los niveles de glucosa circulante en homeostasis para satisfacer las necesidades energéticas del organismo⁵⁰.

Un creciente número de evidencias apuntan a que órganos periféricos importantes en el metabolismo son muy sensibles a los ciclos de ayuno/alimentación y son sincronizados (o desincronizados, si la señal se da en un tiempo atípico o de forma arrítmica) de manera muy importante a través de la dieta y la disponibilidad de nutrientes^{51,52} (**Figura 3**). Esta sincronización

sucede de manera independiente y desacoplada a la sincronización mediada por la luz que ocurre a través del SCN⁵³⁻⁵⁶. Una evidencia contundente de este fenómeno se observa cuando se restringe el acceso a la dieta a la fase de descanso, en donde la ritmicidad de procesos asociados al metabolismo en órganos periféricos muestra un corrimiento de fase para estar en sincronía con el nuevo esquema de alimentación impuesto^{53,57}

Además del tiempo de la alimentación, el contenido nutricional también tiene un impacto en la ritmicidad circadiana. Se han descrito alteraciones en las características de los ritmos circadianos como consecuencia de la alimentación con dietas altas en grasa. Por ejemplo se ha descrito un alargamiento del periodo y una disminución en la amplitud de ritmos en el comportamiento locomotor y de la ingesta de alimento, la disminución en la amplitud ocurre como consecuencia de un aumento de estos comportamientos durante la fase de descanso⁵⁸. De manera muy interesante, se ha observado que otra consecuencia de las dietas altas en grasa es promover una pérdida de coherencia entre los metabolomas de diversos tejidos con respecto a la condición de dieta normocalórica⁵⁹, lo cual puede interpretarse como una desincronización y reprogramación circadiana a nivel de todo el organismo inducidas por la dieta y asociadas estrechamente con disrupciones metabólicas.

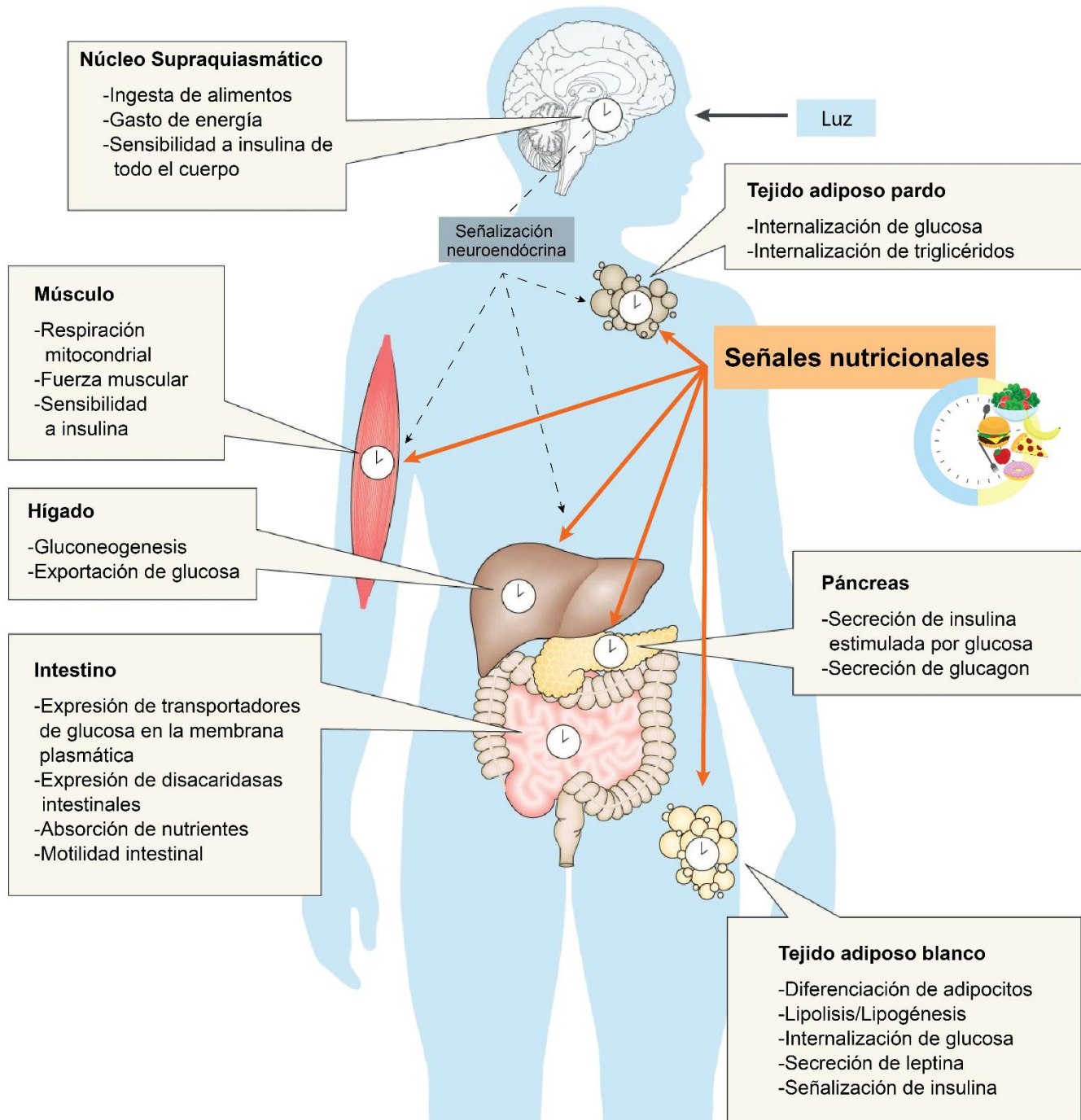


Figura 3. Red jerárquica de osciladores. Se muestra el SCN, referido como reloj central que es directamente sincronizado por la luz, así como diversos tejidos metabólicos que pueden ser sincronizados directamente por señales nutricionales adicional a la sincronización neuroendocrina mediante el SCN. Se enlistan los procesos que presentan oscilaciones circadianas para cada tejido. Modificado de ⁴⁶.

Dado que tejidos periféricos y metabólicamente activos, como WAT, hígado, músculo, corazón, intestino y cerebro son muy sensibles a los ciclos de ayuno/alimentación no es de extrañarse que sea en estos tejidos donde se han descrito un mayor número de beneficios debido a la dieta restringida en tiempo ante condiciones de obesidad⁶⁰ (**Figura 4**). Estos beneficios descritos exponen el potencial de esta intervención en revertir los efectos adversos impulsados en padecimientos metabólicos en diferentes tejidos y como consecuencia en la salud integral del organismo.

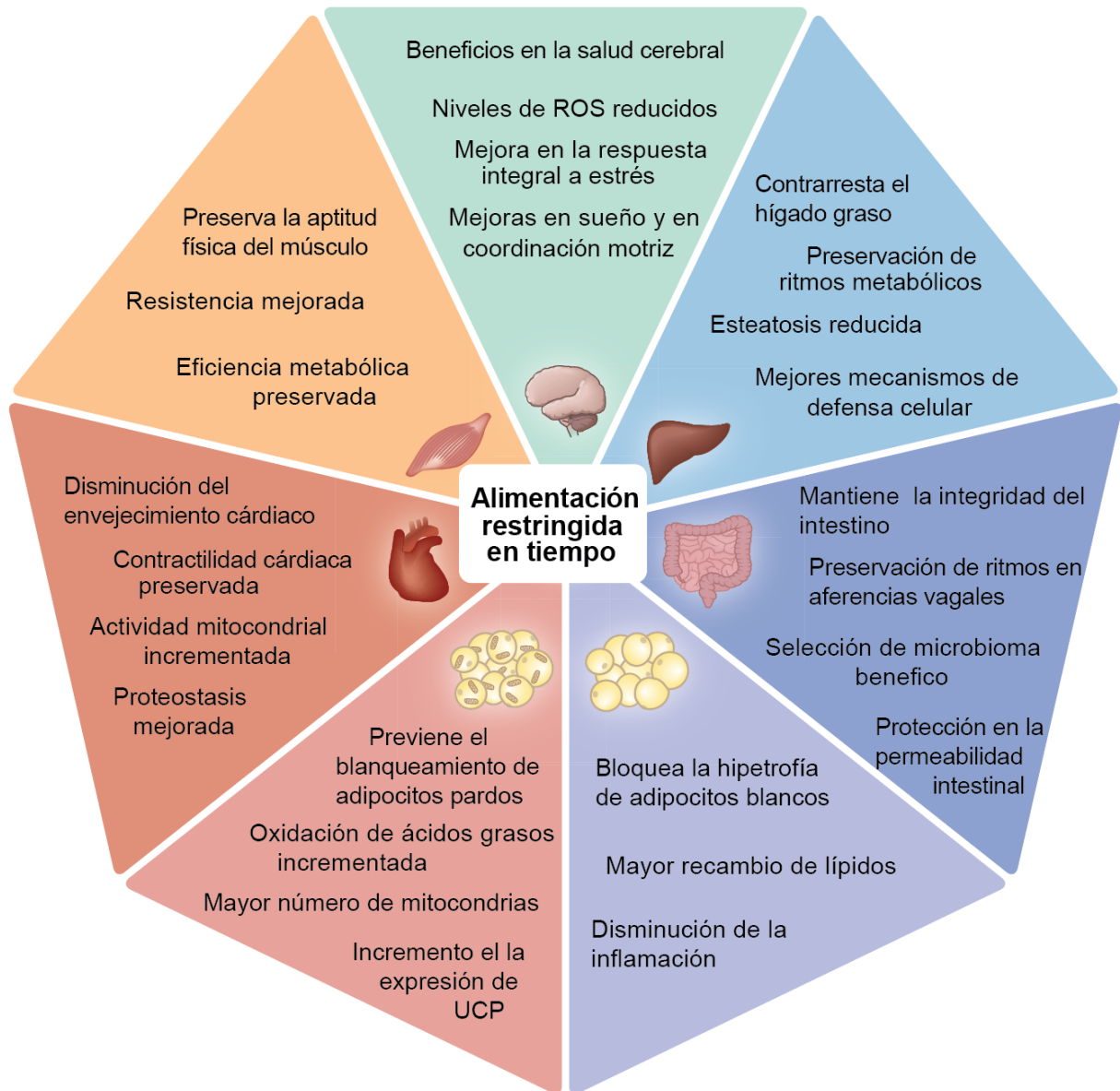


Figura 4. Beneficios o adaptaciones benéficas descritas para diferentes órganos o tejidos alcanzadas gracias a la alimentación restringida en tiempo. Las observaciones provienen de diferentes estudios y diferentes modelos de estudio. Abreviaturas: ROS: Especies reactivas de oxígeno, UCP: Proteína desacoplante. Tomado de ⁶⁰.

De manera notable en el tejido adiposo existe toda una serie de beneficios alcanzados con la dieta restringida en tiempo que contrarrestan la progresión y las complicaciones asociadas a padecimientos metabólicos. Estos beneficios incluyen: una reducción en la masa del tejido adiposo, manteniendo la masa muscular, un menor tamaño de los adipocitos indicando menores niveles de hipertrofia y menores niveles de marcadores de inflamación como citocinas o macrófagos infiltrados en el tejido^{33,34,61}. Cabe destacar que estos beneficios en el tejido adiposo no se limitan a este tejido, sino que deben repercutir en otros órganos y a nivel sistémico. Esto se debe a la importante actividad de señalización endócrina que ejerce el tejido y su relevancia en contextos de obesidad.

En conjunto, todos estos hallazgos exponen la relevancia de señales nutricionales (entendiéndose tanto el contenido nutricional como el tiempo de alimentación) como *Zeitgebers* que refuerzan la ritmicidad circadiana y definen el estado de salud metabólico, siempre y cuando se den en sincronía apropiada y de manera estable, como es el caso de la dieta restringida en tiempo. Adicionalmente, al reconocer el papel preponderante del tejido adiposo blanco al regular el balance energético de todo el organismo, así como en el desarrollo de la obesidad y sus complicaciones resulta pertinente el estudiar a detalle los efectos de la dieta restringida en tiempo en el WAT.

4.2. Reloj molecular y Genes Controlados por el Reloj

A nivel de células individuales, la ritmicidad circadiana se sostiene por un reloj molecular que consiste en un conjunto de asas de retroalimentación en la transcripción y traducción de factores transcripcionales (**Figura 5**). Estos factores activan o reprimen la transcripción de genes rítmicos, denominados genes controlados por el reloj (por sus siglas en inglés, CCG)⁶².

En mamíferos la principal asa de retroalimentación está dada por las proteínas CLOCK y BMAL1 que forman un heterodímero que se une a elementos reguladores del genoma que contienen su motivo de unión, llamados E-boxes. Estos factores activan la transcripción de los CCG, entre los que se encuentran *Per1/2/3* y *Cry1/2/3*⁶³. Estos genes se transcriben, se traducen y las proteínas PER y CRY forman un heterodímero que se transloca al núcleo y, mediante interacciones proteína-proteína, inhiben la actividad del heterodímero CLOCK/BMAL1, deteniendo su propia transcripción junto con la de los demás CCG. Al descender la expresión de *Per* y *Cry*, disminuye también la abundancia de las proteínas PER y CRY, por lo que el heterodímero CLOCK/BMAL1 es desinhibido

y el ciclo vuelve a iniciar. El tiempo en el que ocurre este mecanismo es cercano a las 24 horas⁶³. Además, existe otra asa de retroalimentación mediada por un par de factores nucleares que son rítmicos y tienen funciones antagónicas; ROR $\alpha/\beta/\gamma$ (que funciona como activador de la transcripción) y REV-ERB α/β (que es un represor transcripcional). ROR y REV-ERB compiten por el mismo motivo de unión en regiones regulatorias, llamado RORE, que puede encontrarse por ejemplo en el promotor de *Arntl*⁶³, gen codificante de BMAL1. La interrelación de estos mecanismos junto con otros no mencionados en este texto modulan el reloj molecular y aumentan la complejidad de su regulación, permitiendo que existan genes rítmicos con picos de expresión a diferentes momentos del día, dependiendo de la combinación de factores presentes en los promotores y *enhancers* que regulan la expresión de CCG⁶⁴. Se han descrito transcriptomas rítmicos en diversos tejidos⁶⁵, siendo el hígado el que muestra el mayor número de genes rítmicos, razón fundamental de que mucho de lo que se conoce acerca de ritmicidad circadiana a nivel molecular se ha limitado a este órgano.

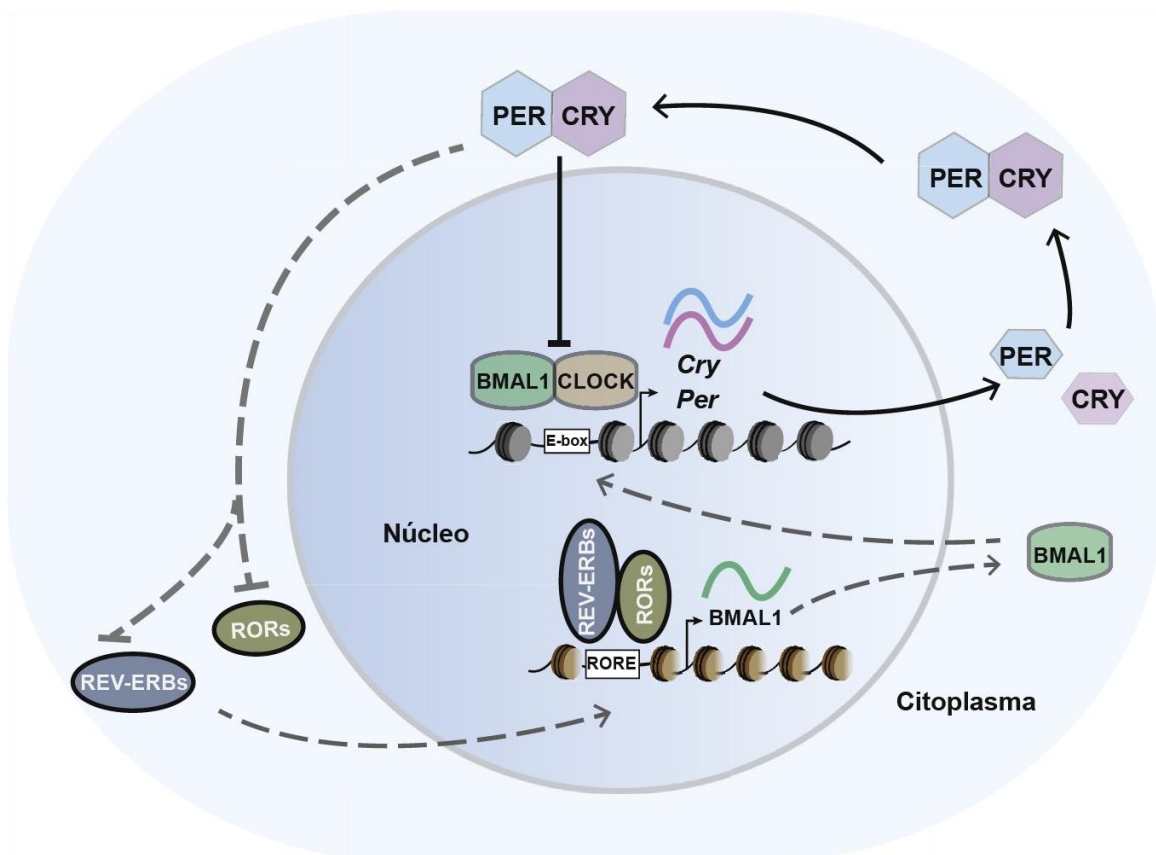


Figura 5. El reloj molecular. Esquematización de las principales asas de retroalimentación que constituyen el reloj molecular y explicadas en el texto. Tomado de ⁶⁶.

4.3. *Reprogramación de transcriptomas rítmicos inducida por la dieta*

La estrecha comunicación entre el metabolismo y los ritmos circadianos se hace muy evidente a nivel molecular ya que muchos de los CCG son genes que codifican para enzimas limitantes en diversas vías metabólicas y para proteínas que actúan como sensores de nutrientes en una manera tejido-específica^{67,68}. Como resultado, existe una compartimentación temporal del metabolismo en homeostasis y su perturbación en condiciones patológicas. Se ha caracterizado también que mutaciones en factores del reloj molecular predisponen al desarrollo de patologías metabólicas como obesidad y síndrome metabólico⁶⁹⁻⁷¹.

El estado metabólico a su vez ejerce una importante regulación sobre los transcriptomas circadianos. Por ejemplo, la dieta alta en grasa reprograma el transcriptoma rítmico del hígado, es decir, que algunos genes pierden ritmicidad mientras que otro conjunto de genes que no eran rítmicos adquieren oscilaciones en adaptación a la dieta alta en grasa⁷². De manera interesante ocurre lo mismo con *enhancers*, cuya actividad se ve reprogramada en respuesta a obesidad inducida por la dieta⁷³. En el caso del tejido adiposo el consumo de dietas altas en grasa ha mostrado una disminución en las amplitudes de genes circadianos^{58,74}.

Previamente se ha descrito que los paradigmas de restricción temporal de la dieta robustecen la expresión de genes e incluso fomentan la expresión rítmica de nuevos genes en hígado⁵¹. Esta robustez está presente aún ante retos nutricionales como la dieta alta en grasa y produce el descenso de genes relacionados en la señalización proinflamatoria en tejido adiposo blanco³³. En este mismo tejido se ha demostrado que el reloj molecular es esencial para alcanzar los beneficios de la dieta restringida en tiempo al robustecer la ritmicidad de procesos como el metabolismo de lípidos y proceso termogénicos que contribuyen a la homeostasis energética⁷⁵.

Un estudio sobresaliente analizó la expresión de genes bajo un paradigma de alimentación obesogénica restringida en tiempo (durante 9 horas, del ZT13 al ZT22) para 22 tejidos y regiones del cerebro con muestreos a una resolución temporal de cada 2h en un ciclo de 24 horas⁷⁶. En él se encontró que alrededor del 80% de todos los genes del genoma del ratón se encuentran diferencialmente expresados o son rítmicos en el esquema de TRF para al menos un tejido analizado. La intervención alimenticia, en comparación con la condición *ad libitum*, aumentó la ritmicidad en la expresión global de genes y, además promovió una adaptación a la dieta que impulsa la sincronía entre tejidos para la compartimentación temporal de procesos catabólicos y anabólicos, cualidad previamente descrita como benéfica para la salud metabólica del organismo^{77,78}.

Al disponer de la información de expresión circadiana de los diferentes tejidos es posible realizar una anotación funcional de los genes diferencialmente expresados en TRF tanto tejido específico como multi-tejido. En este sentido procesos como la inflamación, el estrés oxidativo y el metabolismo de glicerolípidos se ven disminuidos mientras que procesos asociados a la transcripción y traducción aumentan su amplitud circadiana, lo cual correlaciona con la robustez en las oscilaciones circadianas de genes adquirida por la intervención alimenticia. Además, existen procesos que adquieren oscilaciones como la autofagia, el metabolismo de lípidos, la regulación del ciclo celular y las funciones mitocondriales. (Figura 6). De manera relevante para este proyecto, los tejidos adiposos fueron los que mostraron un mayor número de genes diferenciales (34%-46%), demostrando la sensibilidad y plasticidad de estos tejidos ante señales nutricionales. Las vías sobre reguladas para el tejido adiposo blanco incluyen el metabolismo de glucosa (glucólisis y metabolismo de piruvato), el metabolismo de ácidos grasos, el catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada, el ciclo del ácido tricarboxílico, la fosforilación oxidativa y organización mitocondrial, mientras que las vías reguladas a la baja tienen que ver con activación inmune, señalización inflamatoria y regulación del ciclo celular.

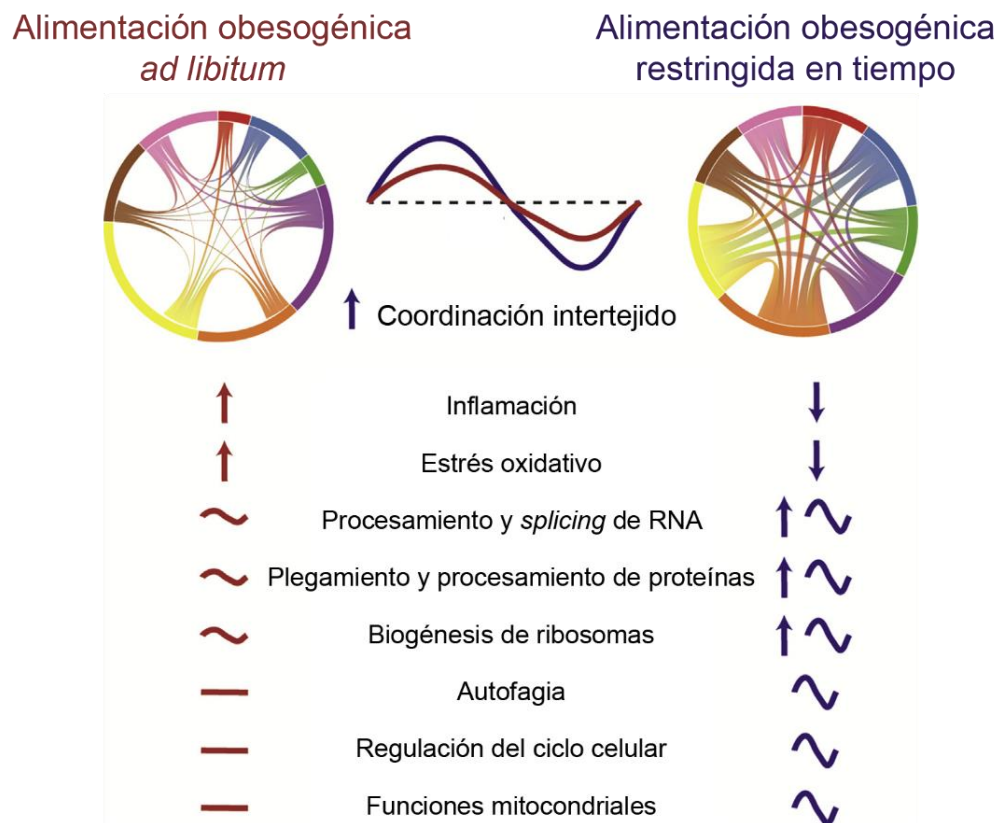


Figura 6. Panorama transcripcional diurno de la respuesta multi-tejido ante la restricción temporal de la alimentación. Los arcos esquematizan las correlaciones en la expresión temporal de genes entre los

diferentes tejidos. Se enlistan procesos adversos que disminuyen bajo la alimentación restringida en tiempo así como procesos benéficos que aumentan o sus oscilaciones circadianas se ven robustecidas con la intervención alimenticia. Tomado de⁷⁶

Los cambios transcripcionales en respuesta a señales nutricionales descritos, y los que hacen falta por describir, se producen como resultado de mecanismos que regulan la expresión génica. La regulación por medio de mecanismos epigenéticos explica de manera importante cómo es que se logra integrar las señales del ambiente (en este caso la dieta), el metabolismo y la expresión rítmica de genes, tanto en la homeostasis como en la enfermedad.

5. Transiciones en la cromatina en el contexto circadiano y ante señales nutricionales

El sustrato de los procesos epigenéticos que regulan la expresión de los genes es la fibra de cromatina, que también experimenta oscilaciones circadianas en la ocupación y activación de factores transcripcionales y modificaciones postraduccionales de histonas. También, como se ha descrito de manera más reciente, la organización tridimensional del genoma tiene una función relevante en la regulación trascricional de genes rítmicos^{79,80}.

5.1. Regulación epigenética, ritmicidad circadiana y metabolismo

La interacción entre factores del reloj molecular con reguladores epigenéticos ha sido bastante estudiada (**Figura 7**). Se ha descrito por ejemplo que el heterodímero CLOCK/BMAL1 interactúa con las acetiltransferasas de histonas (por sus siglas en inglés, HATs) CBP, p300 y pCAF^{81,82} promoviendo un estado de cromatina transcripcionalmente activa, de hecho, se ha descrito que la misma proteína CLOCK tiene actividad de HAT⁸³. El heterodímero también interactúa con la proteína MLL1, una metiltransferasa de histonas que deposita la marca H3K4me3⁸⁴, esta marca se encuentra presente en promotores activos. CLOCK/BMAL1 interactúan también con demetilinasas de histonas como KDMI (previamente nombrada LSD1)⁸⁵ y KDM5a (antes JARID1a)⁸⁶ que retiran marcas características de regiones transcripcionalmente inactivas. De manera similar se han identificado interacciones con complejos represores o activadores para los demás factores del reloj molecular como PER/CRY, REVERB y ROR⁸⁰.

Adicionalmente el metabolismo ejerce una regulación directa sobre el epigenoma debido a que tanto *writers* como *erasers* epigenéticos requieren como sustratos o cofactores a diferentes

metabolitos y por lo tanto son sensibles a fluctuaciones de los mismos⁸⁷. Estos metabolitos en una importante medida son parte del metabolismo de macromoléculas de conforman la dieta.

Diversos estudios han descrito cambios epigenéticos en tejido adiposo, hígado y páncreas, tanto en la enfermedad como en las mejoras alcanzadas por intervenciones en la dieta, incluida la restricción temporal de la alimentación⁸⁸. Sin embargo, estos estudios no consideran la ritmicidad circadiana y además se han limitado a una visión lineal del genoma.

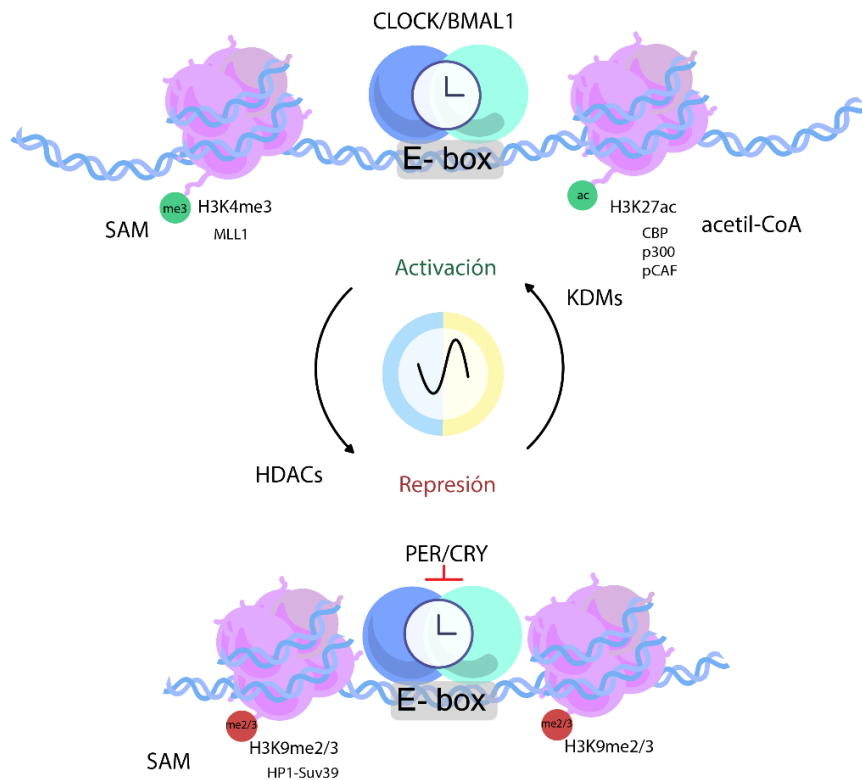


Figura 7. Reguladores epigenéticos asociados con los heterodímeros BMAL1/CLOCK y PER/CRY que modulan las transiciones entre estados de activación y de represión transcripcional. Se indican las modificaciones epigenéticas que regulan la actividad transcripcional, así como también los metabolitos que donan los grupos químicos para dichas modificaciones. Abreviaturas: SAM: S-Adenosin metionina, acetil-CoA: acetil-Coenzima A, KDMs: Siglas para Demetilinas de lisina, HDACs: Siglas para Deacetilasas de histonas. Revisado en ^{80,87}.

5.2. Organización tridimensional del genoma

En los últimos años, gracias al desarrollo de las tecnologías de captura conformacional de cromosomas (tecnologías 3C), se ha demostrado que la organización tridimensional del genoma es compleja, dinámica y complementa de manera crucial la regulación epigenética en la transcripción de genes. Mediante experimentos de Hi-C⁸⁹ en los que es posible evaluar las interacciones entre todo el genoma se ha elucidado una estructuración del genoma a múltiples escalas⁹⁰ (**Figura 8**). La manera en que los datos de Hi-C son representados es a través de matrices de interacción en las que se grafica la misma región genómica tanto en el eje x como en el eje y , por ejemplo, un cromosoma completo. En el punto donde se intersectan dos regiones de dicho cromosoma se asigna un color que denota la frecuencia de interacción entre esas dos regiones, a mayor frecuencia de interacción es mayor la intensidad del color. Es por esa razón que la diagonal siempre muestra una alta intensidad y frecuentemente las matrices se presentan de la diagonal hacia arriba, ya que ambas mitades son simétricas.

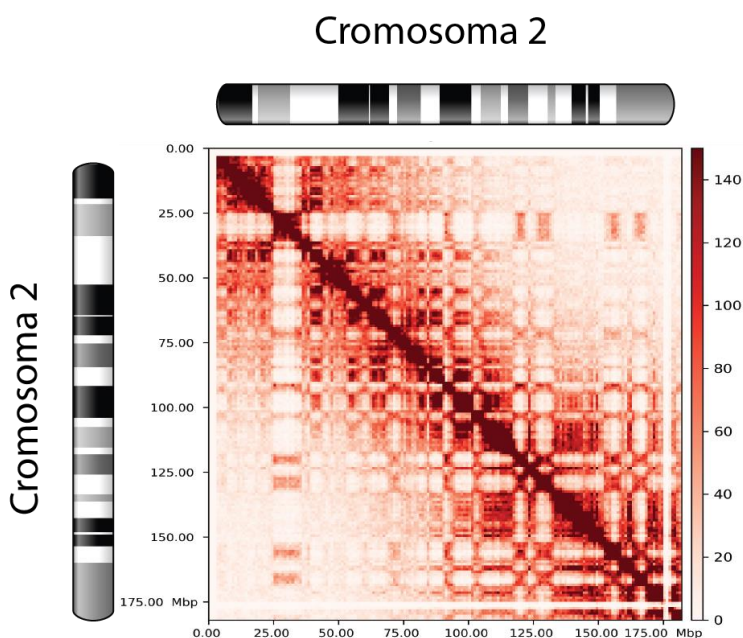
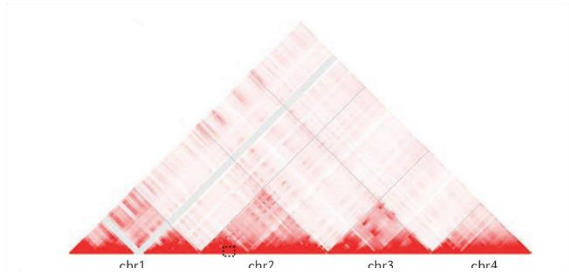


Figura 8. Matriz de contactos de datos de Hi-C ejemplo en la que muestran los contactos entre las diferentes regiones del cromosoma 2 de ratón. Las regiones rojas corresponden a regiones que interactúan con mayor frecuencia entre sí pese a estar lejanas hasta por una centena de megabases.

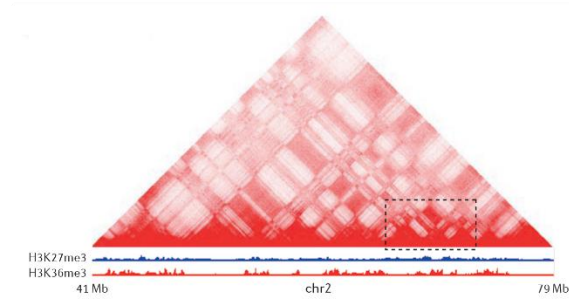
Al igual que para un mapa de una ciudad es posible irse acercando en las matrices de contactos de Hi-C, revelando diferentes niveles de organización tridimensional del genoma (**Figura 9**). En la escala de mayor tamaño se observa que cada uno de los cromosomas mantiene una posición discreta dentro del núcleo formando territorios cromosómicos. En la escala de megabases los cromosomas se segregan en compartimentos cromatínicos que son regiones del genoma que comparten un mismo estado de la cromatina y tienden a agregarse en el espacio nuclear y

separarse de regiones con estados distintos. Inicialmente se identificaron dos tipos de compartimentos, A y B⁸⁹. El compartimento A se entiende como cromatina transcripcionalmente activa, de manera general eucromatina, por el contrario, el compartimento B refleja regiones del genoma transcripcionalmente silenciadas o heterocromatina. En las matrices de contactos los compartimentos se observan como un patrón de cuadrícula ya que se intercalan de manera lineal regiones de los dos compartimentos de manera tridimensional se encuentran en mayor cercanía con regiones de su mismo compartimento. A una escala de alrededor de centenas de kilobases existen los dominios topológicamente asociados (por sus siglas en inglés, TADs) que estructuran los cromosomas en unidades estructurales y de regulación del genoma. Las regiones genómicas dentro de un TAD interactúan más frecuentemente entre ellas que con regiones adyacentes fuera del mismo. La segregación del genoma en TADs correlaciona con cualidades del genoma como modificaciones de histonas, expresión coordinada de genes, asociación a la lamina nuclear, que son similares al interior del mismo TAD, adicionalmente TADs con características similares son los que se agregan entre sí para formar los compartimentos cromatínicos previamente descritos. En las fronteras que delimitan los TADs es común encontrar a proteínas *insulators* como CTCF, una proteína que cuenta con 11 dedos de zinc y se une al DNA a motivos de unión en particular⁹¹. La manera en que CTCF contribuye a la formación de dominios es a través de su asociación con la cohesina, un complejo multiproteínico con forma de anillo. La cohesina recorre la cromatina formando asas hasta que se encuentra con moléculas de CTCF unidas a la cromatina con orientación convergente en las fronteras de los TADs, a este modelo se le conoce como *loop extrusion*⁹². La manera en que se frecuentemente se presentan y delimitan los TADs en las matrices de contactos es como triángulos con una densa cantidad de contactos a su interior cuyas aristas inferiores corresponden a las fronteras. Al interior de los TADs se encuentran asas de cromatina entre regiones regulatorias en *cis* distales del genoma como por ejemplo entre promotores y *enhancers*. Las asas de cromatina entre elementos regulatorios pueden también estar mediadas por CTCF y cohesina. Las asas de cromatina se observan como puntos con una mayor frecuencia de contactos entre dos regiones dadas.

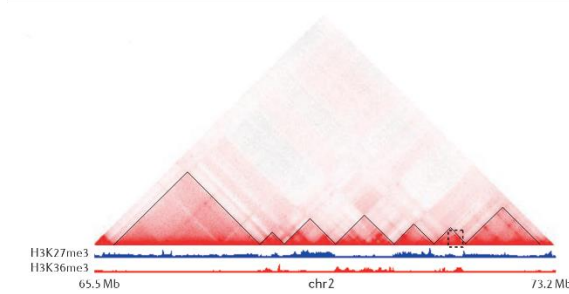
Territorios cromosómicos



Compartimentos cromatínicos



Dominios Topológicamente Asociados



Asas de cromatina *enhancer-promotor*

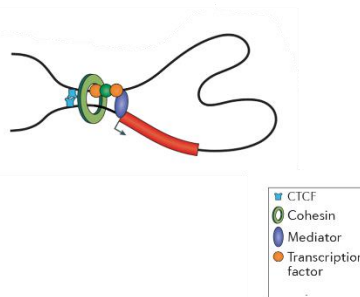
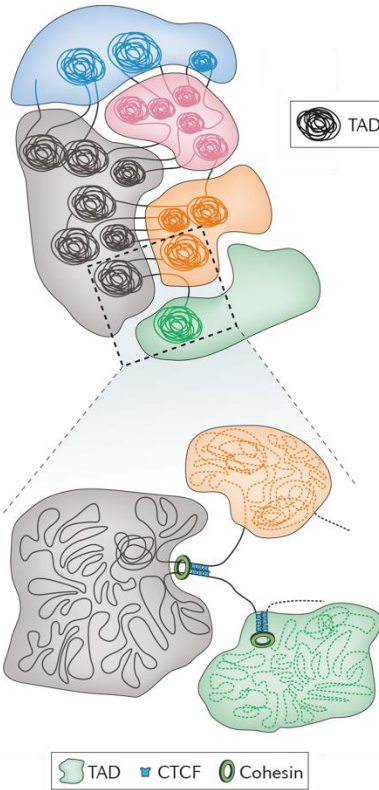
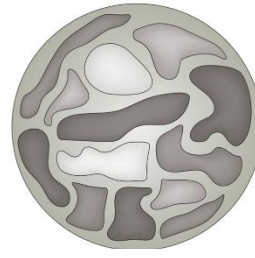
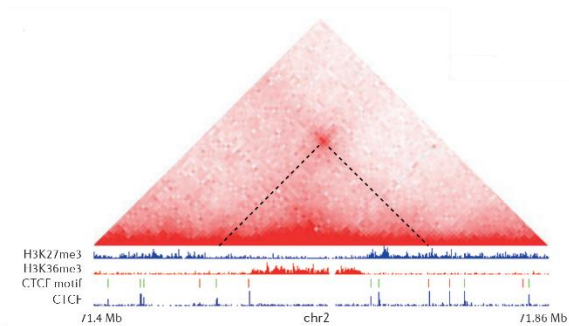


Figura 9. Distintos niveles de organización tridimensional del genoma. Se muestran a la izquierda las matrices de contactos mostrando como se observan las estructuras genómicas ejemplificadas en los diagramas a la derecha. Los rectángulos de líneas punteadas muestran la región a la que corresponde el siguiente nivel de organización de mayor escala a menor. Modificado de:⁹⁰

5.3. *Oscilaciones circadianas en la topología del genoma, en la salud y obesidad*

En los años recientes se ha caracterizado que la organización tridimensional del genoma tiene una función importante en la regulación de la expresión circadiana de genes. La primer evidencia de la ritmicidad circadiana en la topología del genoma en células de mamífero, se dio mediante ensayos de 4C (variante de las tecnologías 3C que mide los contactos de una región, denominada ancla, contra todo el genoma) tomando como ancla el promotor de *Dbp* un CCG, tanto en la condición silvestre como en células K.O. de *Arntl1*⁹³. Los resultados de este trabajo indican que existe una corregulación espaciotemporal de genes rítmicos dependiente del reloj molecular. Otros estudios aportan evidencias adicionales de la importancia de los factores del reloj molecular en la regulación mediada por la topología del genoma. Por ejemplo, en un estudio en el que se elimina un *enhancer* intrónico de *Cry1* se ve perturbada la expresión e interactomas de *Cry1* y algunos CCGs⁹⁴. Como fenotipo de la delección del *enhancer* se observa una disminución del periodo circadiano de actividad locomotora de los animales. Otro estudio ha descrito la actividad de REV-ERB α disrumpiendo asas de cromatina, lo que contribuye al silenciamiento de genes durante su nadir transcripcional⁹⁵.

Trabajo previo del laboratorio en donde se realizaron experimentos de Hi-C y *Promoter Capture* Hi-C en hígado murino resueltos en tiempo han permitido una comprensión global de la organización espaciotemporal del genoma a lo largo del ciclo circadiano y a diferentes escalas genómicas⁹⁶ (**Figura 10**). En este trabajo se detalló que en la escala de compartimentos existen cambios de asignación de los mismos en sincronía con los ritmos de la expresión génica. En la escala de TADs no se observan cambios aparentes sugiriendo que estas estructuras son estables durante las 24 horas. Finalmente se describe que existen asas de cromatina tanto rítmicas como estables conectando a los promotores de genes circadianos con elementos de regulación en el genoma del ratón y que el número de interacciones parece incrementarse durante la acrofase transcripcional.

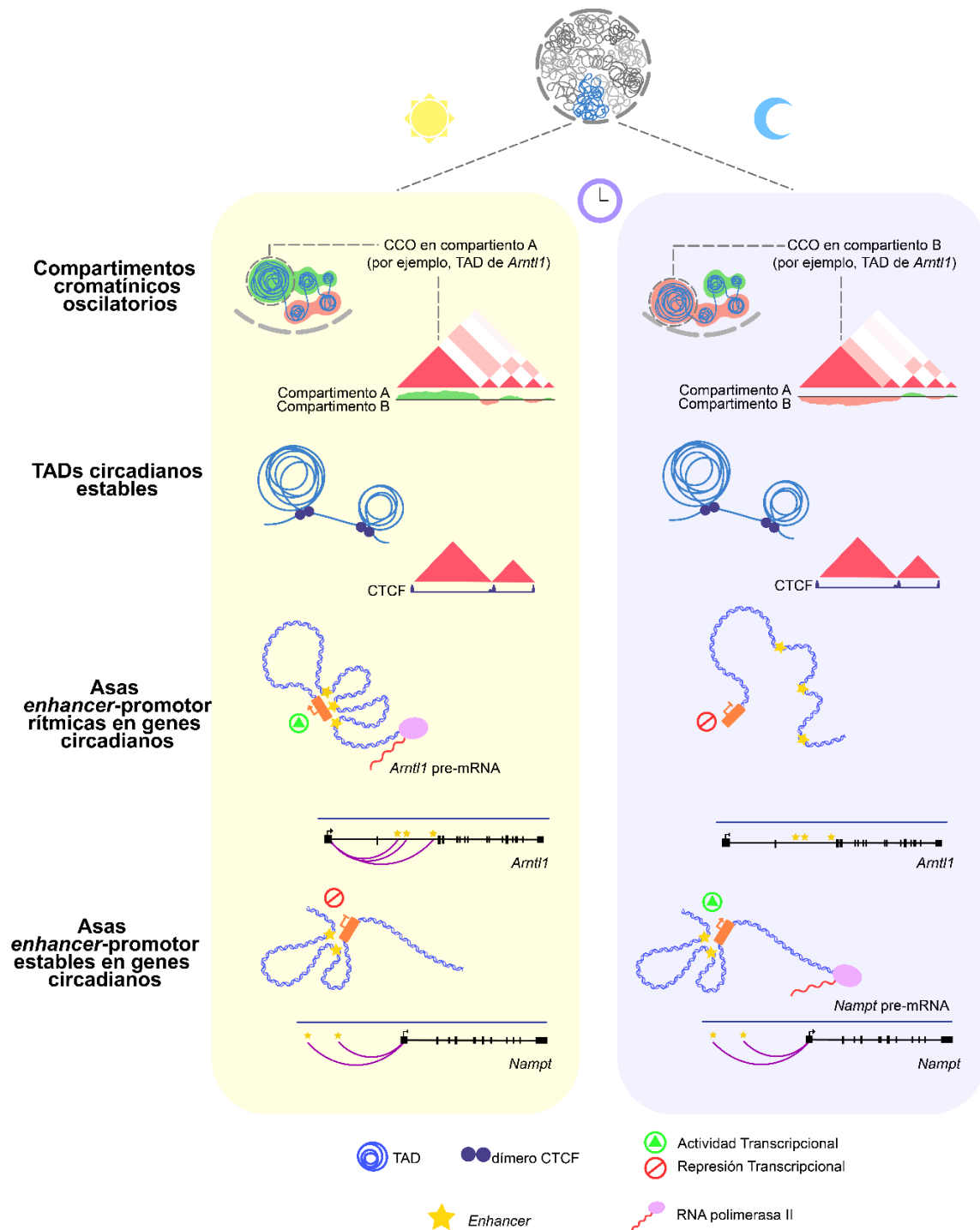


Figura 10. Ritmos circadianos en la organización del genoma. se ha descrito que mientras que los TADs permanecen estables, existen casos en los que la asignación de compartimento es rítmica a lo largo del día. Se muestran también dos ejemplos de genes circadianos, por un lado *Arntl1*, parte del reloj central muestra contactos muy dinámicos que coinciden con su acrofase en expresión; mientras que *Nampt*, un CCG, mantiene estables sus contactos pese a tener una acrofase transcripcional. CCO: Compartimento cromatínico oscilatorio. Tomado de ⁹⁷.

La función que ejercen las señales nutricionales en la organización tridimensional del genoma y su impacto en la regulación de la transcripción ha sido muy poco estudiada. Existe sólo una evidencia que evalúa el efecto de la dieta alta en grasa. En este trabajo se identifica la formación o pérdida de contactos *enhancer*-promotor, la activación de los elementos de regulación y la ocupación factores transcripcionales presentes en contactos estables⁹⁸ (Figura 11), sin embargo, este estudio se limita a estudiar el efecto sólo en hígado y no se trata de experimentos resueltos en tiempo.

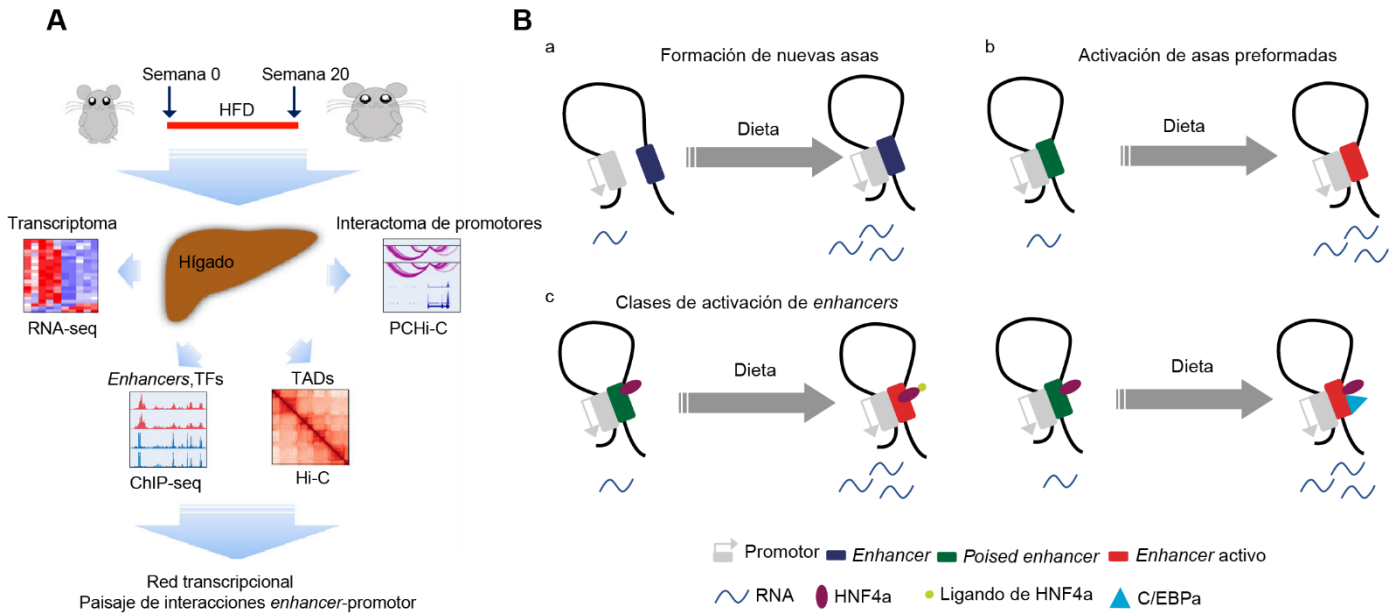


Figura 11. La dieta alta en grasa es capaz de modificar los interactomas en hígado. Esquemización de las estrategias experimentales utilizadas en ⁹⁸ **A**. Ejemplos de cambios en la regulación distal detonadas por la dieta, identificadas en la publicación **B**. Estos incluyen la formación de nuevas asas de cromatina **Ba**, y la activación de *enhancers*, ya sea por modificaciones de histonas **Bb**, la activación de factores transcripcionales o la activación sinérgica con otros activadores **Bc**.

III. Planteamiento del problema

El estudio de la asociación de dietas (tanto obesogénica como restringida en tiempo) con la organización tridimensional del genoma dependiente del tiempo circadiano enfocado en el WAT contribuirá a identificar y describir la regulación circadiana que favorece la prevención y tratamiento de enfermedades complejas que prevalecen en las sociedades modernas, tales como la obesidad y la diabetes tipo 2. Adicionalmente, la organización tridimensional revela una capa reguladora epigenética crítica para los ritmos circadianos que permite descubrir nuevos mecanismos moleculares que desencadenan estados patológicos asociados con la alteración circadiana en estrecha interrelación con la alimentación y el metabolismo. Por estas razones en el presente estudio se planteó el generar un conjunto de datos genómicos que permitirán dilucidar la organización tridimensional del genoma dependiente del tiempo de células del WAT de animales bajo tres diferentes paradigmas de alimentación. Sin embargo, dado el alcance de la presente tesis nos enfocamos en la comparación temporal de la topología genómica bajo un paradigma de dieta obesogénica (HFD).

IV. Hipótesis

Mecanismos de regulación topológica del genoma, tales como los cambios en la asignación de compartimentos cromatínicos y la alteración de dominios topológicamente asociados, son capaces de regular repuestas transcripcionales dependientes del tiempo circadiano en WAT de animales alimentados con HFD.

V. Objetivo general

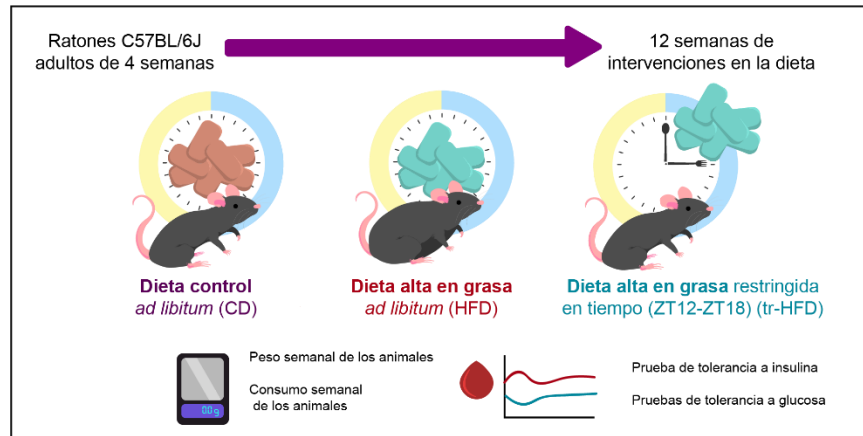
Caracterizar la función de la organización tridimensional del genoma en la regulación transcripcional de genes dictada por señales nutricionales en tejido adiposo blanco bajo un contexto de regulación circadiana. Comenzando con el grupo de alimentación alta en grasa *ad libitum*.

VI. Objetivos particulares

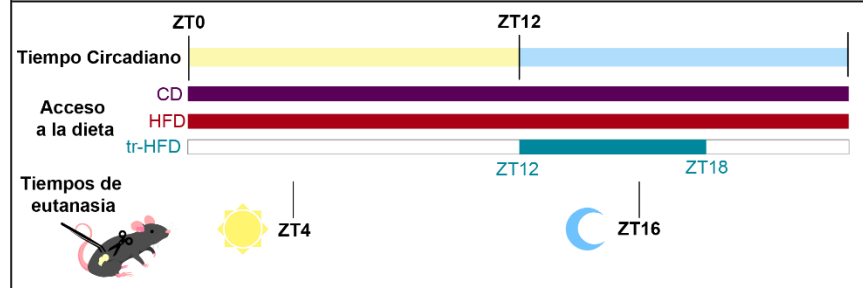
1. Implementar y caracterizar un modelo en ratón de diferentes estados metabólicos inducidos por señales nutricionales: Dieta control *ad libitum* (CD), Dieta alta en grasa *ad libitum* (HFD) y dieta alta en grasas restringida en tiempo, del ZT12 al ZT18 (tr-HFD).
2. Obtener un conjunto de datos en alta resolución que permitan estudiar la organización tridimensional del genoma en tejido adiposo blanco de ratones metabólicamente distintos en dos tiempos circadianos opuestos (ZT4 y ZT16) al generar bibliotecas de Hi-C *in situ*.
3. Analizar los procesos en la topología genómica dependiente del tiempo que impactan en la regulación transcripcional, como la asignación de compartimentos cromatínicos y la identificación diferencial de dominios topológicamente asociados al procesar de manera bioinformática los datos de Hi-C del grupo HFD.

VII. Metodología

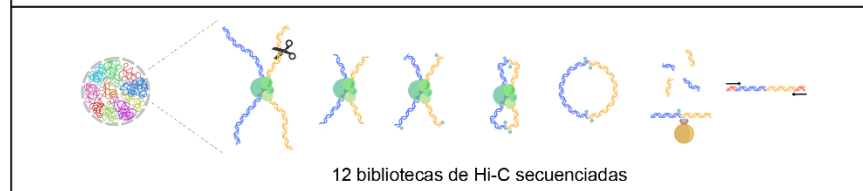
Generación y caracterización de modelos murinos bajo diferentes paradigmas de alimentación



Disección de WAT y fijación del tejido a dos tiempos circadianos opuestos



Estandarización y ejecución del protocolo de Hi-C *in situ*



Comparación temporal de la topología genómica del WAT de animales alimentados con HFD

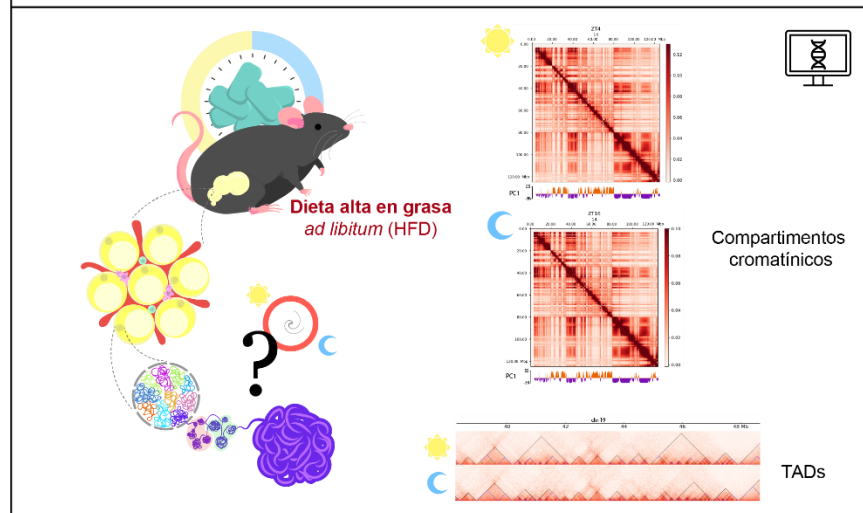


Figura 12. Esquema general de la metodología. En primer lugar, se generaron y caracterización de los modelos murinos. Posteriormente a la eutanasia de los animales a los tiempos de interés, se disectó y se fijó con formaldehído el WAT. Resultó crítica la estandarización del protocolo de Hi-C para WAT de las diferentes condiciones alimentarias así como el posterior análisis bioinformático del grupo HFD para establecer las herramientas de análisis.

1. Establecimiento y caracterización de los modelos biológicos

Paradigmas de alimentación y puntos de muestreo

A las 4 semanas de edad 90 ratones macho, cepa C57BL/6J, alojados en la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, son distribuidos en 3 grupos experimentales, con diferentes condiciones alimenticias:

1. Dieta control (Teklad 2018) *ad libitum*, CD.

n = 30

2. Dieta alta en grasa (Test Diet 58Y1, 60% de las kcal provenientes de lípidos) *ad libitum*, HFD.

n = 31

3. Dieta alta en grasa (Test Diet 58Y1, 60% de las kcal provenientes de lípidos) restringida en tiempo (ZT12-ZT18), tr-HFD.

n = 29

Para llevar a cabo la restricción se emplea un gabinete programable y automatizado para este fin (OMNIALVA®).

Se eligieron los tiempos ZT12 al ZT18 para la restricción de la alimentación ya que corresponden a una ventana de 6 horas durante la primera mitad del periodo de actividad de los ratones, la fase de oscuridad. En estudios en humanos se han reportado los mayores beneficios en un paradigma equivalente³⁰.

Los animales se mantienen bajo estos paradigmas de alimentación durante 12 semanas. Semanalmente se registra el peso de los animales, así como el alimento inicial y final de cada semana, con ello es posible estimar el consumo en gramos, en kcal y en kcal/peso del animal.

Al concluir la intervención se aplica eutanasia mediante dislocación cervical de los ratones a manera de que cada grupo este representado con una n=5 a los tiempos ZT0, ZT4, ZT8, ZT12, ZT16 y ZT20. De cada animal se extrae el tejido adiposo blanco epididimal (Referido en el texto sólo como WAT), hígado, tejido adiposo pardo, cerebro, páncreas, músculo esquelético y sangre para obtener suero de los animales. El conjunto completo de tejidos y tiempos circadianos serán relevantes para proyectos complementarios al presente proyecto de maestría.

De manera específica para este trabajo una porción de WAT de los ZT4 y ZT16 se utilizaron para fijación como parte del protocolo de preparación de bibliotecas de Hi-C, descrito más adelante. El resto de los tejidos son congelados con hielo seco y almacenados a -70°C. Se eligieron estos puntos temporales dado que el ZT16 coincide con el tiempo de alimentación de los animales bajo tr-HFD y es cercano a la mitad del periodo de oscuridad, por otro lado, el ZT4 es el tiempo opuesto al ZT16 y es cercano a la mitad del periodo de luz.

Pruebas metabólicas

Con la finalidad de caracterizar el estado metabólico de los modelos biológicos inducidos por las diferentes señales nutricionales se realizan pruebas de tolerancia a glucosa e insulina. Previamente se ha reportado que una dieta alta en grasa conduce a una tolerancia afectada tanto a la glucosa como a la insulina⁹⁹. Por otro lado, se espera que la restricción temporal de la alimentación mitigue estas alteraciones.

Las pruebas se realizan a las 0, 6 y 12 semanas de las intervenciones.

1. Prueba de tolerancia a glucosa

Para esta prueba se somete a los modelos biológicos a un ayuno de 12 horas, del ZT16 al ZT4.

Minutos antes de iniciar la prueba se pesa a los animales para calcular la glucosa a administrar, la dosis de glucosa es 2g/kg de peso.

Se emplea una solución 0.3g/ml de glucosa en solución salina, filtrada en condiciones de esterilidad, y la dosis se calcula multiplicando por el siguiente factor:

$$Dosis (\mu l) = Peso\ del\ ratón (g) * 6.66 (\mu l * g^{-1})$$

Igualmente, minutos previos a la prueba se mide la glucosa basal utilizando el equipo Accu-Check Active (Roche), obteniendo una pequeña gota de sangre mediante una incisión en la punta de la cola del ratón.

Al ZT4 se inicia con la prueba y se administra la dosis de glucosa determinada por vía intraperitoneal a cada ratón. Se realizan mediciones de glucosa a los 15, 30, 60 y 120 minutos posteriores a la administración.

2. Prueba de tolerancia a insulina

Para esta prueba se somete a los modelos biológicos a un ayuno de 4 horas, del ZT0 al ZT4.

Minutos antes de iniciar la prueba se pesa a los animales para calcular la insulina a administrar, la dosis de insulina es 0.6 UI/kg de peso.

Se emplea una dilución 1:1000 de insulina (Humulin Regular, HI-210) en solución salina, filtrada en condiciones de esterilidad y la dosis se calcula multiplicando por el siguiente factor:

$$\text{Dosis } (\mu\text{l}) = \text{Peso del ratón } (g) * 6 (\mu\text{l} * g^{-1})$$

Igualmente, minutos previos a la prueba se mide la glucosa basal utilizando el equipo Accu-Check Active (Roche), obteniendo una pequeña gota de sangre mediante una incisión en la punta de la cola del ratón.

Al ZT4 se inicia con la prueba y se administra la dosis de insulina determinada por vía intraperitoneal a cada ratón. Se realizan mediciones de glucosa a los 15, 30, 60 y 120 minutos posteriores a la administración.

Para ambas pruebas es necesario un periodo de ayuno con la finalidad de disminuir las fluctuaciones en los niveles de glucosa en sangre de los animales previamente a la prueba y partir así de niveles basales estables. Para el caso de la pruebas de tolerancia a la insulina el tiempo de ayuno es menor, ya que si los niveles de glucosa en sangre son muy bajos al administrar insulina se corre el riesgo de provocar hipoglucemia a los animales.

2. Preparación de bibliotecas de Hi-C

Fijación

Para poder recapitular las interacciones genómicas en el espacio tridimensional, a través de ensayos de captura conformacional de cromosomas, se lleva a cabo una fijación o entrecruzamiento con formaldehído que permita mantener la cromatina organizada de la misma manera en que se encontraba al momento de la fijación.

Una vez disecado el tejido adiposo este se mantiene en medio de cultivo DMEM frío y es cortado en fragmentos pequeños (aproximadamente, 2-3 mm³). Estos fragmentos de tejido son fijados en medio DMEM con formaldehído al 2%, en rotación, a temperatura ambiente, durante 10 min. La reacción de entrecruzamiento es detenida con glicina a una concentración final de 0.125 M durante 5 min. a temperatura ambiente y 10 min. en hielo, agitando ocasionalmente. Finalmente, el tejido es lavado con PBS para retirar el formaldehído, el tejido es congelado con hielo seco y almacenado a -70 °C.

Homogeneización y lisis

Con el objetivo de aislar y trabajar únicamente con núcleos celulares se realiza una homogeneización y lisis del tejido.

El tejido adiposo fijado es filtrado a través de un filtro de 70 µm, usando 1 ml de buffer de lisis adicionado con inhibidores de proteasas. El filtrado se lleva a un volumen de 5 ml y se transfiere a un homogeneizador (PYREX 7725). A partir de aquí comienzan a contarse 30 minutos y se homogeniza la muestra 20 veces, se deja pasar al menos un minuto y se homogeniza 20 veces más, para un total de 40 veces. El homogeneizado se mantiene en hielo hasta que transcurran los 30 minutos. El homogeneizado se centrifuga para precipitar los núcleos fijados y estos se lavan una vez con buffer de lisis y una vez más con NEBuffer 3.1 (NEB B7203S) 1.25x. Finalmente los núcleos se resuspenden en NEBuffer 3.1 1.25x para 1-4 alícuotas, dependiendo de la cantidad de material de entrada. Este paso se realiza para evitar que los núcleos se agreguen en pasos posteriores.

Permeabilización de los núcleos

Para poder llevar a cabo reacciones enzimáticas en el interior del núcleo es necesario permeabilizarlos.

A los núcleos en suspensión se agrega SDS al 10% para llegar a una concentración final de 0.3% de SDS. Los núcleos se incuban a 37 °C, en agitación constante de 750 rpm, durante 45 min.

Posteriormente, para "inactivar" el SDS, se agrega triton X-100 al 10% para llegar a una concentración final de triton X-100 1.6%, y se incuba bajo las mismas condiciones.

Una vez concluida la permeabilización los núcleos son precipitados por centrifugación

Digestión de la cromatina

La cromatina es fragmentada con endonucleasas tipo II, en este caso se utilizó a DpnII (NEB R0543M), cuyos productos de digestión van de 500 pb - 5 kb. Previo a la digestión se toma una alícuota como control sin digestión.

Los núcleos permeabilizados se incuban con 200 U a 37 °C, con agitación constante de 750 rpm, toda la noche. Al día siguiente se agregan otras 200 U, para un total de 400 U, bajo las mismas condiciones, durante 8 horas. La enzima es inactivada a 65 °C durante 20 min.

Se toma una alícuota como control posterior a la digestión, se revierte el entrecruzamiento y se verifica que la digestión haya sido exitosa corriendo el DNA en electroforesis en gel de agarosa.

Biotinilación de los extremos y *fill-in*

Con la finalidad de más adelante recuperar parejas de interacción entre regiones del genoma, los extremos cohesivos producto de la digestión de la cromatina son extendidos hasta formar extremos romos, a la vez que son marcados con dATP biotinilado.

A la reacción previa se agregan dCTP, dGTP, dTTP, biotin-14-dATP (Thermofisher 19524-016) y 50 U de DNA polimerasa I Large Fragment Klenow (NEB MO210L). La extensión transcurre a 37 °C, agitando 700 rpm durante 10s cada 30s.

Ligación in situ

Con el objetivo de generar fragmentos de DNA que contengan regiones del genoma que se encontraban cercanas en el espacio tridimensional se realiza una ligación por proximidad de los fragmentos de restricción dentro de los núcleos.

La ligación ocurre en un volumen de 1 ml y requiere de Buffer para T4 DNA Ligasa, con ATP (NEB B0202S), BSA (NEB B900S), 50U T4 DNA Ligasa (Thermofisher ELO011). La reacción se lleva a cabo a 16 °C, durante toda la noche, sin agitación.

Se toma una alícuota del material ligado, se revierte el entrecruzamiento y se verifica que la ligación haya sido exitosa corriendo el DNA en electroforesis en gel de agarosa, debe observarse un aumento en fragmentos de alto peso molecular.

Una vez verificada la eficacia de la ligación se realiza una reversión del entrecruzamiento de todo el material seguido de una purificación de DNA mediante fenol cloroformo, y finalmente cuantificación de este.

Controles de eficiencia de ligación

A manera de estimar que la ligación ocurrió según lo esperado y que el material ligado recapitula interacciones de largo alcance se realizan controles mediante PCR punto final, denominados control interno y control de largo alcance.

El control interno consiste en una amplificación con oligonucleótidos diseñados en la misma orientación para alinearse sobre dos fragmentos de restricción adyacentes. En un templado genómico intacto no ocurre la amplificación dado que los oligonucleótidos hibridan en el mismo sentido, sin embargo, al digerir el genoma y ligarlo, con cierta probabilidad uno de los fragmentos de restricción queda invertido con respecto al otro y por lo tanto los oligonucleótidos ahora son convergentes y al utilizar como templado el material de HiC se obtiene un amplicón de peso molecular esperado.

Para el control de largo alcance se diseñan oligonucleótidos sobre fragmentos de restricción a 1.5 Mb de distancia, que recapitula interacciones en locus de histonas que se espera se conserven entre diferentes tipos celulares. De igual manera no ocurre amplificación en un templado genómico intacto, sino que sólo se obtendrá un amplicón si la ligación de fragmentos de restricción se encontraba cercanos en el espacio tridimensional ocurrió, por lo tanto, se logrará obtener un amplicón de tamaño molecular esperado.

Eficacia de incorporación de biotina

Adicionalmente con los amplicones del control interno y control de largo alcance es posible estimar la eficacia de la incorporación de biotina. Ya que si el *fill-in* ocurrió eficazmente al ligarse los dos sitios de corte para DpnII se genera un nuevo sitio de restricción para la enzima de restricción ClaI. Los amplicones son digeridos con 10U de ClaI, se espera una digestión del 100%.

Sonicación

Para continuar con la preparación de las bibliotecas es necesario fragmentar las moléculas circulares del material de HiC a modo de obtener moléculas lineales, esto se obtiene mediante sonicación en equipo COVARIS. Adicionalmente dado que se trata de una fragmentación mecánica al azar, en este paso se confiere la complejidad necesaria a las moléculas para poder recapitular interacciones genómicas posterior a la secuenciación.

Remoción de biotina de fragmentos no ligados/ Reparación de DNA

Algunos fragmentos biotinilados no están ligados a otro fragmento de restricción. Para evitar precipitar estas secuencias no informativas de interacciones, el dATP biotinilado es removido de estos extremos no ligados usando la actividad de exonucleasa de la T4 DNA polimerasa (NEB M0203S).

Se agregan dATP, buffer de ligación con ATP y 15U de T4 DNA Polimerasa, la reacción se incuba a 20 °C, durante 30 min.

Posteriormente se repara el DNA fosforilando los extremos 5' del DNA mediante la actividad de la T4 Polinucleótido Cinasa (NEB M0201L).

Se agregan mezcla de desoxinucleótidos, buffer de ligación con ATP y 10U de T4 Polinucleótido Cinasa, la reacción se incuba a 20 °C, durante 30 min.

Selección de tamaños de las moléculas

Para que las moléculas tengan un tamaño apropiado para secuenciación se realiza una selección dual de tamaños con *SPRI beads* (SPRI son siglas para *Solid Phase Reversible Immobilization*) para recuperar sólo las moléculas de entre 250 y 700 pb (en su mayoría 250-550 pb).

Pull-Down de biotina

Con el objetivo de recuperar las moléculas que contienen parejas de interacción producto de la ligación se hace una precipitación de las moléculas biotiniladas con estreptavidina acoplada a perlas magnéticas, Dynabeads My One Streptavidin C1 (ThermoFisher 65001).

El material de HiC se incuba durante 30 minutos para permitir la unión de las moléculas biotiniladas a las perlas con estreptavidina, para eliminar las uniones inespecíficas se hacen una serie de lavados.

Previo a la ligación de los adaptadores es necesario realizar un paso de *A-tailing* a las moléculas precipitadas en el *pull-down* de biotina. Para ello se agrega NEBuffer, dATP y el 25U de fragmento Klenow (3'→5' exo-) (NEB M0212L), 37 °C durante 30 min.

Ligación de adaptadores

Con la finalidad de generar las bibliotecas e indexarlas para poder distinguir su origen posterior a la secuenciación, a las moléculas precipitadas les son ligados adaptadores del sistema TruSeq de Illumina. Estos adaptadores se ligan durante 2 horas a temperatura ambiente utilizando 15U de DNA ligasa. Después de la ligación y una serie de lavados, las perlas acopladas a las moléculas con material

de Hi-C son resuspendidas en un volumen final de 40 μ l (más el volumen de las perlas quedan aproximadamente 50 μ l de material de Hi-C).

Pruebas para amplificación de las bibliotecas

Para la generación de las bibliotecas es necesario amplificar el material acoplado a las perlas mediante ciclos de PCR con oligonucleótidos específicos del sistema TruSeq, los productos de dicha PCR son las moléculas con las características necesarias para llevar a cabo la secuenciación que constituirán la biblioteca.

Para determinar el número de ciclos con los que se amplificará cada biblioteca se corren 4 reacciones de PCR punto final de 25 μ l, con 5, 6, 7 y 8 ciclos. Para estas reacciones es necesario utilizar una DNA polimerasa de alta fidelidad, en este caso se utilizó la DNA Polimerasa NEBPhusion (NEB M0530S). Se corren 20 μ l de cada reacción en electroforesis de agarosa y para la amplificación final se elige un número de ciclos anterior al ciclo en el que los productos de PCR sean visibles en el gel de agarosa (se espera un barrido centrado entre 400 y 600 pb).

Validación del material de Hi-C de la biblioteca

Para verificar que las secuencias que componen la biblioteca de Hi-C consisten en fragmentos biotinilados y ligados se amplifica durante 35-40 ciclos una porción de la biblioteca para realizar una digestión con Clal. Esta porción puede provenir de una reamplificación del punto anterior o de la biblioteca final. Una vez amplificada la biblioteca, la mitad de la reacción se digiere con 10U de Clal, a 37 °C durante al menos 4 horas. Posteriormente tanto el control sin digerir como el material digerido con Clal se corren en una electroforesis de gel de agarosa, se espera obtener una mayor cantidad de moléculas de peso molecular menor a 500 pb posterior a la digestión.

Amplificación final de las bibliotecas

Con el objetivo de amplificar la máxima cantidad de secuencias y no sólo las más representadas, se realizan 8 reacciones de PCR de 50 μ l, distribuyendo de manera equivalente los 40 μ l de material de Hi-C restante, y se amplifican con el número de ciclos determinados en el punto anterior.

Una vez transcurrida la PCR se juntan las 8 reacciones. Las perlas acopladas a estreptavidina se separan del sobrenadante y se conservan en 40 μ l de NEBuffer 2. Por otra parte, los productos de PCR (bibliotecas de HiC) son purificadas del sobrenadante utilizando 1-1.8x de SPRI beads, este paso es muy importante también para la remoción de los oligonucleótidos usados para la amplificación. Las

bibliotecas se eluyen en 42 μ l de TLE y se utilizan 2 μ l para cuantificar las bibliotecas en equipo Qubit (Thermofisher) para cuantificar DNA bicatenario con alta sensibilidad.

Finalmente se verifica que la distribución de las secuencias sea adecuada en TapeStation 2200 (Agilent Technologies).

Para llevar a cabo la secuenciación de las bibliotecas se envían 20 μ l a una concentración de 3nM para obtener aproximadamente 440 millones de lecturas pareadas por muestra.

3. Análisis Bioinformático de datos de Hi-C

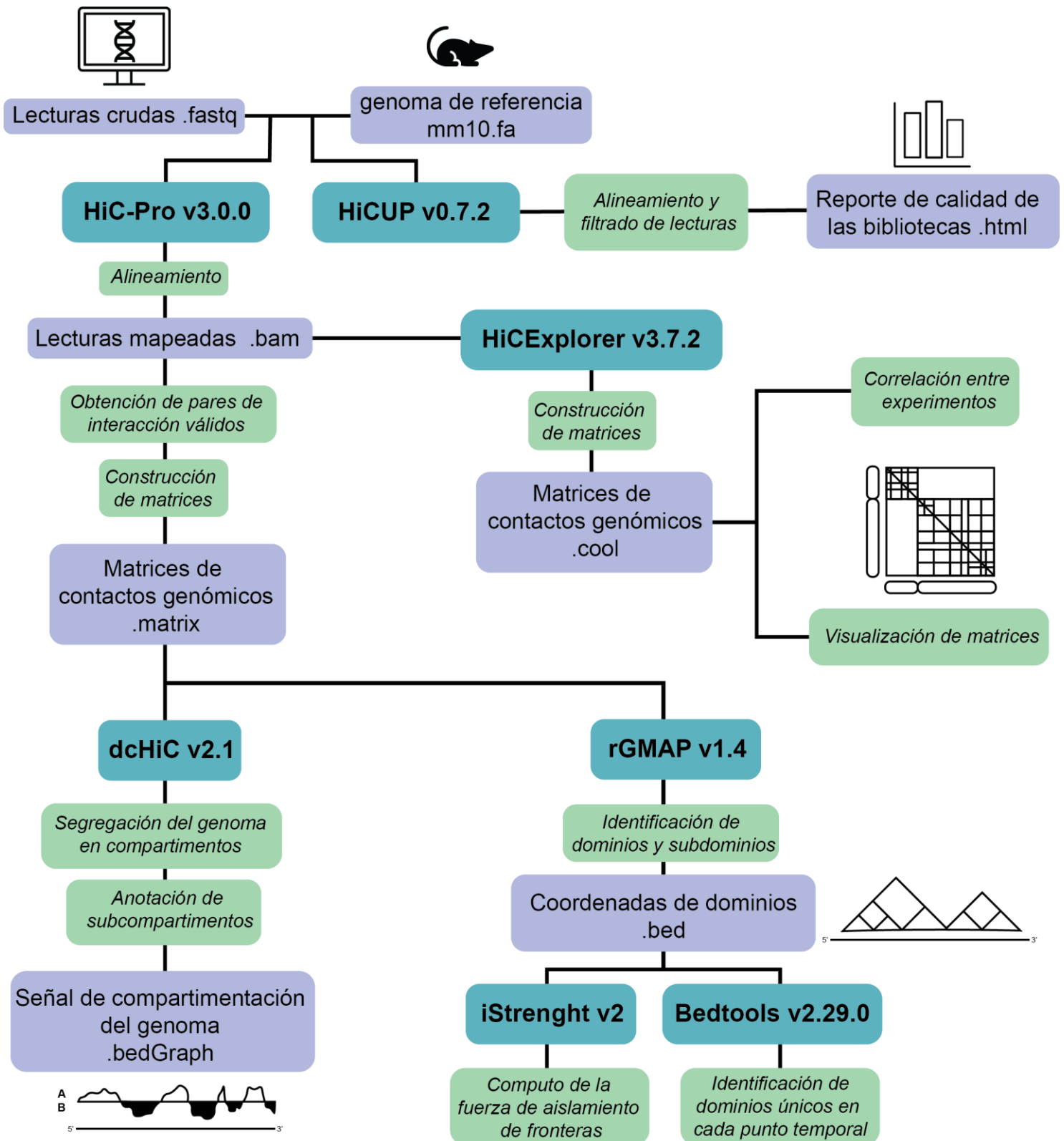


Figura 13. Diagrama de flujo del análisis bioinformático de los datos. En color morado se muestran los archivos obtenidos, en color azul los algoritmos o pipelines empleados y en verde los procesos realizados.

Una vez realizada la secuenciación de las bibliotecas de Hi-C se obtienen archivos .fastq pareados, sobre los cuales trabajar el análisis bioinformático. Este involucra el alineamiento de las secuencias al genoma de referencia, el filtraje de secuencias que no son informativas de contactos genómicos, así como duplicas de PCR y la generación de matrices de contactos genómicos. A partir de estas matrices se obtiene información de la organización 3D del genoma a diferentes escalas tales como los compartimentos o los TADs.

Para todos los análisis se utilizó la versión del genoma de referencia mm10 y considerando sólo los 19 autosomas del genoma del ratón más el cromosoma sexual X. No se consideró al cromosoma Y para los análisis ya que su pequeño tamaño y la poca cobertura que recibe ha mostrado una alta incidencia de falsos positivos en análisis bioinformáticos.

Alineamiento y obtención de pares válidos de interacción

Para llevar a cabo el alineamiento y filtraje propio de un experimento de Hi-C, se han empleado los pipelines de HiCUP¹⁰⁰ (v0.7.2) y HiC-Pro¹⁰¹ (v3.0.0). Ambos pipelines utilizan Bowtie2¹⁰² (v2.3.5) para realizar el alineamiento de las secuencias al genoma de referencia. De igual modo, ambos pipelines reportan el número de lecturas que se obtienen en cada paso de la obtención de los pares válidos de interacciones genómicas y muestran una coherencia en los números obtenidos.

Generación de matrices de contactos genómicos

Una vez realizado el mapeo se obtienen matrices de contactos entre las regiones del genoma. Esto se lleva a cabo como parte del mismo pipeline de HiC-Pro para obtener matrices a 10kb, 50kb y 100kb en formato *sparse* con la extensión .matrix y que sirve de input para análisis posteriores. Sin embargo, también se empleó el algoritmo de HiCEXplorer¹⁰³ (v3.7.2) para construir matrices a partir de los archivos .bam producto del alineamiento obtenido con el pipeline HiC-Pro para generar matrices en formato .cool que se emplean para análisis realizados con esta suite.

Se realizaron en este punto pruebas sobre los datos contenidos en las matrices como correlación entre las réplicas biológicas y controles de experimentos de Hi-C, en los que la probabilidad de contactos disminuye como función de la distancia. Estas pruebas se llevaron a cabo con HiCEXplorer.

Segregación del genoma en compartimentos

Para explorar cambios en la organización tridimensional del genoma dependientes del momento del día se decidió explorar los cambios a nivel de compartimentos activos (A) e inactivos (B).

Se utilizaron las matrices generadas con HiC-Pro a una resolución de 100kb y se utilizó el pipeline dHiC¹⁰⁴ (v2.1) que está dedicado a resolver la segregación del genoma en compartimentos a través de un análisis de componentes principales, PCA. Los compartimentos obtenidos se orientan con base en la densidad de genes y el contenido de CGs. A través de mediciones de distancia multivariadas se identifican cambios significativos entre la compartimentación de al menos dos condiciones pudiendo estar representadas por más de una réplica biológica. Adicionalmente se puede realizar un análisis que infiere de subcompartimentos definidos por la amplitud del eigenvalor.

A manera de confirmación y para la visualización se utilizó también las utilidades de la suite HiCExplorer para realizar un PCA sobre las matrices de contacto a 100 kb, y utilizando como semilla para orientar los compartimentos datos de expresión para tejido adiposo de animales alimentados con dieta alta en grasas¹⁰⁵.

Identificación de dominios topológicos y subdominios

Explorando un siguiente nivel de organización del genoma se logró identificar TADs y subdominios anidados dentro de estos. Para llevar a cabo esta identificación se empleó el algoritmo rGMAP¹⁰⁶ (versión 1.4) que utiliza un modelo Gaussiano que considera las interacciones dentro (intra-dominio) y fuera de los dominios (inter-dominio). El algoritmo define las fronteras de los dominios topológicos al evaluar si cada *bin* del genoma se localiza en la frontera de bloques densos en contactos. Para este fin se realiza una prueba de proporción que comparara el conteo de contactos intra-dominio observados y los compara entre las ventanas que flanquean ese *bin*. Finalmente, los dominios se definen basándose en la localización y orientación de las fronteras candidatas.

El input de rGMAP son matrices en formato *sparse* generadas con HiC-Pro. Para la búsqueda de dominios se emplearon matrices a una resolución de 10 kb, con la información de ambas réplicas biológicas para lograr alcanzar esta resolución soportada por un mayor número de lecturas. Por otro lado, el output son archivos tipo BED con las coordenadas de inicio y fin de los dominios, de tres órdenes definidos por su jerarquía de anidamiento, siendo los de orden uno los que no se encuentran

anidados, los de orden dos anidados dentro de estos y los de orden tres contenidos dentro de los otros dos.

Se realizó un análisis para caracterizar estos dominios y los subdominios contenidos en ellos que responde si la capacidad de aislamiento en los dominios cambia de manera dependiente al tiempo del día y entre los diferentes órdenes de dominios. Esto se llevó a cabo con un script nombrado iStrenght (v.2), desarrollado en el laboratorio por el M. en C Oscar Amaury Aguilar Lomas. Este script calcula un score del aislamiento considerando qué tantas interacciones intradominio existen, en oposición a las interacciones río arriba y río debajo de los dominios identificados por rGMAP, y utiliza un formato de matrices denominado *dense* que se puede obtener a partir de las matrices *sparse* generadas con HiC-Pro con scripts incluidos como utilidades en este mismo pipeline.

Para finalizar, utilizando los archivos en formato BED con las coordenadas de los dominios identificados con rGMAP, se realizó una comparación entre los dominios de ambas condiciones utilizando la herramienta BEDTools¹⁰⁷ (v2.29.0). Se tomo una ventana de 50kb alrededor de las fronteras en para comparar los TADs identificados para cada momento del día. Con la información de los dominios diferenciales entre tiempos circadianos se realizó un análisis de enriquecimiento funcional con base en los genes ahí contenidos, utilizando gProfiler¹⁰⁸ (versión e108_eg55_p17_0254fbf).

VIII. Resultados

1. Distintas señales nutricionales producen estados metabólicos específicos en un modelo murino de alimentación restringida en tiempo.

A partir de la implementación de los paradigmas de alimentación descritos en la sección de métodos, se monitoreó el peso de los ratones de forma semanal (**Figura 14A**). Los grupos se comportaron de acuerdo con lo esperado, en términos de peso de los animales hubo diferencias significativas para el grupo de dieta alta en grasa *ad libitum* contra los otros dos grupos en los que se esperaba una mejor aptitud metabólica, mientras que el grupo de dieta alta en grasa restringida en tiempo se mantuvo más cercano al grupo de dieta control. La n para cada grupo es la siguiente, CD=30, HFD=31, tr-HFD=29, se realizó una prueba de ANOVA de dos vías y Tukey post hoc para comparaciones múltiples.

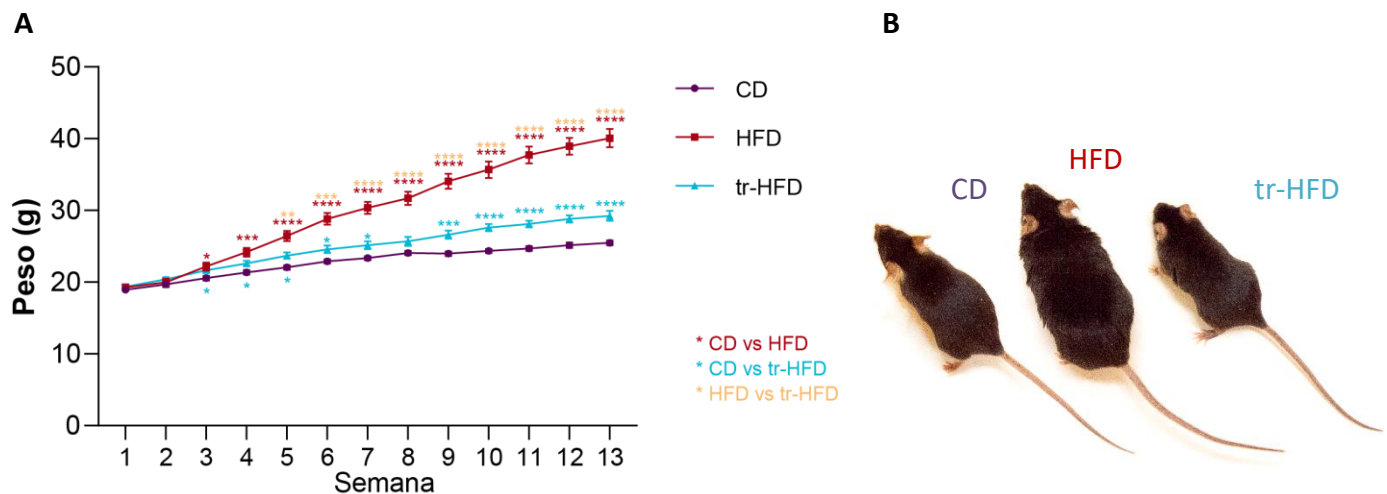


Figura 14. Seguimiento semanal del peso durante las 12 semanas de intervención para los tres grupos: Dieta control *ad libitum* (CD), Dieta alta en grasa *ad libitum* (HFD) y dieta alta en grasa restringida en tiempo (tr-HFD) **A**. Se grafica el promedio + SEM (n=30 grupo CD, n=31 grupo HFD, n=29 grupo tr-HFD), * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001. Fotografía ilustrativa de los modelos de cada grupo **B**.

La ingesta de alimento de los ratones se obtuvo midiendo el consumo semanal en kcal promedio de cada grupo durante las 12 semanas de intervención (**Figura 15A**). El consumo en kcal muestra que los animales del grupo HFD consumen una mayor cantidad de calorías en comparación con

los otros dos grupos. Sin embargo, este aumento se puede explicar debido al incremento en peso de los animales. Por ello se realizó una normalización con el peso de los animales (**Figura 15B**). En este caso el consumo promedio indica que el consumo energético de los animales en función de su peso fue el mismo entre los grupos. Para los datos promedio de las 12 semanas se realizaron pruebas de ANOVA de una vía y Tukey post hoc para comparaciones múltiples. La n es la misma que para los datos del peso de los animales.

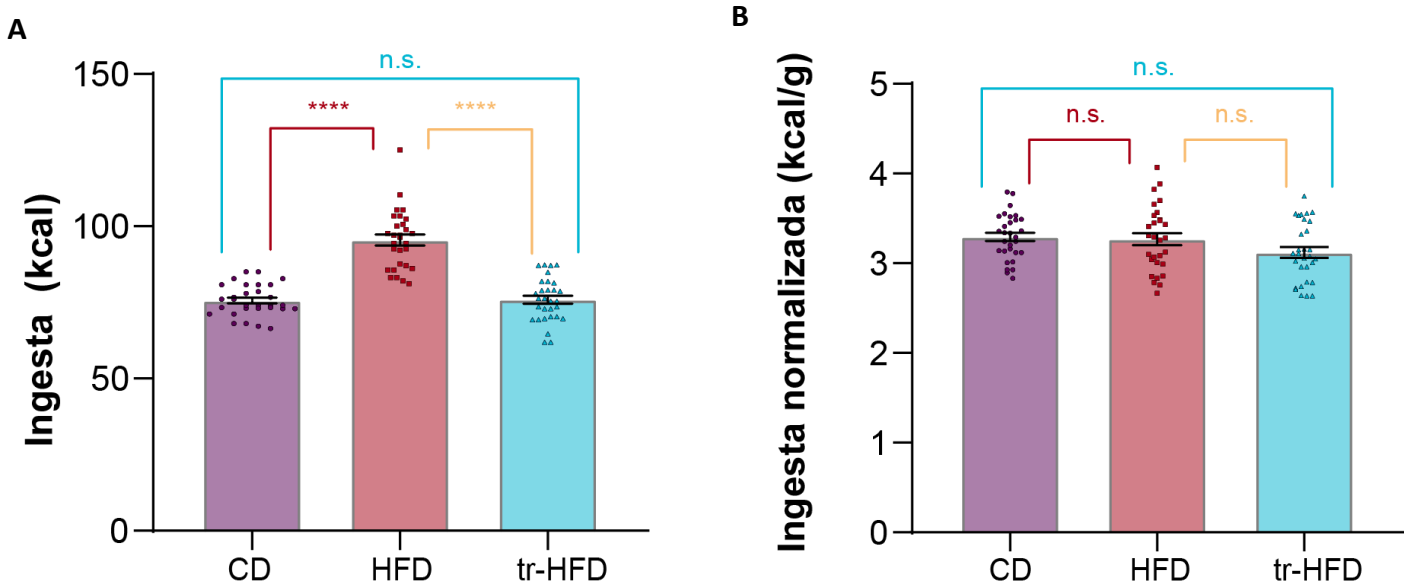


Figura 15. Ingesta promedio de las 12 semanas por grupo. Datos en kcal totales **A** y para kcal normalizadas por el peso de los animales **B**. Se grafica el promedio + SEM (n=30 grupo CD, n=31 grupo HFD, n=29 grupo tr-HFD), **** p<0.0001

Estos datos indican que los animales del grupo tr-HFD consumen la misma cantidad de kcal en función de su peso y sin embargo no aumentan de peso como sí lo hacen los animales en el grupo HFD. Estos hallazgos sugieren que la restricción temporal de la alimentación tiene como consecuencia que los animales son metabólicamente distintos y aprovechan de un modo más óptimo la energía consumida en la dieta a modo que no contribuya a una ganancia de peso, característica que correlaciona con un estado patológico. También se sugiere que este estado metabólico óptimo puede deberse al alineamiento de la ingesta con otros ritmos circadianos, como la secreción de hormonas, acrofases en la abundancia de enzimas metabólicas y cascadas de señalización celular, fluctuaciones en la temperatura y actividad.

Para confirmar el estado metabólico de los animales en los distintos paradigmas de alimentación se realizaron pruebas metabólicas de tolerancia a glucosa (**Figura 16**) y a insulina (**Figura17**), al inicio (semana 0), a la mitad (semana 6) y al final (semana 12) de la intervención.

Prueba de Tolerancia a Glucosa

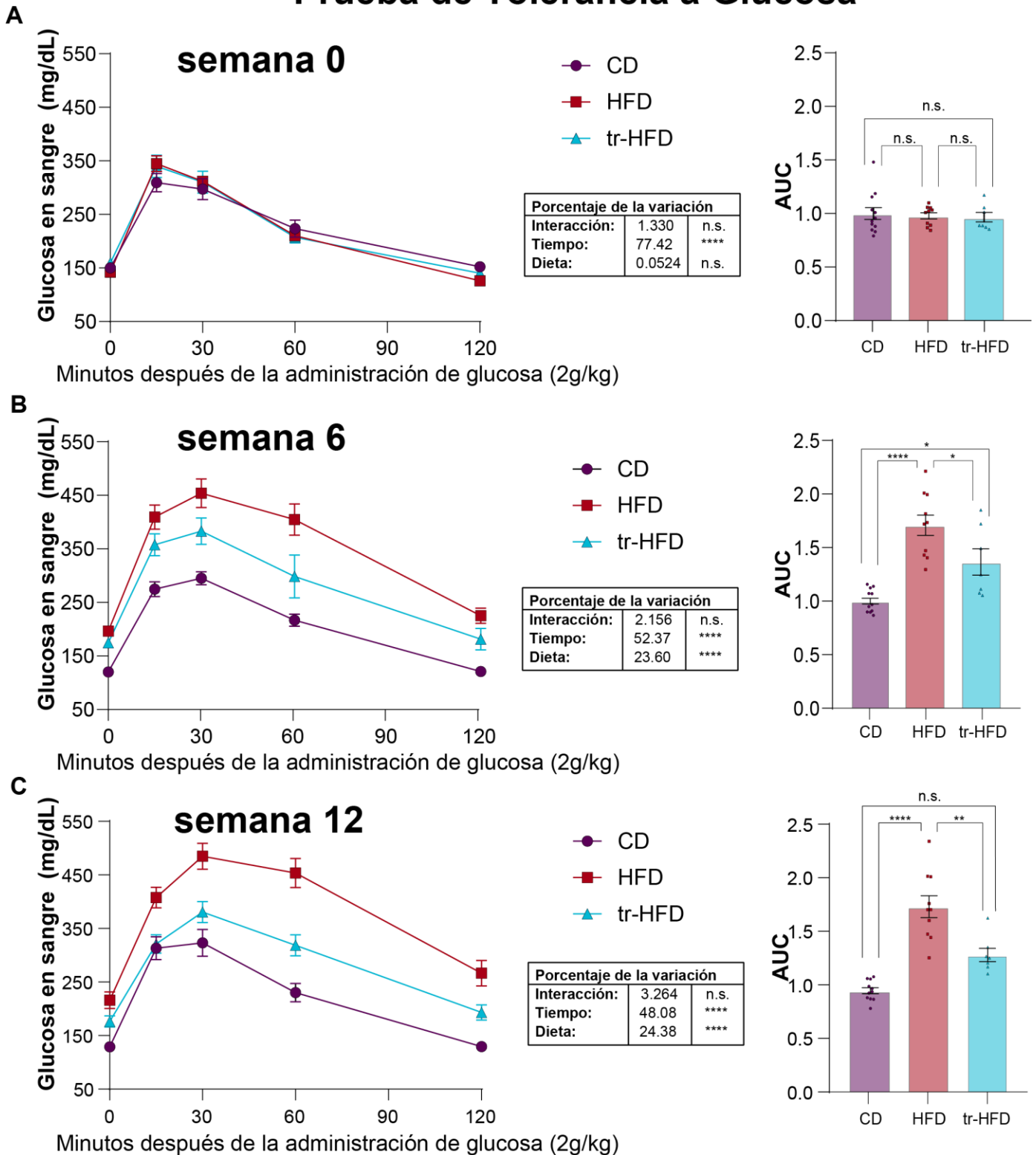


Figura 16. Curvas de tolerancia a glucosa junto con su correspondiente análisis de área bajo la curva (AUC) a la semana 0 **A**, semana 6 **B** y semana 12 **C**. Se grafica el promedio + SEM (n=12 grupo CD, n=10 grupo HFD, n=7 grupo tr-HFD), * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001

Prueba de Tolerancia a Insulina

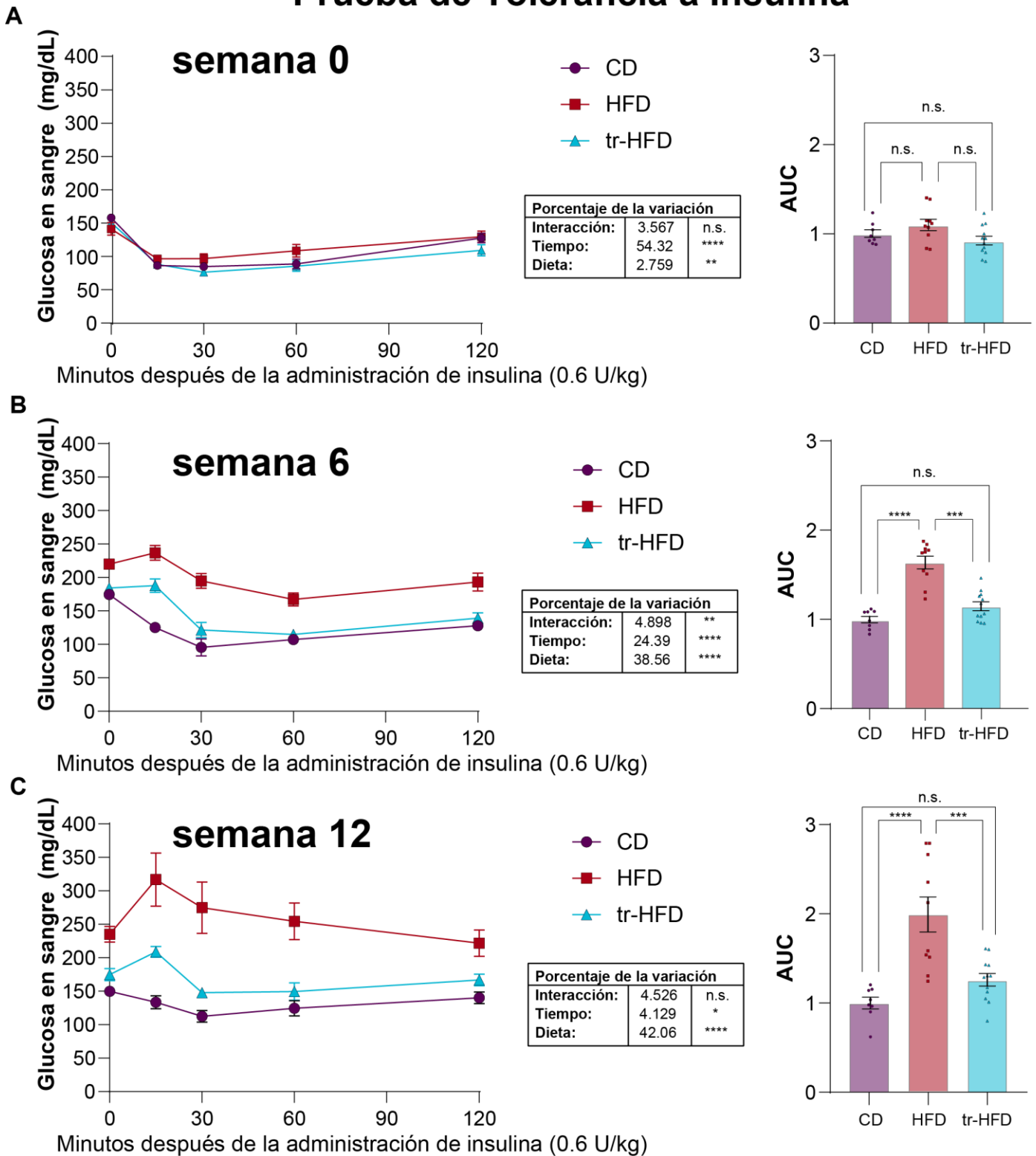


Figura 17. Curvas de tolerancia a insulina junto con su correspondiente análisis de área bajo la curva (AUC) a la semana 0 **A**, semana 6 **B** y semana 12 **C**. Se grafica el promedio + SEM (n=8 grupo CD, n=10 grupo HFD, n=12 grupo tr-HFD). * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001

Para ambas pruebas se observó el patrón esperado, en el que a la semana 0 los grupos respondieron de manera equivalente siempre volviendo a las condiciones basales, signo de una correcta homeostasis. Desde la semana 6 el grupo HFD comenzó a mostrar niveles de glucosa en sangre más altos, así como patrones alterados de la curva en la prueba de tolerancia a insulina, ambos indicadores de un metabolismo de glucosa disfuncional.

En el caso de los animales del grupo tr-HFD se observaron niveles de glucosa en sangre más similares al grupo control habiendo diferencias significativas en las áreas bajo la curva únicamente durante la semana 6 para la prueba de tolerancia a glucosa, sin embargo, esta diferencia se revirtió para la semana 12. Este resultado apunta a un perfil prediabético en los grupos HFD y tr-HFD, que se revierte a una tolerancia normal a la glucosa a las 12 semanas debido a los efectos protectores de la restricción temporal de la alimentación en el grupo tr-HFD. Entre los efectos benéficos descritos de la intervención que explican este perfil es la limitación en la acumulación de grasa, hipertrofia y disfunción de los adipocitos, así como la liberación de moléculas como ácidos grasos libres que pueden conducir a disfunción y apoptosis de células β del páncreas¹⁰⁹.

Resulta interesante que pese a mostrar niveles de glucosa similares al grupo control el patrón de la curva de tolerancia a insulina del grupo tr-HFD es más parecido al grupo HFD, por lo que dicho aumento en los niveles de glucosa en sangre durante los primeros 15 minutos a la administración de insulina se mantiene pese a mostrar una mejor respuesta al concluir con la prueba. Esto sugiere que puede existir algún tipo de alteración en el metabolismo de la glucosa y homeostasis energética pese a la aptitud metabólica general alcanzada por la restricción temporal de la alimentación.

Para los análisis estadísticos se determinó el porcentaje de la variación a través de una prueba de ANOVA de dos vías y Tukey post hoc. Para determinar las diferencias significativas en los conteos de AUC se realizó una prueba de ANOVA de una vía y Tukey post hoc para comparaciones múltiples. Se realizaron las pruebas con una n de 7-12 animales, indicados en cada caso en el pie de figura.

Este conjunto de resultados permite concluir que se logró generar de manera exitosa modelos murinos metabólicamente distintos a través de distintas señales nutricionales, composición de la dieta y tiempo de alimentación.

2. Establecimiento de protocolo de Hi-C en tejido adiposo blanco de animales alimentados bajo distintos paradigmas, ZT4 y ZT16

Una vez contando con tejido adiposo blanco, de los animales de todos los grupos experimentales se procedió a implementar y estandarizar el protocolo de Hi-C comenzando por dos réplicas biológicas para el ZT4 y dos réplicas biológicas para el ZT16 de los animales sujetos a HFD. Al tener el protocolo de Hi-C estandarizado para este tejido se realizó el protocolo para los paradigmas tr-HFD y CD, igualmente con dos réplicas biológicas por punto temporal.

A lo largo del protocolo de Hi-C se llevan a cabo controles para verificar la eficiencia de distintos pasos reflejando la calidad del experimento. Un primer control consiste en verificar que la cromatina se digiere adecuadamente con la enzima de restricción escogida, lo cual se observa como un barrido de fragmentos de diferentes pesos moleculares (en nuestro caso se espera un barrido de moléculas centradas entre 500 y 1000 pares de bases) tras una electroforesis en gel de agarosa. De la misma manera se verifica que la ligación sea eficiente ya que las moléculas en el barrido deben aumentar de tamaño al ligarse (**Figura 18**).

Como puede observarse en la Figura 18, en todos los grupos la cromatina se digirió eficazmente con la enzima DpnII. Respecto a la ligación en general se obtuvo una ligación eficiente recuperando una banda de alto peso molecular. En donde se observó una ligación un poco menos eficiente en las muestras CD ZT16 réplica 2 y en HFD ZT4 réplica 2, sin embargo, la ligación es suficiente para continuar con los experimentos.

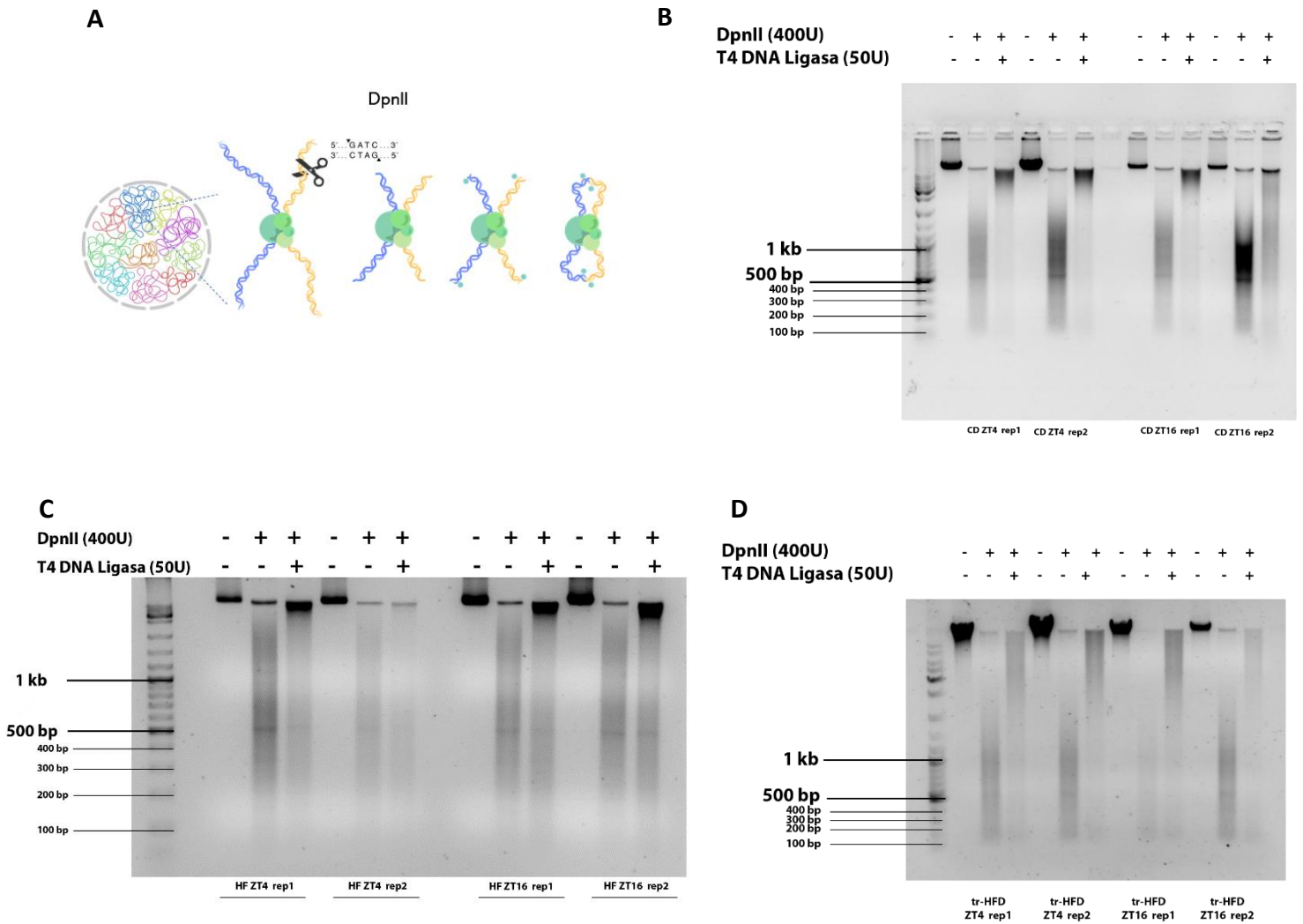


Figura 18. A Esquematzación de los primeros pasos del protocolo de Hi-C, que implica digestión del genoma con DpnII, extensión de los fragmentos cohesivos y marcaje con biotina (esquematzada como puntos azules) y ligación con DNA ligasa T4. Electroforesis en gel de agarosa de material no digerido, digerido con DpnII (en todos los casos ocurrió al 100%, la banda de alto peso molecular corresponde a regiones repetidas sin sitio de corte para DpnII en el genoma de ratón) y ligado con DNA ligasa T4 (es difícil determinar el porcentaje exacto de ligación, pero en todos casos es suficiente para continuar el experimento). Los geles corresponden a las muestras del grupo CD **B**, HFD **C** y tr-HFD **D**.

Para validar que el material recuperado en efecto recapitule las interacciones entre regiones del genoma se realizaron PCRs en punto final para amplificar interacciones conocidas. Una de ellas es de largo alcance (se trata de una interacción validada entre los *clusters* de genes de histonas separados por 1.5 Mb). Adicionalmente, para corroborar la eficiencia de obtención de productos de Hi-C (es decir, biotinilados y ligados correctamente), se realizó una digestión con la enzima Clal de los productos de interacción. Al digerir con DpnII al genoma, rellenar con nucleótidos y ligar los

extremos romos se genera un nuevo sitio de corte para esta enzima. Por lo cual la proporción de moléculas digeridas con *Clal* refleja qué tan eficiente fue el proceso de rellenado y ligación (**Figura 19**).

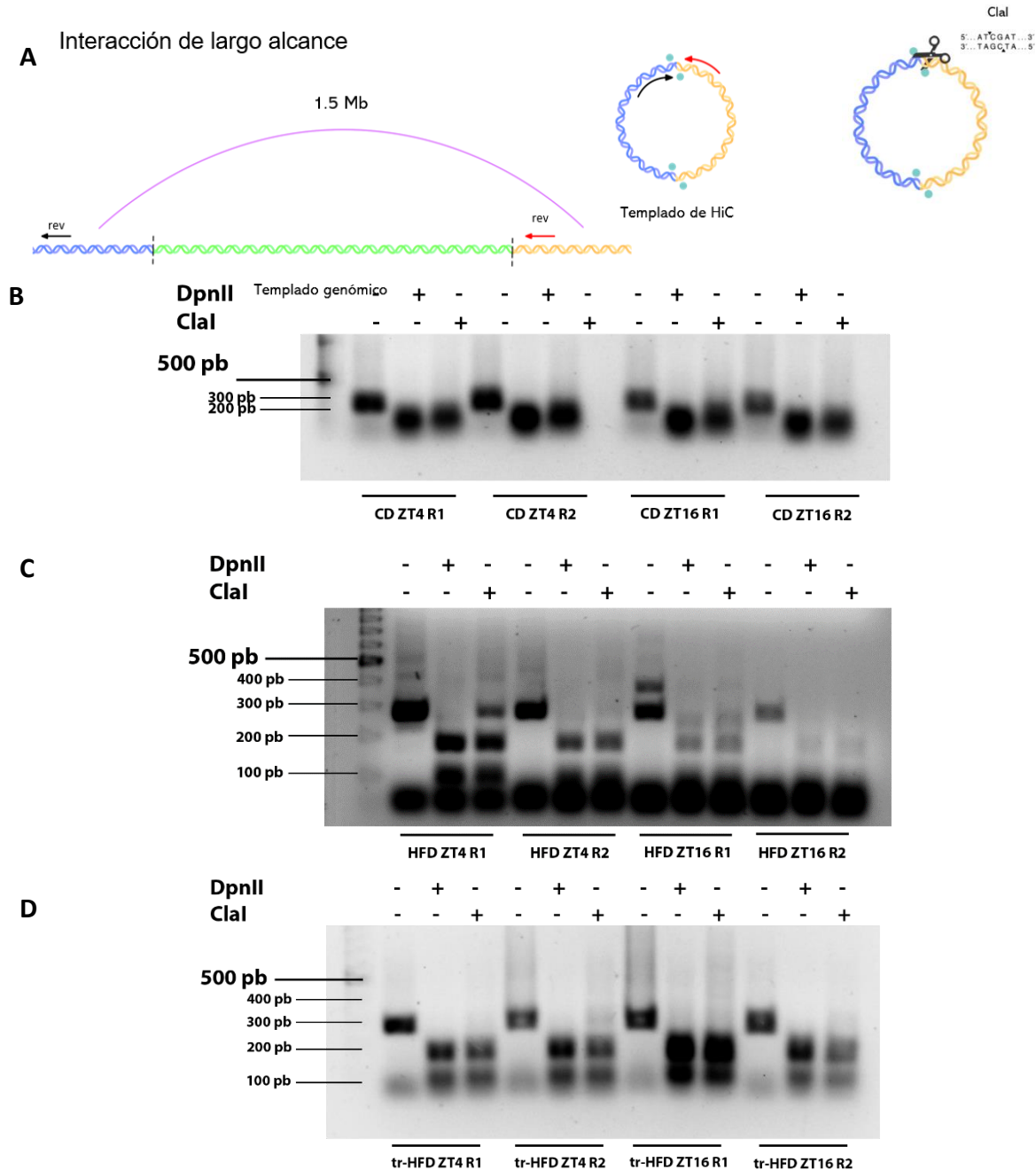


Figura 19. Esquematación del control de ligación mediante PCRs, los oligonucleótidos se representan con flechas. Se muestra el contexto genómico en el cual no hay amplificación y el contexto de los templados de HiC donde sí ocurre la amplificación (Por simplicidad se muestran templados de Hi-C con

sólo dos fragmentos, sin embargo, los templados de Hi-C pueden ser producto de la ligación de varios fragmentos). Se esquematiza también la digestión de los amplicones con el nuevo sitio de restricción formado para Clal **A**. Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones para el control interno y la interacción de largo alcance no digeridos, digeridos con DpnII (en todos los casos del 100%) y con Clal (al 100%, excepto en el HFD ZT4 rep1, en el que ocurrió al 84.4%). Geles para los grupos CD **B**, HFD **C** y tr-HFD **D**.

Los amplicones de los controles de ligación se digirieron en su totalidad con DpnII y con Clal, con excepción de la HFD ZT4 réplica 1, sin embargo, en esta muestra sí ocurrió la digestión con Clal en cierta proporción. Lo que indica que la incorporación de la biotina fue, en términos generales, eficiente. Con estos resultados se decidió proseguir con el experimento.

Una vez determinado que el material recapitulara interacciones de largo alcance y que la incorporación de biotina ocurrió con eficiencia, los templados quiméricos se sonicaron en un instrumento COVARIS (**Figura 20A**). Posteriormente se realizó la remoción de biotina de los fragmentos no ligados, reparación del DNA, selección de tamaños con SPRI (*Solid Phase Reversible Immobilization*) beads. Finalmente se continuó a la precipitación con perlas acopladas a estreptavidina del material biotinilado, que corresponde a pares de interacción (**Figura 20E**).

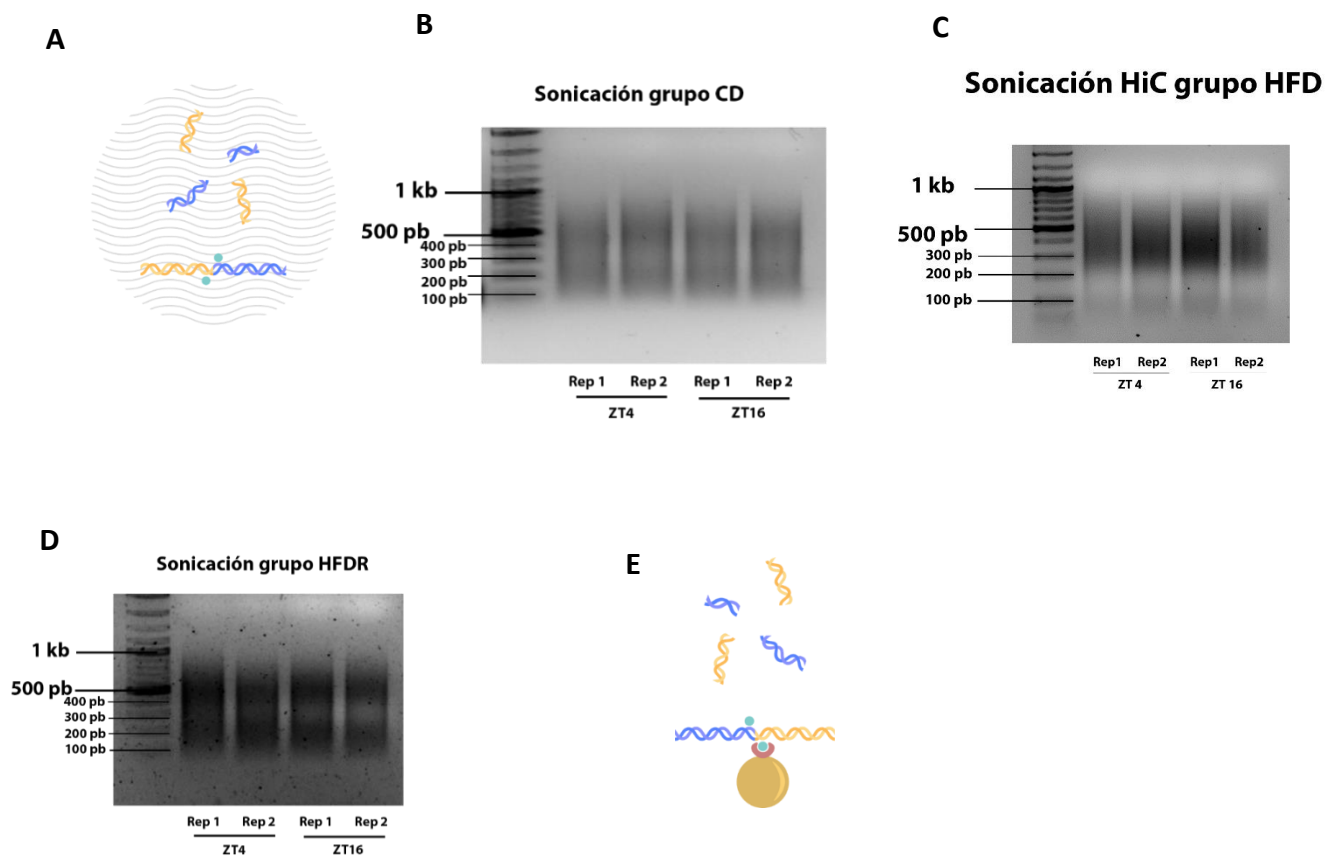


Figura 20. Esquematación de la fragmentación mecánica de los templates de Hi-C mediante sonicación **A**. Electroforesis en gel de agarosa del material de Hi-C después de la sonicación para los grupos CD **B**, HFD **C** y tr-HFD **D**. Esquematación de la precipitación de las parejas de interacción con perlas acopladas a estreptavidina **E**.

Posterior a la precipitación del material biotinilado a las secuencias se les ligaron adaptadores para indexado y secuenciación pareada del sistema TruSeq de Illumina. Se realizaron PCRs de prueba de ciclos para amplificar las bibliotecas de Hi-C (**Figura 21**) para determinar el número de ciclos a dar para la amplificación final de cada biblioteca.

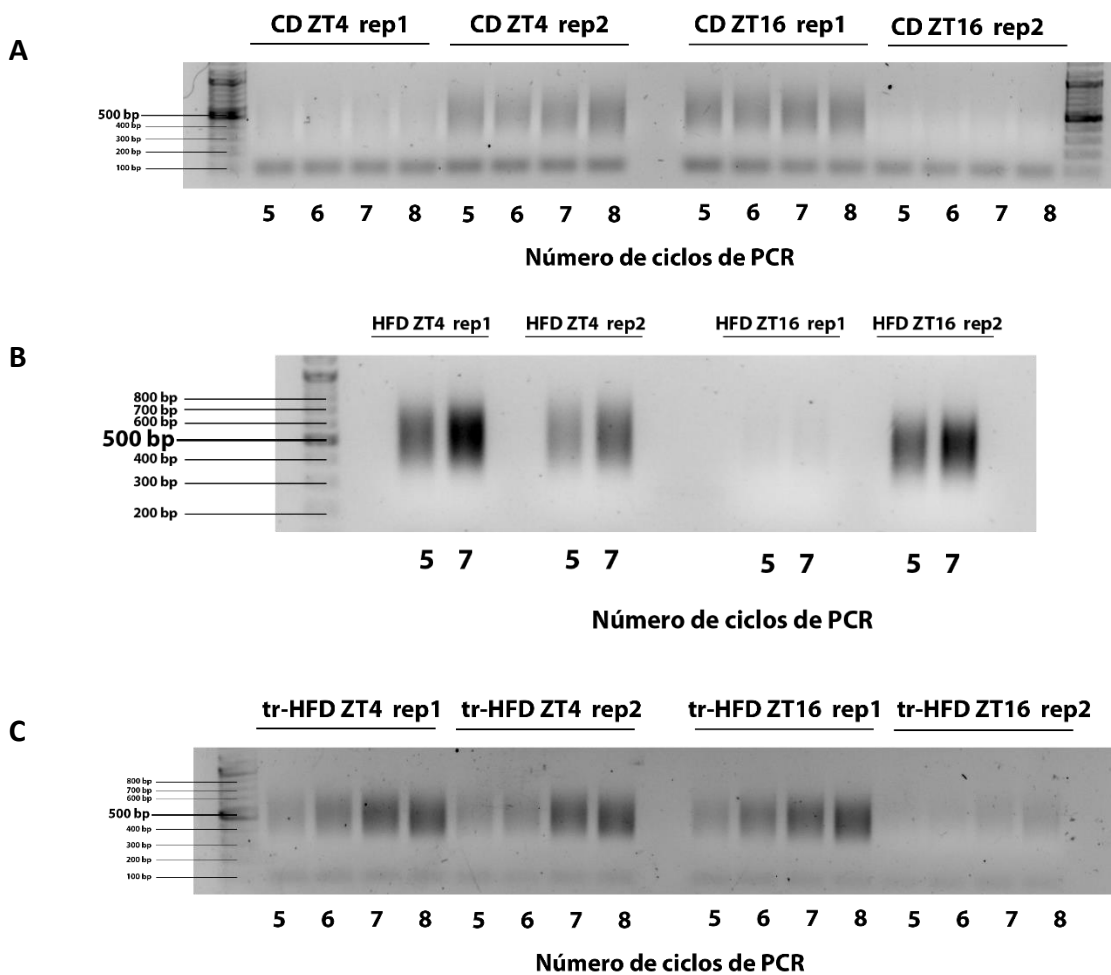














Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa del material de las bibliotecas amplificadas con diferente número de ciclos de PCR para los grupos CD **A**, HFD **B** y tr-HFD **C**.

Con base en lo observado en los geles se determinó amplificar las bibliotecas con los siguientes números de ciclos para asegurar tener suficiente cantidad de DNA para realizar la secuenciación a la vez que se reducen la obtención de duplicados de PCR. En la tabla 1 se enlistan el número de ciclos y la cantidad de DNA obtenido en cada caso.

Tabla 1. Cuantificaciones de las bibliotecas de Hi-C

Muestra	Número de ciclos	Concentración (ng/μl)	Concentración (nM)
 CD_ZT4_rep1	5	5.78	17.51
 CD_ZT4_rep2	4	16.9	51.21
 CD_ZT16_rep1	4	13.1	39.69
 CD_ZT16_rep2	5	4.17	12.63
 HFD_ZT4_rep1	4	13.1	39.69
 HFD_ZT4_rep2	4	10.8	32.72
 HFD_ZT16_rep1	7	3.4	10.3
 HFD_ZT16_rep2	4	16.8	50.9
 tr-HFD_ZT4_rep1	4	7.35	22.27
 tr-HFD_ZT4_rep2	4	15	45.45
 tr-HFD_ZT16_rep1	4	16	48.48
 tr-HFD_ZT16_rep2	7	6.95	21.06

Posteriormente como último control antes de la secuenciación, se amplificó una pequeña fracción de las bibliotecas durante 40 ciclos y la mitad de cada reacción se digirió con la enzima Clal, para verificar que en su mayoría estuviera compuesta de material de Hi-C. (**Figura 22**). En la mayoría de los casos la digestión es sutil y es más notoria en los fragmentos por debajo de los 500pb. Se tuvo que repetir la ligación de la CD ZT16 réplica 2, ya que no se observó una amplificación en un inicio, del mismo modo no se observó una digestión de la biblioteca amplificada. Sin embargo, ya que el resto de los controles se observaron de acuerdo con lo esperado se decidió continuar con la biblioteca con la reserva de que pueda resultar menos eficiente y pueda ser necesario repetir el experimento.

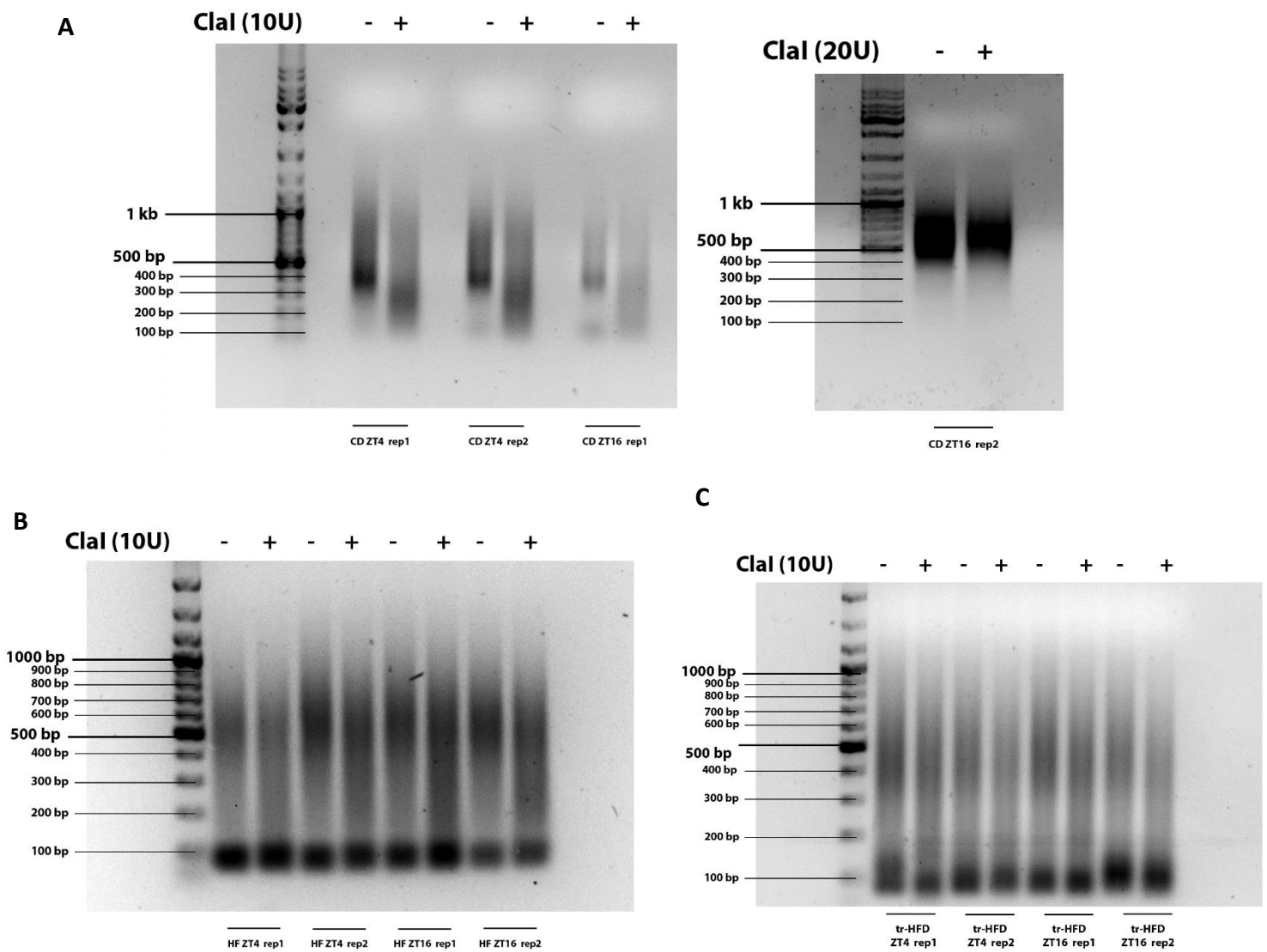
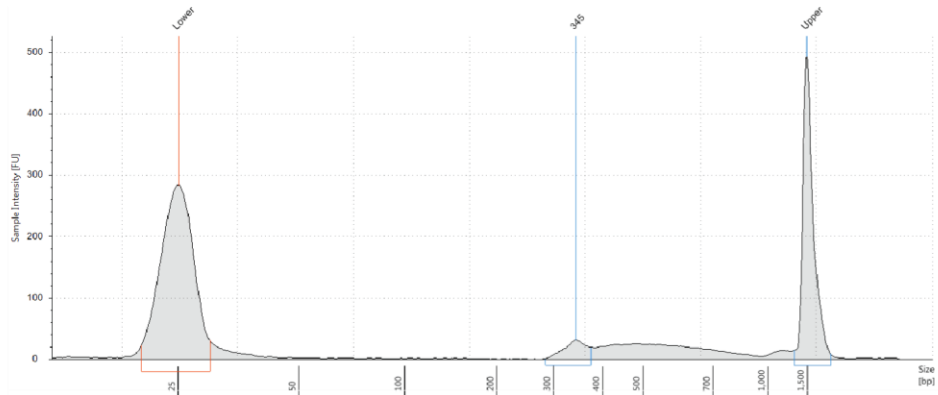


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa de la biblioteca de Hi-C amplificada y posteriormente digerida con Clal ara los grupos CD **A**, HFD **B** y tr-HFD **C**.

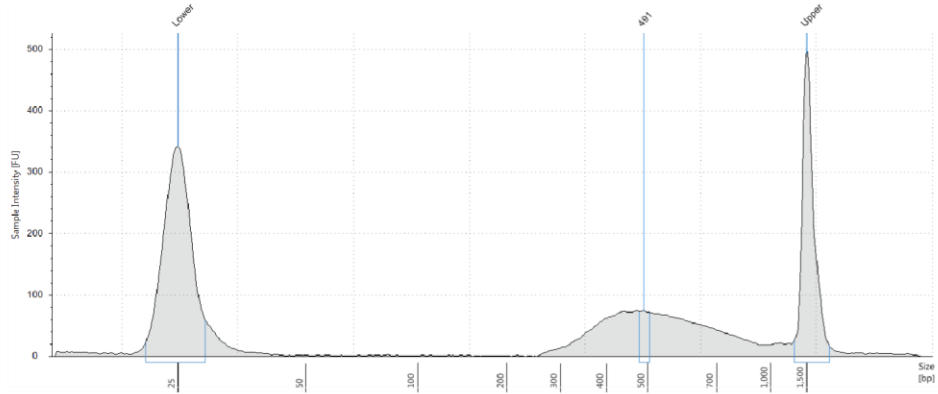
Finalmente, las bibliotecas se llevaron a TapeStation 2200 (Agilent Technologies) para verificar la distribución de tamaños de las moléculas que conforman la biblioteca y confirmar la concentración de las mismas (**Figuras 23-25**).



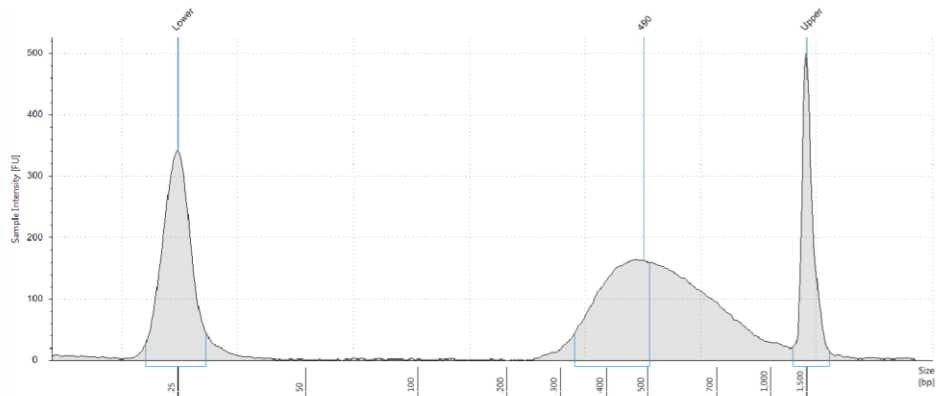
CD
ZT4 rep1



CD
ZT4 rep2



CD
ZT16 rep1



CD
ZT16 rep2

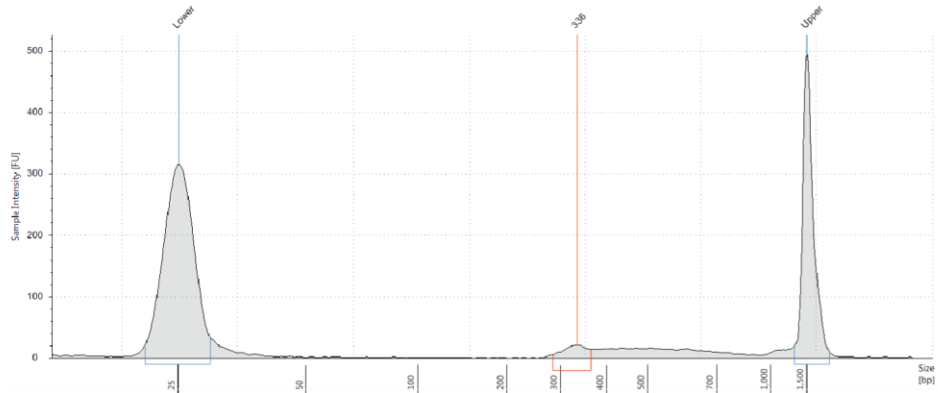
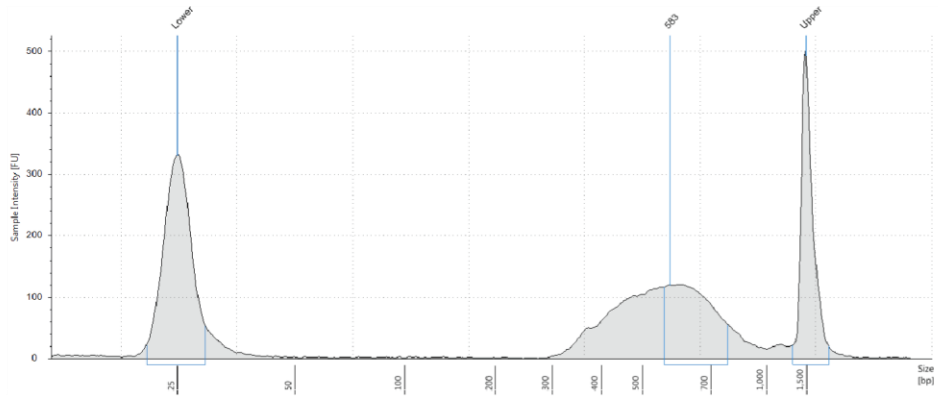


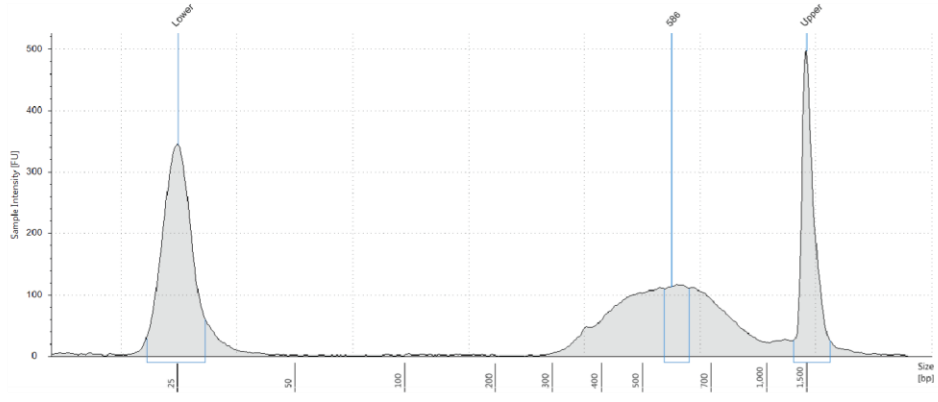
Figura 23. Resultados de TapeStation para las bibliotecas de Hi-C, grupo CD, se señala el promedio de los fragmentos con azul



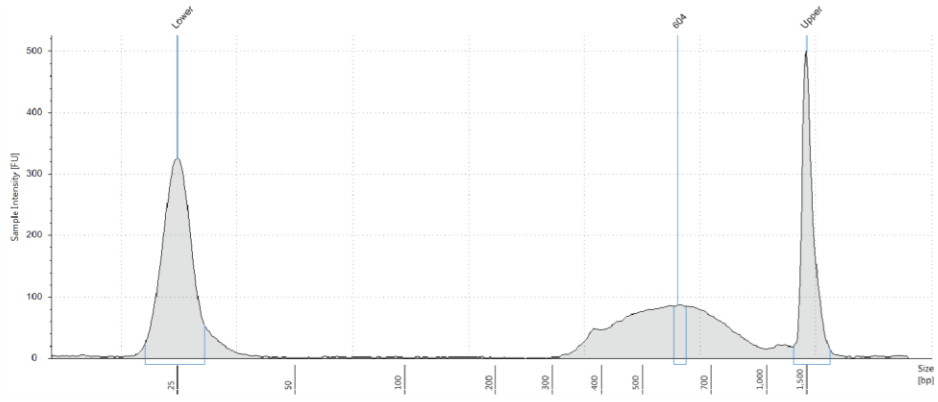
HFD
ZT4 rep1



HFD
ZT4 rep2



HFD
ZT16 rep1



HFD
ZT16 rep2

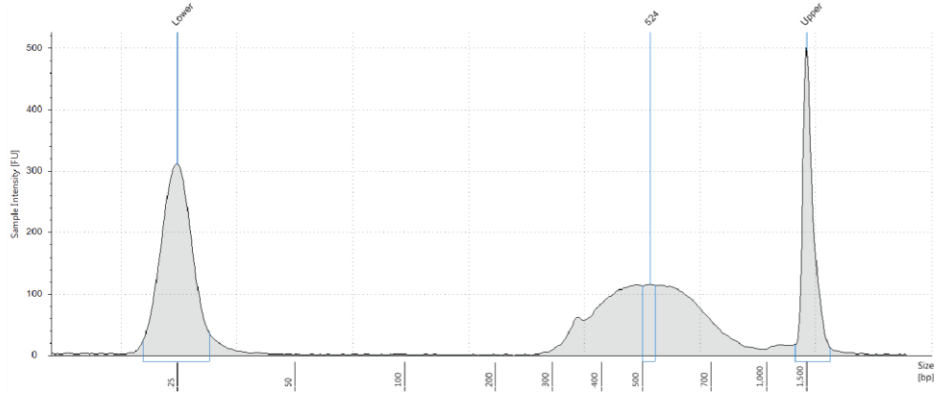
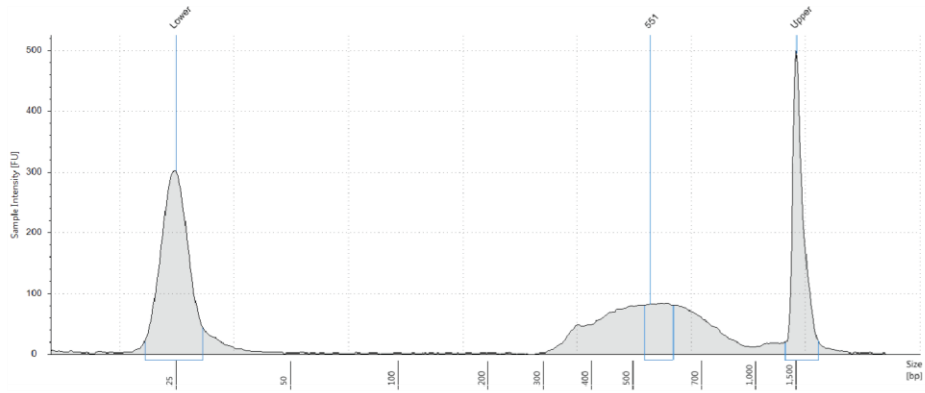


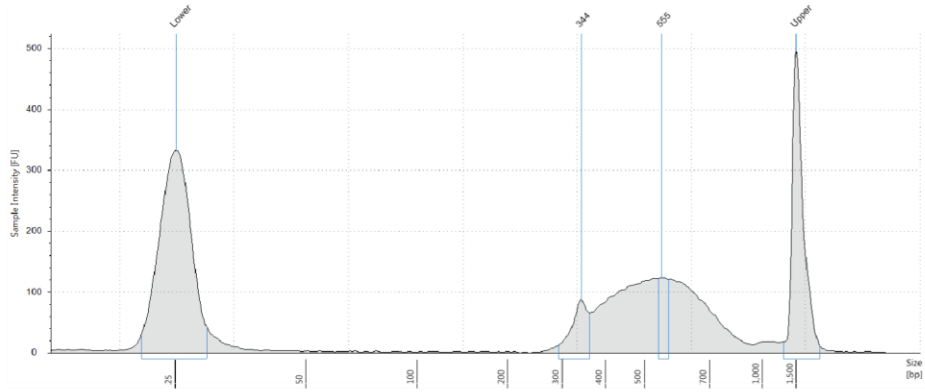
Figura 24. Resultados de TapeStation para las bibliotecas de Hi-C, grupo HFD, se señala el promedio de los fragmentos con azul



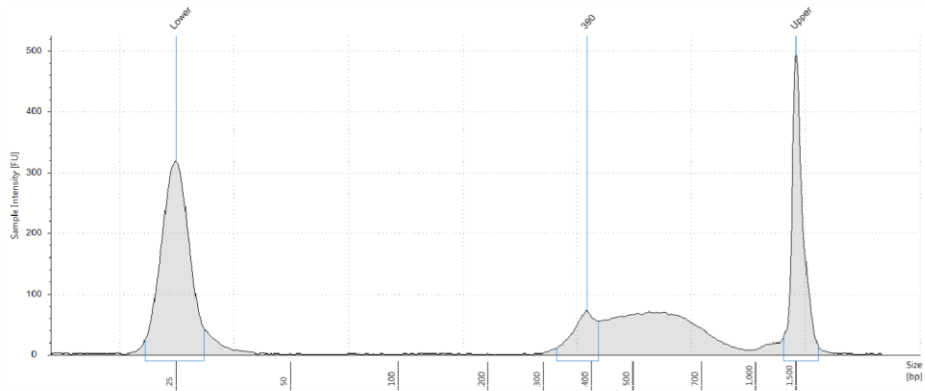
tr-HFD
ZT4 rep1



tr-HFD
ZT4 rep2



tr-HFD
ZT16 rep1



tr-HFD
ZT16 rep2

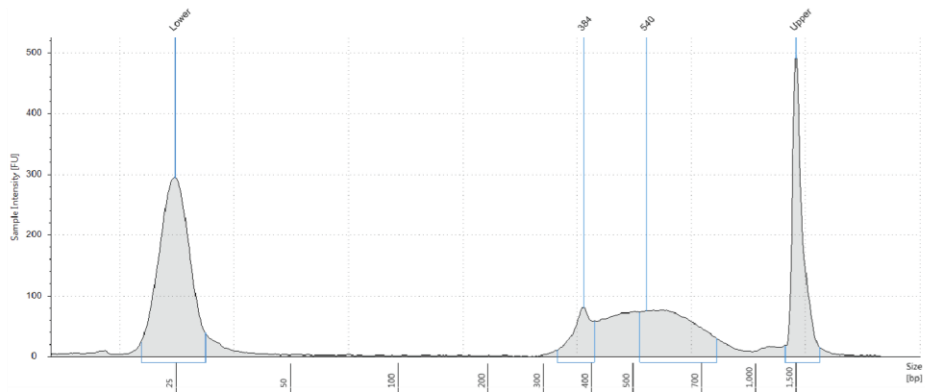


Figura 25. Resultados de TapeStation para las bibliotecas de Hi-C, grupo tr-HFD, se señala el promedio de los fragmentos con azul

De manera general todas las bibliotecas se comportaron de acuerdo con lo esperado con la salvedad de CD ZT4 réplica 1 y CD ZT16 réplica 2, en los que la curva se ve aplanada en comparación con el resto. Sin embargo, en el laboratorio se han secuenciado previamente experimentos con una distribución similar y han resultado eficientes. También resalta la tención de un aparente pico de secuencias de alrededor de 300 pb que parece ser recurrente en todas las bibliotecas, sin embargo, esto parece ser un artefacto del equipo TapeStation con el que se cuenta en IFC, ya que no aparecen en reportes de Bioanalyzer entregados previos a la secuenciación de las bibliotecas.

Actualmente todas las bibliotecas se han secuenciado. Sin embargo, los análisis bioinformáticos descritos a continuación se limitaron a los experimentos del grupo sometido a HFD, con dos réplicas biológicas por punto temporal circadiano.

3. Análisis bioinformático, control de calidad de las secuencias

Al recibir las secuencias se envía también un reporte de la calidad de las mismas en términos del *Phred quality score*. En todos los casos las lecturas mostraron un *score* promedio bastante bueno, mayor a 35 a lo largo de las 150 pares de bases de cada lectura. Dado que las bibliotecas de Hi-C requieren de un gran número de lecturas, y por lo tanto una cantidad considerable de poder de cómputo y almacenamiento, se evaluó otros aspectos de calidad de las lecturas con una muestra de 50 M de lecturas (>10% de las lecturas totales) de cada experimento. En estas muestras se identificó a través de FastQC (v0.11.8) que las lecturas no poseían cantidades de adaptadores detectables por el algoritmo por lo que se determinó que no era necesario realizar un corte de las secuencias.

El primer paso al contar con la información de la calidad de las secuencias fue mapear las lecturas e ir las filtrando hasta obtener pares de interacción válidos y únicos. Se compararon las cifras obtenidas de las bibliotecas con experimentos previos del laboratorio en células de ratón y referido aquí como Hi-C MFM, así como un experimento de Low-C, adaptación del protocolo de Hi-C para cantidades iniciales de material biológico bajas también del laboratorio e identificado aquí como Low-C MFM.

Las lecturas obtenidas se analizaron por medio del pipeline HiCUP el cuál realiza el mapeo de las mismas y posteriormente lleva a cabo un análisis específico para Hi-C obteniendo los pares de lecturas válidos, es decir que corresponden a interacciones entre secuencias del genoma. También HiCUP nos indica la calidad del experimento mostrando el porcentaje de las lecturas que resultan en lecturas no informativas derivadas del experimento. Dichas lecturas incluyen eventos que surgen naturalmente del protocolo en cierta proporción como son fragmentos biotinilados y no ligados correctamente, así como duplicas de PCR, entre otras.

En la tabla 2 se muestran las cifras y porcentaje de lecturas que van siendo filtradas desde las lecturas totales, las mapeadas de manera pareada, los pares de lecturas válidos, las lecturas únicas (después de remover duplicas de PCR), y finalmente la eficiencia neta como porcentaje.

Tabla 2. Número de lecturas totales y porcentaje de lecturas que se van obteniendo a lo largo del pipeline HiCUP para cada experimento.

Experimento	Total	Pareadas	% Pareadas	Válidos	% Válidos	Únicas	%Únicas	% Eficiencia neta
Hi-C MFM	266336305	165258505	62.05	135220903	81.82	133716950	98.89	50.21
Low-C MFM	488177393	300779027	61.61	292456506	97.23	261781117	89.51	53.62
HFD								
ZT4_rep1	620660904	419156560	67.53	409447999	97.68	254930681	62.26	41.07
HFD								
ZT4_rep2	507,751,998	342,587,461	67.47	331,247,056	96.69	244,556,766	73.83	48.16
HFD								
ZT16_rep1	435,212,021	296,948,664	68.23	289,418,328	97.46	207,564,469	71.72	47.69
HFD								
ZT16_rep2	425683455	278289454	65.37	272927049	98.07	180569889	66.16	42.42

La comparación entre experimentos (**Figura 26**), mostró porcentajes bastante favorables en las lecturas pareadas y en la proporción de los pares válidos entre los experimentos del presente trabajo, grupo HFD, y los experimentos de referencia. Sin embargo, el porcentaje de pares únicos resultó muy por debajo del estándar para experimentos del laboratorio, y también de acuerdo a lo esperado dado el número de ciclos que se eligió para amplificar las bibliotecas en cuestión (4 ciclos y 7 ciclos para la biblioteca de HFD ZT16 rep1). De momento no hemos podido dilucidar la posible causa de esto. Una opción es que se hayan diluido de más las muestras, factor que a su vez aumenta la presencia de lecturas duplicadas. Sin embargo, la eficiencia neta de los experimentos generados en este trabajo es comparable con la obtenida en Hi-Cs ya publicados y en Hi-Cs elaborados previamente en el laboratorio (**Figura 26 y Tabla 2**).

Una vez obtenidos los pares válidos de cada experimento se construyeron matrices de contactos genómicos utilizando los programas HiC-Pro y HiCExplorer. Utilizando las matrices generadas con HiCExplorer en formato .cool se computó un análisis de correlación de Pearson entre los cuatro experimentos. Resultado de este análisis se encontró que los cuatro experimentos muestran una alta correlación entre sí, lo cuál es esperado ya que se trata de un mismo tejido y una misma dieta. La correlación fue casi perfecta entre las réplicas: 0.98 para el ZT4 y 0.97 para el ZT16. Por esto se puede concluir que hay una alta coherencia entre las réplicas, ofreciendo la posibilidad de sumar la información de ambas réplicas para de este modo alcanzar una mayor resolución y robustez en la información obtenida a partir de estas bibliotecas, de ser necesario.

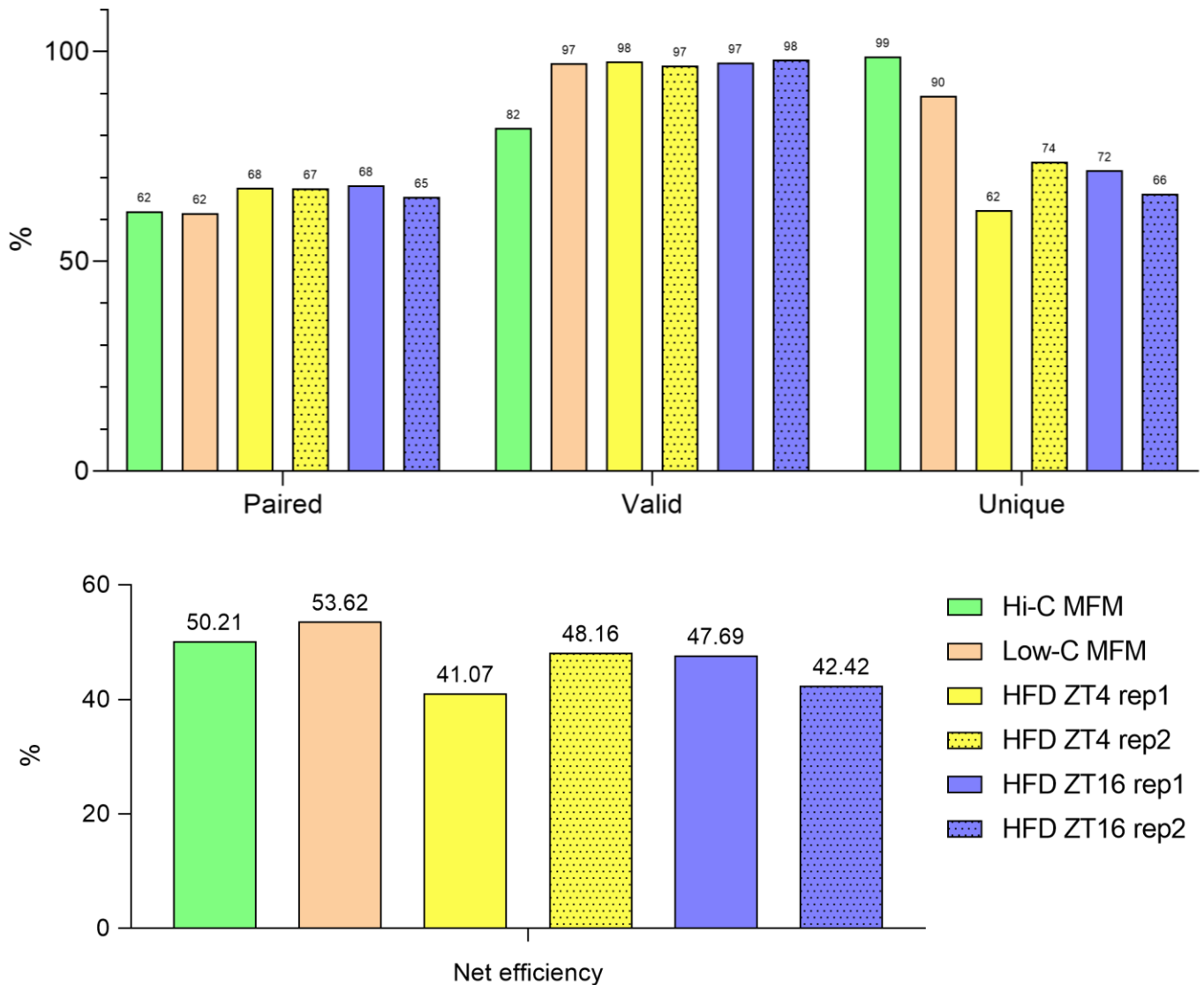


Figura 26. Comparación de porcentajes de lecturas para cada paso del filtraje de lecturas útiles. Comparación de la eficiencia neta de los experimentos considerando el número de lecturas totales y el número de lecturas únicas.

Posteriormente se realizó un control de calidad específico para experimentos de Hi-C, que consiste en graficar el conteo de contactos genómicos en función de la distancia (**Figura 27**). Para cada uno de los cuatro experimentos se observó el patrón esperado y reportado para experimentos de Hi-C exitosos, en el cual los conteos de contactos genómicos disminuyen conforme la distancia entre dos regiones aumenta. Este resultado indica que los experimentos son eficientes y la mayoría de los contactos recopilados se encuentran en regiones cercanas del genoma.

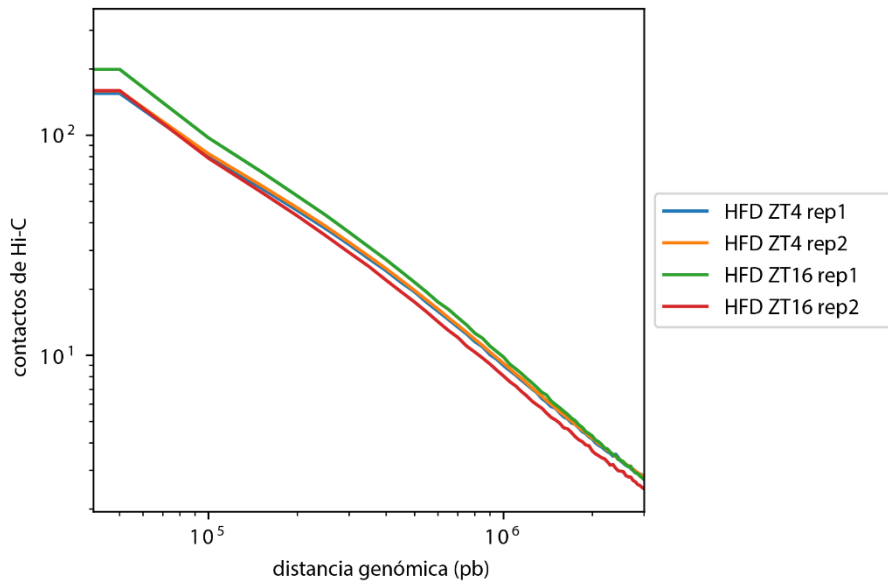


Figura 27. Conteo de contactos de Hi-C en función de la distancia genómica para los experimentos de Hi-C en WAT de animales alimentados con HFD.

4. *La compartimentación del genoma en tejido adiposo de ratones alimentados con dieta alta en grasa es altamente estable en los puntos de muestreo circadiano*

Con el objetivo de identificar si a la escala de compartimentos pudiera haber diferencias dependientes del momento del día en en el grupo de dieta alta en grasa se utilizó el pipeline dHiC.

En primer lugar se determinó la proporción del genoma que se encuentra en compartimento activo A, o en compartimento inactivo B para ambas condiciones. En ambos casos la proporción resultó ser bastante similar (**Figura 28**). La porción del genoma de ratón que se empleó para estos análisis corresponde a un total de 2563.5 Mb. Para la condición ZT4 un total de 1186.1 Mb (46.27%) se encontraron en compartimento A, mientras que para el compartimento B fue un total de 1377.4 Mb (53.73%). Para el ZT16 un total de 1195.6 Mb (46.64%) se asignó a compartimento A y el compartimento B fue un total de 1367.9 Mb (53.36%).

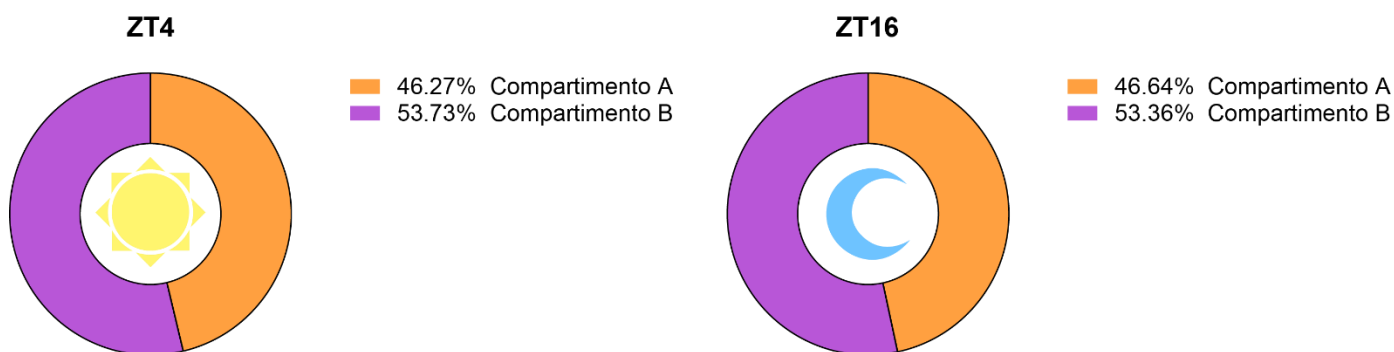


Figura 28. Proporción de cada compartimento identificadas con el programa dHiC para cada una de las condiciones y considerando los datos de dos réplicas biológicas en cada caso. Datos para WAT de animales alimentados con HFD.

Se realizó una inspección visual para confirmar que la cromatina se segrega en compartimentos a escala de cromosomas completos y también, para verificar que los compartimentos identificados con dHiC son consistentes se comparó el patrón de compartimentación con datos obtenidos con HiCExplorer (**Figura 29**). Lo que se logra observar en el cromosoma que se muestra como ejemplo en la figura (cromosoma 14) aplica para el resto de cromosomas. El patrón de compartimentación es

similar utilizando ambos programas, y ambos son coherentes con el patrón observado en las matrices de contactos.

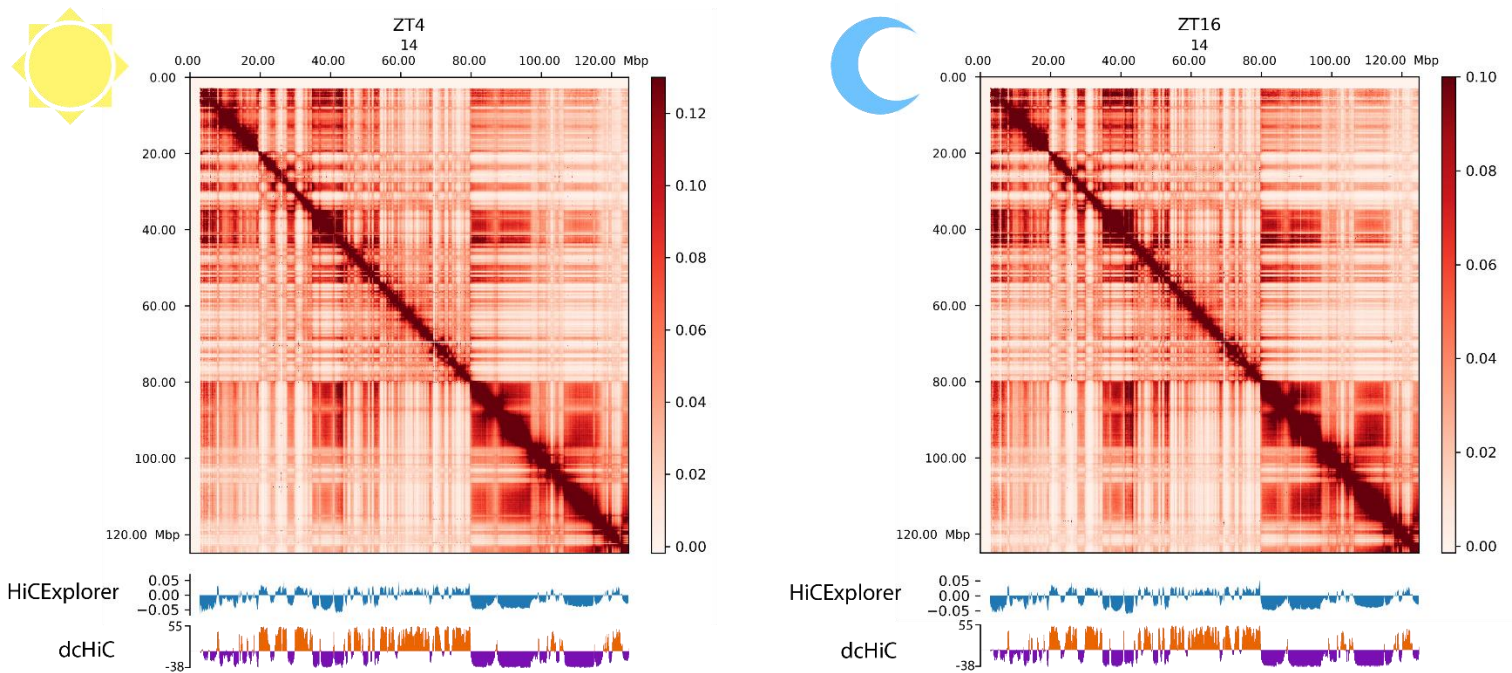


Figura 29. Matrices de contactos del cromosoma 14, como ejemplo, para ambas condiciones con la señal de componente principal (PC) obtenido con HiCExplorer y con dcHiC. Los valores positivos indican regiones con asignación a compartimento A mientras que las regiones con valor negativo corresponden a regiones en compartimento B. Datos para WAT de animales alimentados con HFD.

Respecto al análisis diferencial realizado con dcHiC, no se identificaron regiones que cambien su de compartimento A a B o viceversa del ZT4 al ZT16 de manera significativa con la resolución de los experimentos. De manera general podemos decir que la compartimentación genoma se mantiene estable en general dentro del grupo de dieta alta en grasa al menos en los tiempos circadianos evaluados.

Además, el pipeline dcHiC también provee de un análisis a nivel de subcompartimentos que han mostrado llegar a tener una relevancia funcional^{110,111}. dcHiC define los subcompartimentos mediante la magnitud del PC, dividiendo tanto el compartimento A como el compartimento B en 4 subcompartimentos, numerados del 0 al 3, donde 3 es el valor más alejado del cero, positivo o negativo según sea el caso. La proporción de estos subcompartimentos en general es similar en ambos puntos temporales (**Figura 30**).

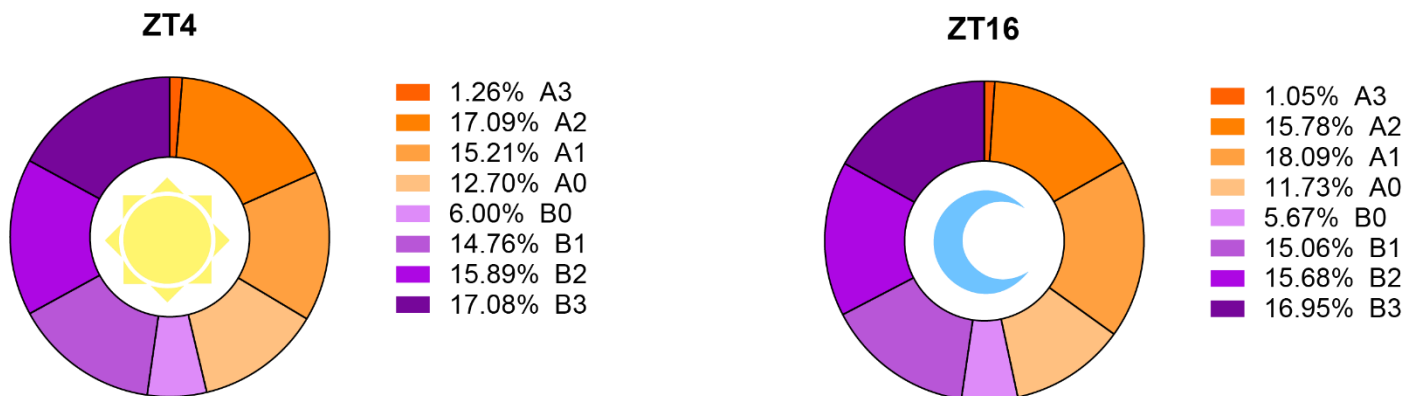


Figura 30. Proporción de cada categoría de subcompartimento identificada con el programa dHiC para cada una de las condiciones y considerando los datos de dos réplicas biológicas en cada caso. Datos para WAT de animales alimentados con HFD.

Sin embargo, al examinar la asignación de subcompartimentos con detalle se encuentra que existen un conjunto de regiones genómicas que muestran una transición en las categorías de subcompartimentos entre ambos puntos temporales. Estas regiones representan un total de 484.8 Mb (18.9% del genoma) y muestran transiciones ya sea en cambios en la magnitud sin cambiar de compartimento, por ejemplo de B2 a B0, o cambios de categoría de subcompartimento, por ejemplo de A1 a B1. Este segundo escenario constituye un total de 95.6 Mb (3% del genoma). Para poder corroborar que estas transiciones tienen una relevancia funcional será necesario complementar e integrar datos de expresión en los mismos puntos de muestreo lo cual se realizará más adelante y es una perspectiva derivada de la presente tesis.

5. Los Dominios Topológicamente Asociados de WAT de animales alimentados con HFD muestran diferencias circadianas en función de su orden de anidamiento

El siguiente nivel de organización del genoma que se exploró con los datos de Hi-C es el de los dominios topológicamente asociados (TADs) y subdominios anidados. Se utilizó el algoritmo rGMAP que identifica dominios topológicos utilizando matrices de Hi-C en el formato output de HiC-Pro, además este programa es capaz de identificar dominios anidados. Se definió un orden de jerarquía de dominios en el que los dominios de orden 3 se encuentran dentro de los de orden 2 y estos a su vez dentro de los dominios de orden 1 (**Figura 31A**). Para cada orden de dominios se identificaron cantidades similares en los puntos temporales de estudio. Se identificó un mayor número de dominios de orden 2 mientras que los dominios de orden 3 resultan ser los menos numerosos (**Figura 31B**). Esta información sugiere un patrón de organización del genoma en dominios muy similar entre ambos tiempos circadianos.

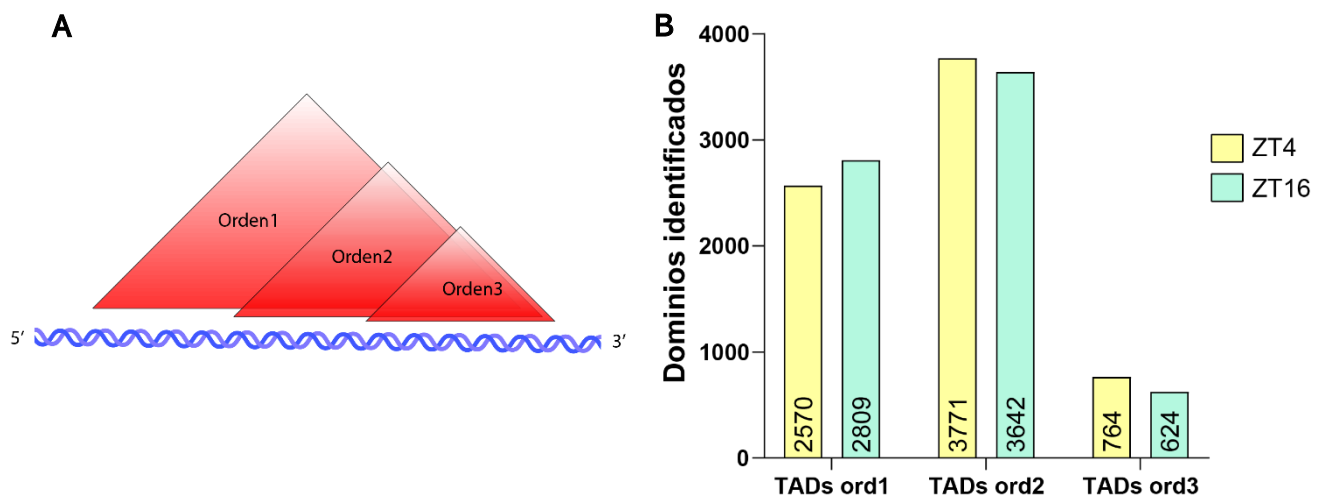


Figura 31. Esquematización de la jerarquía de dominios identificados con rGMAP **A**. Conteo de dominios de los diferentes órdenes identificados con rGMAP para los puntos temporales de estudio **B**. Datos para WAT de animales alimentados con HFD.

A continuación se realizó el computo de la fuerza de aislamiento de las fronteras de los dominios y subdominios detectados con rGMAP (**Figura 32**). Esto con el objetivo de dilucidar si estas estructuras genómicas pudieran permitir más o menos contactos a determinada hora del día o entre los órdenes de anidamiento de los dominios

No se observaron diferencias significativas en la fuerza de aislamiento de las fronteras entre los puntos temporales de estudio para ninguno de los órdenes de dominio, indicando que esta característica de las fronteras de los dominios prevalece a lo largo del día. Sin embargo, sí se observan diferencias significativas en la fuerza de aislamiento de las fronteras entre los diferentes órdenes de dominios y esta tendencia se mantiene en ambos tiempos circadianos. Como puede observarse la fuerza de aislamiento va disminuyendo de manera significativa en relación con la jerarquía de los dominios, siendo los dominios de orden 1 los que muestran una mayor fuerza de aislamiento, bloqueando las interacciones de las regiones dentro del dominio con regiones externas a este. Por otro lado en los subdominios anidados la fuerza de aislamiento va disminuyendo. Este resultado significa que los subdominios son más permisivos en términos de cuantas interacciones cruzan entre ellos pero siempre contenidos dentro de TADs más grandes que dividen el genoma en unidades estructurales y de regulación.

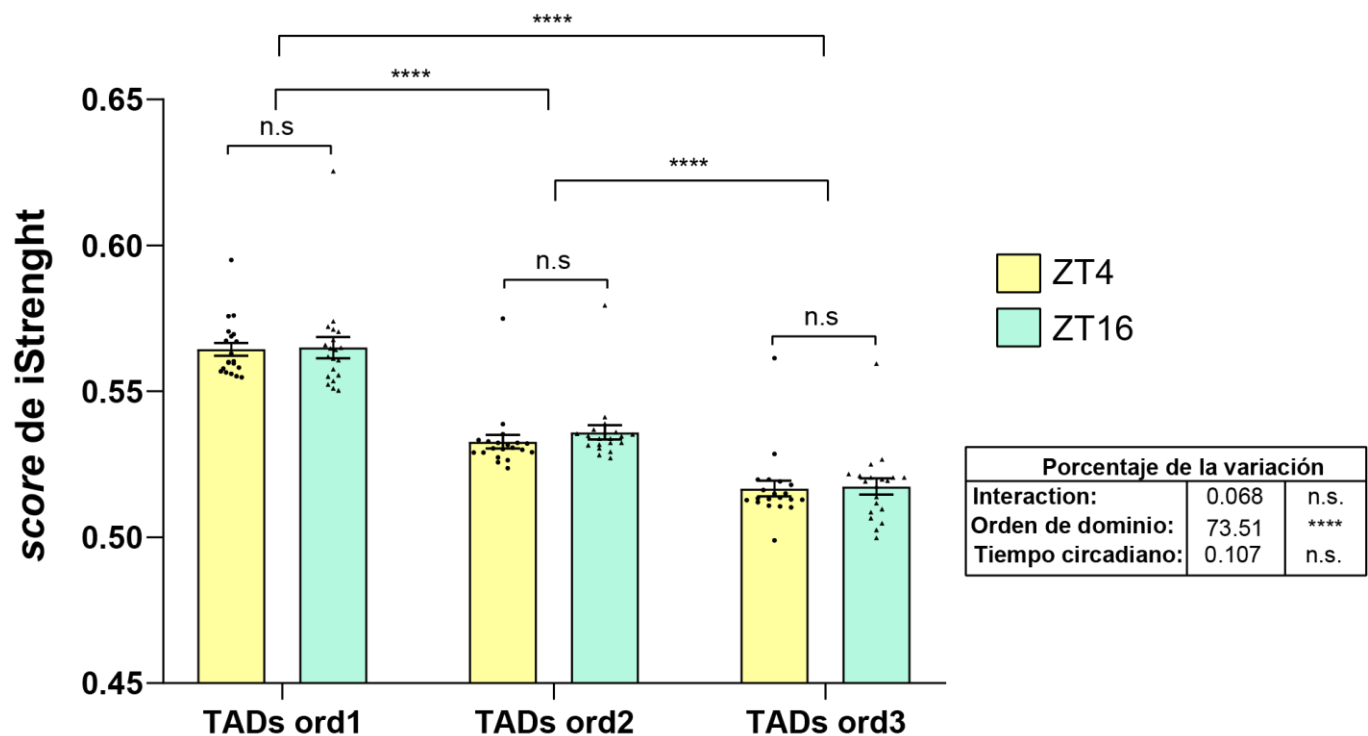


Figura 32. Score de iStrength para cada uno de los órdenes de dominio y para ambos tiempos circadianos. Se grafica el promedio + SEM (n=20, valores promedio de cromosomas 1-19 y cromosoma X) se realizó una prueba de ANOVA de dos vías y Tukey post hoc para comparaciones múltiples, **** p<0.0001. Datos para WAT de animales alimentados con HFD.

Con el objetivo de identificar si estos dominios o subdominios pudieran ser dinámicos a lo largo del día se realizó una comparación entre los dominios identificados para ambos puntos del día. Se observa que en efecto existen dominios exclusivos de cada tiempo circadiano (**Figura 33A**). Estos dominios dependientes del tiempo del día aumentan en proporción a cuánto más anidado se encuentre el dominio (**Figura 33B**). Este resultado, en conjunto con las diferencias en fuerza de aislamiento sugiere que los subdominios dentro de otros más grandes permiten cierto dinamismo en la organización 3D del genoma de forma tiempo del día dependiente.

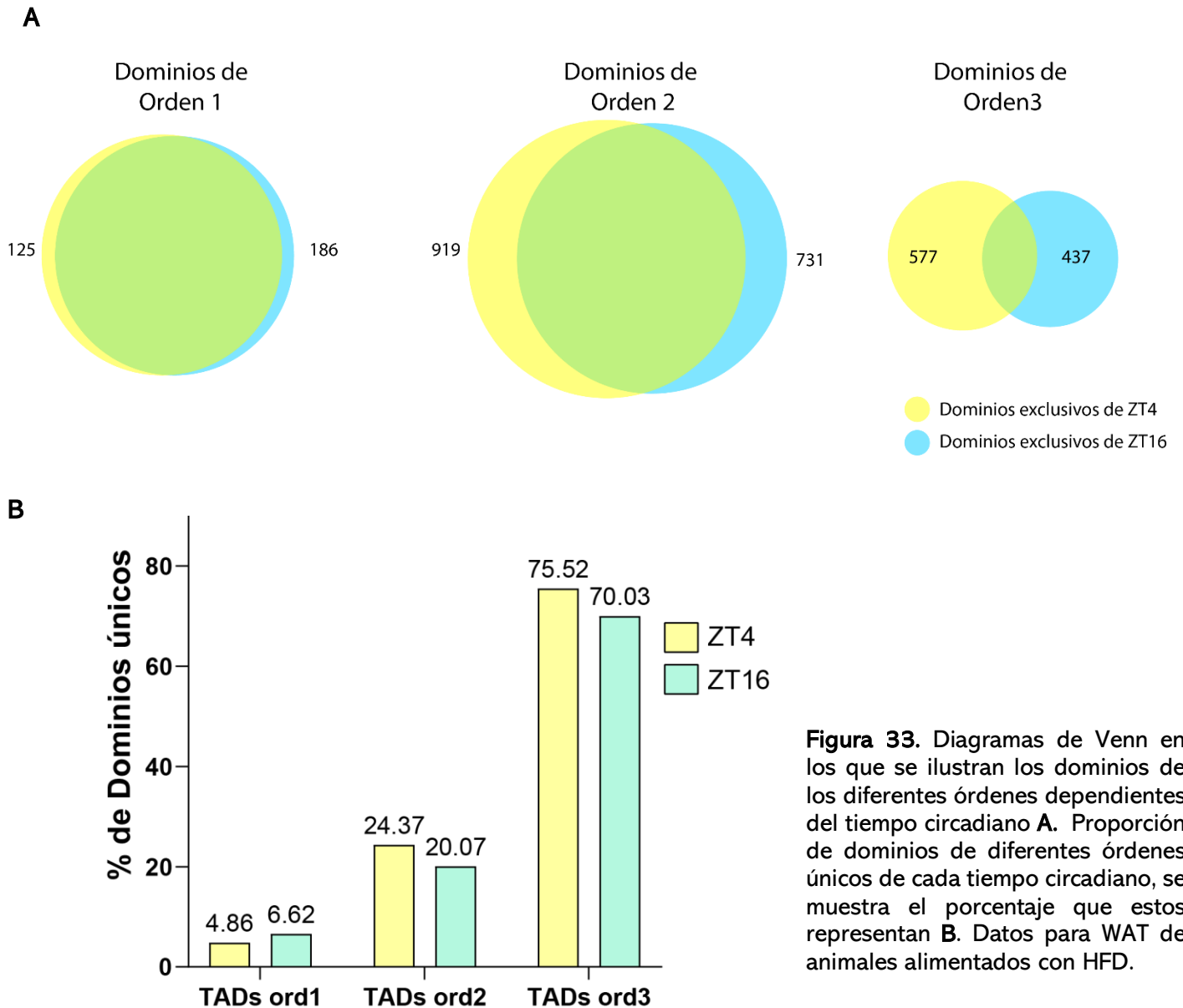


Figura 33. Diagramas de Venn en los que se ilustran los dominios de los diferentes órdenes dependientes del tiempo circadiano **A**. Proporción de dominios de diferentes órdenes únicos de cada tiempo circadiano, se muestra el porcentaje que estos representan **B**. Datos para WAT de animales alimentados con HFD.

6. Los genes dentro de subdominios rítmicos de WAT de animales alimentados con HFD participan en procesos relevantes en el contexto de la obesidad

Una vez identificados los dominios diferenciales se mapearon los genes ubicados dentro de ellos y se realizó un análisis de enriquecimiento funcional de vías con la herramienta g:Profiler con el objetivo de estimar qué funciones moleculares y celulares pudieran verse reguladas por transiciones en la topología del genoma dependientes del tiempo. Para realizar el análisis se tomaron los dominios de orden 3 únicos tanto para el ZT4 como para el ZT16 dado que son los que muestran una mayor proporción de dominios únicos y a este punto no se puede distinguir si estos genes asociados a cambios en la topología puedan estar regulados al alta o a la baja. Además, al ser los más anidados, se evita de este modo realizar el análisis con información redundante.

El análisis de enriquecimiento revela que los procesos y vías más enriquecidos relacionados con los genes ubicados en TADs diferenciales están relacionados principalmente con diversos procesos inmunes, procesos de señalización celular y endócrina, adhesión celular, hidroxilación de lípidos, homeostasis energética e incluso procesos de regulación de la expresión de genes (**Figura 34**). Los procesos que se muestran corresponden a procesos identificados como *drivers* por el algoritmo de g:Profiler. Estos procesos se identifican considerando relaciones entre los elementos de todas las listas que converjan entre sí, buscando una aproximación basada en vínculos y coherencia funcional más que simplemente en la magnitud del valor de significancia. Se incluyen también las listas completas de las categorías: Función Molecular, Procesos Biológicos, Componentes Celulares, KEGG *pathways*, Reactoma y Factores de transcripción, para los genes dentro de todos los subdominios de orden 3 dependientes de tiempo (**Figuras suplementarias 1-6**), así como los específicos del ZT4 (**Figuras suplementarias 7-12**), y el ZT16 (**Figuras suplementarias 13-18**).

Un hallazgo relevante es que entre los motivos de factores de transcripción hallados se encuentran los PPARs (Por sus siglas en inglés: Peroxisome proliferator-activated receptors), reguladores transcripcionales muy importantes para el tejido adiposo que regulan procesos homeostáticos como la inflamación, adipogénesis, metabolismo de lípidos, homeostasis de glucosa y resistencia a la insulina. Además, estos factores pueden actuar como sensores de lípidos y se ha descrito su función tanto en procesos patológicos de la obesidad como en la respuesta plástica del tejido adiposo ante este tipo de enfermedades metabólicas¹¹². Además, existen evidencias que señalan a los PPARs importantes en la integración del metabolismo y la ritmicidad circadiana al regular y ser

regulados por factores del reloj moleculares tales como BMAL1 y REV-ERB¹¹³. En el contexto de la obesidad se ha identificado que PPAR γ desencadena la reprogramación del transcriptoma circadiano en hígado producto de la alimentación con dietas altas en grasa⁷².

El hallar enriquecido el sitio de unión de los receptores PPARs en nuestros datos concuerda con las evidencias antes mencionadas y remarca la importancia de estos reguladores transcripcionales al integrar las señales nutricionales, los ritmos circadianos y el metabolismo.

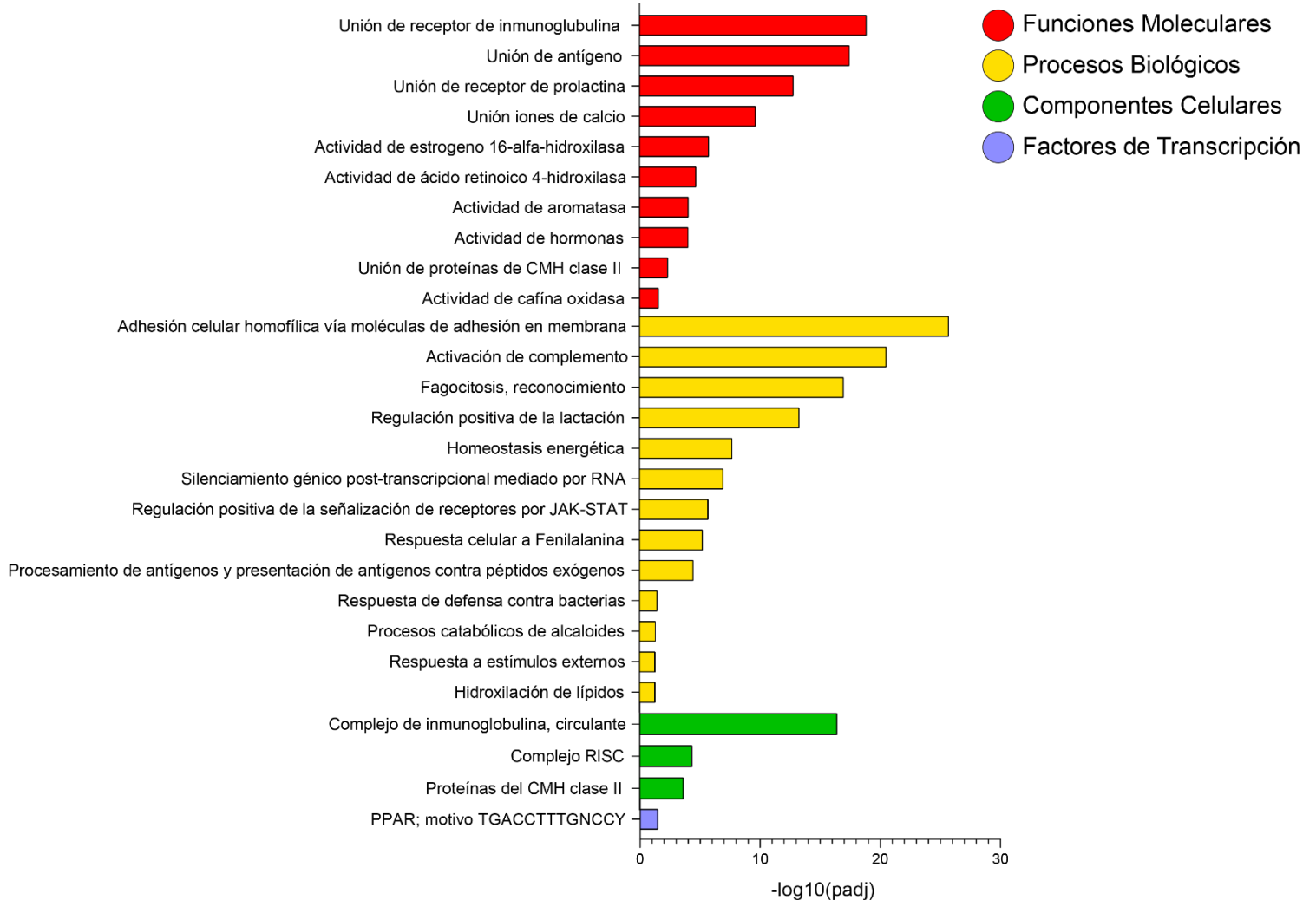


Figura 34. Análisis de enriquecimiento funcional de los genes contenidos en los TADs que cambian del día a la noche, se resaltan y enlistan las vías o procesos identificados como *drivers* por el algoritmo, esto quiere decir que son vías que convergen con otros elementos de las distintas listas. Resaltan un gran número de procesos inmunes, homeostasis energética, actividad de hidroxilasas lipídicas, silenciamiento génico post-transcripcional mediado por RNAs, actividad de hormonas y el motivo de unión para PPAR. Abreviaturas; CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad, JAK-STAT: Vía de Cinasas Janus- Proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción, RISC: Complejos de silenciamiento inducidos por RNA. Datos para WAT de animales alimentados con HFD.

Para ejemplificar los cambios en la estructura de la cromatina a nivel de TADs, se muestra una región (chr19:45851411-46732234) con dominios diferenciales en los tiempos estudiados (**Figura 35**). Esta región contiene al gen *nfk2*, que codifica para la proteína p52, parte del complejo NF-κB. Este complejo tiene actividad de factor transcripcional y dirige la transcripción de genes involucrados en diversos procesos inflamatorios, incluida inflamación crónica de bajo grado característica de la obesidad. Además, el complejo es necesario para la progresión de las complicaciones de los padecimientos metabólicos^{114,115}. De manera interesante, NF-κB es capaz de modificar la ritmicidad en la expresión de genes interactuando directamente con el heterodímero CLOCK/BMAL1^{116,117}. En hígado de ratón y bajo condiciones de retos alimenticios (HFD) NF-κB induce la transcripción de genes de respuesta inflamatoria, metabolismo de lípidos y genes del reloj molecular, así como una relocalización del heterodímero CLOCK/BMAL1 a lo largo de todo el genoma⁷⁴. Estas evidencias sugieren a NF-κB como un candidato que dirige la transcripción rítmica en un contexto patológico, por lo que resulta relevante explorar los mecanismos que regulan su transcripción.

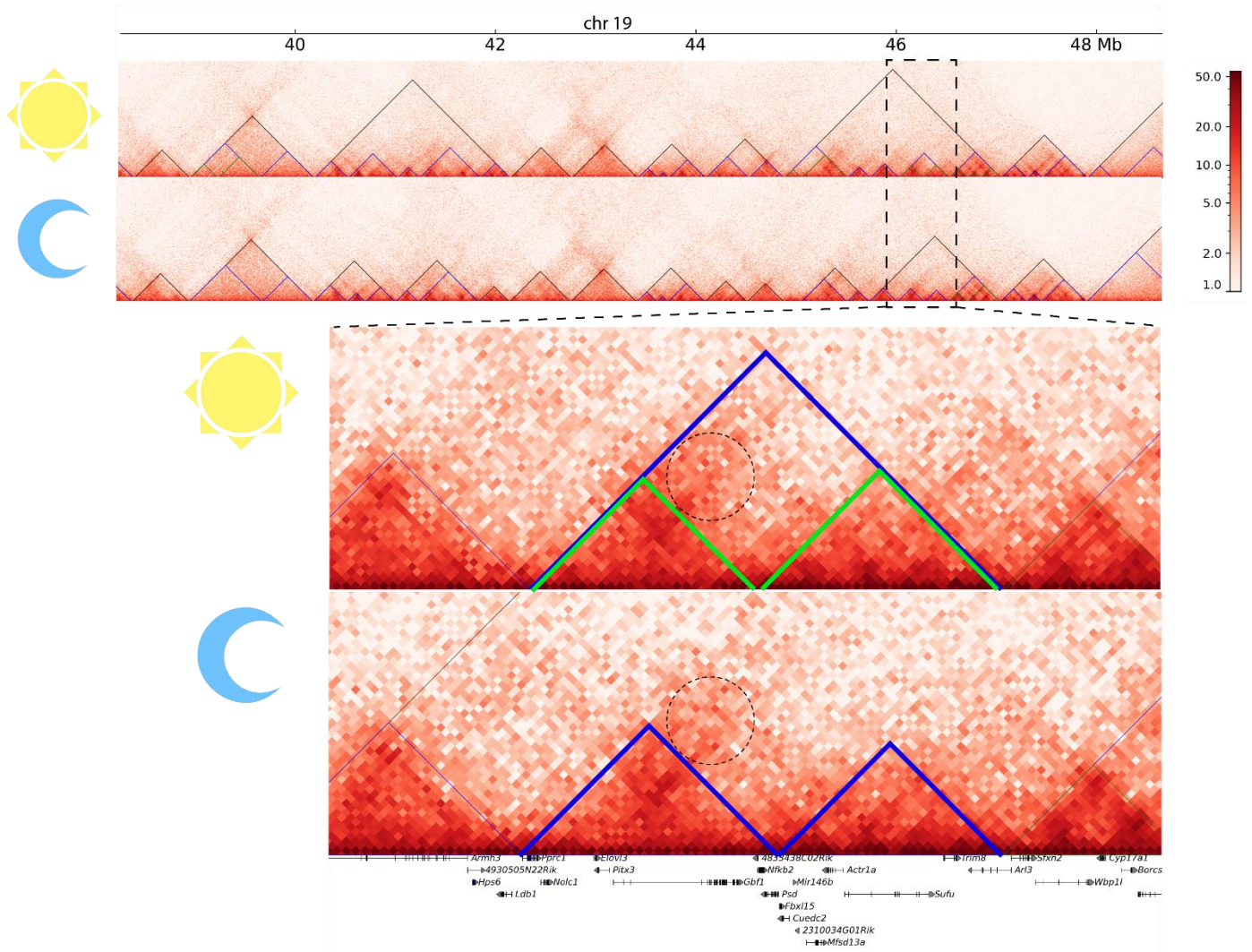


Figura 35. Reestructuración de subdominios en el locus de *nfkb2*. Los subdominios de orden 2 se muestran en azul, mientras que los de orden 3 se enmarcan en verde. Los círculos de línea punteada señalan interacciones que disminuyen del ZT4 al ZT16. Datos para WAT de animales alimentados con HFD.

Como puede observarse en la figura 35, al ZT4 el locus de *nfkb2* se encuentra estructurado en un subdominio de orden 2 con dos subdominios de orden 3 en su interior mientras que al ZT16 disminuyen los contactos que cruzan entre los subdominios de orden 3, por lo que el dominio que los englobaba no se estructura más y estos subdominios pasan a ser de orden 2.

Otro ejemplo interesante de regiones que se reestructuran de forma dependiente del día es el locus del miRNA *miR181* (chr1:137042844-138199275) (**Figura 36**). En el presente trabajo entre las funciones enriquecidas de los subdominios diferenciales se encontró a procesos de silenciamiento post-transcripcional mediado miRNAs. Existen diversas evidencias de miRNAs regulando procesos

asociados a padecimientos metabólicos en diversos tejidos, incluido el WAT¹¹⁸. De manera particular el miR181 tiene una función como regulador post-transcripcional de la adipogénesis silenciando la expresión de TNF- α en WAT¹¹⁹. Este factor impide la diferenciación de los preadipocitos al inhibir la actividad de factores como C/EBP y Ppar γ ¹²⁰, a su vez la inhibición de estos factores se asocia a la patogénesis de obesidad y resistencia a insulina^{121,122}.

En la figura 36, al ZT4 el locus de *miR181* se encuentra estructurado en un dominio de orden 1. Al ZT16 los contactos entre regiones dentro de este dominio, incluido el miRNA, interactúan con regiones río arriba estructurándose un nuevo dominio de orden 1. El antes dominio de orden 1 pasa a ser de orden 2 y se identifican también dos subdominios de orden 3 n su interior.

En conjunto los resultados sugieren que los dominios pueden fungir como unidades funcionales de regulación temporal de la expresión de genes importantes en el contexto de padecimientos metabólicos en consecuencia a una dieta obesogénica. Para corroborar esta observación y como perspectiva de este trabajo se analizará la correlación de estos cambios con los cambios de expresión génica en los mismos tratamientos aquí estudiados y para los mismos puntos temporales.

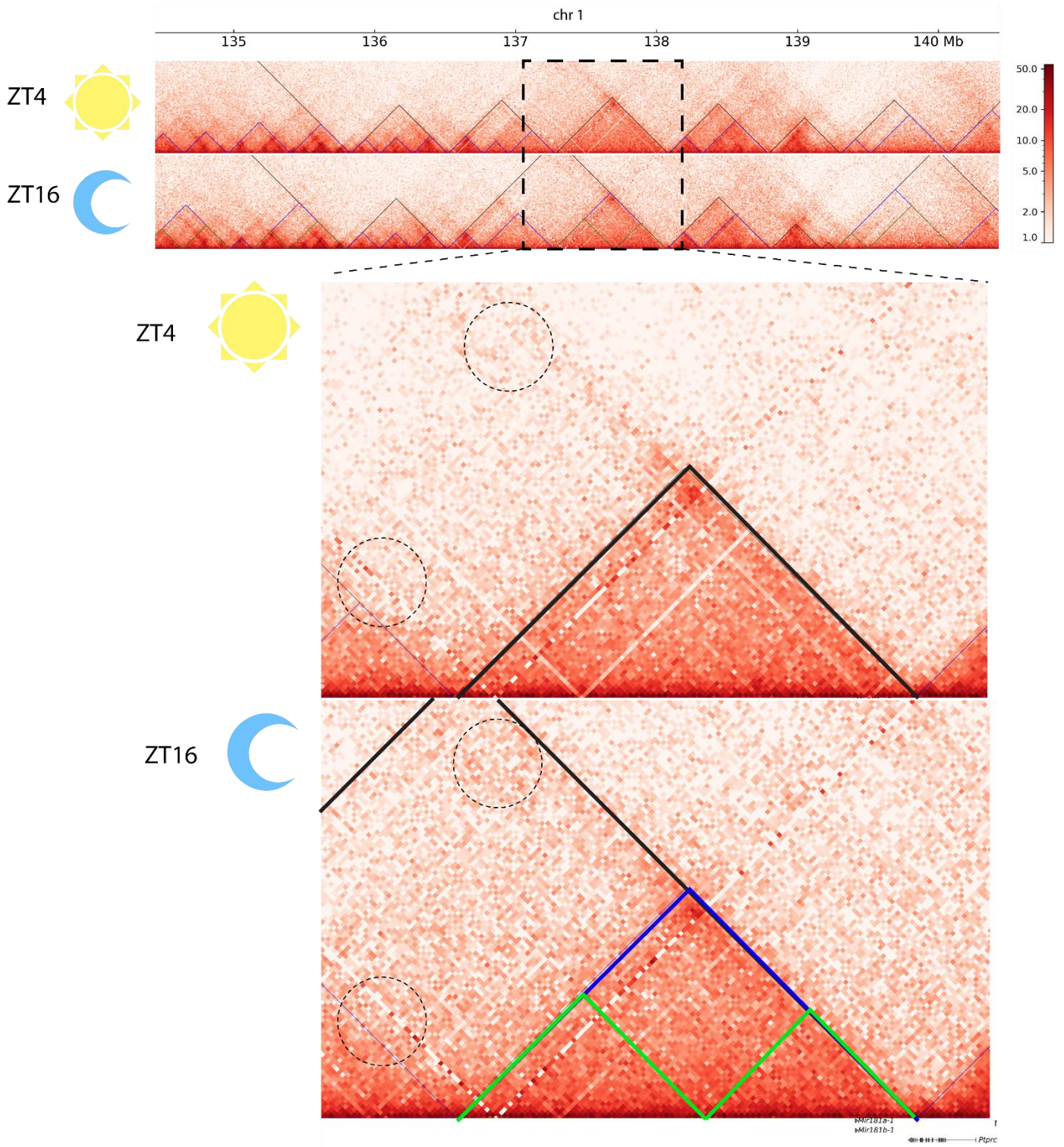


Figura 36. Reestructuración de subdominios en el locus de *miR181*. Los dominios de orden 1 se marcan en negro, los de orden 2 en azul y los de orden 3 en verde. Los círculos de línea punteada señalan interacciones que aumentan en el ZT16 y contribuyen a la estructuración de un dominio más grande. Datos para WAT de animales alimentados con HFD.

IX. Discusión

1. Generación del modelo de alimentación restringida en tiempo.

Como se ha comentado en los resultados, en este trabajo logramos establecer un modelo murino de alimentación restringida en tiempo y caracterizar los diferentes estados metabólicos producto de diferentes dietas. Los datos recabados muestran un comportamiento similar a lo previamente descrito³³ tanto para condiciones que desencadenan patologías metabólicas (grupo HFD), como para la aptitud metabólica y adaptación a retos nutricionales alcanzadas por la intervención en estudio en donde la dieta alta en grasa se administra de manera restringida en el tiempo (grupo tr-HFD).

Las pruebas metabólicas empleadas (Pruebas de tolerancia a glucosa e insulina) se han usado ampliamente en la literatura y permiten caracterizar homeostasis energética alterada (particularmente del metabolismo de glucosa), intolerancia a glucosa y resistencia a la insulina, procesos distintivos de padecimientos metabólicos¹²³. Estas pruebas fueron concluyentes respecto al estado disfuncional en el grupo HFD y una respuesta en la que se mitigan los efectos adversos al restringir la alimentación en el tiempo, grupo tr-HFD. Sin embargo, se han reportado otro tipo de pruebas importantes para una mayor caracterización de modelos de obesidad¹²⁴ y de dietas restringidas en tiempo^{33,125}. Estas incluyen una caracterización de la estructura y función del tejido adiposo a través de exámenes histológicos del WAT o mediciones de moléculas como leptina y adiponectina. También mediciones acerca del metabolismo de lípidos (triglicéridos en plasma, colesterol total, lipoproteína de alta densidad y ácidos grasos libres), mediciones de la salud hepática (niveles de aminotransferasas) y mediciones del ritmo cardíaco, presión sanguínea e intercambio respiratorio. Este tipo de pruebas, además de ofrecer un panorama más completo de los estados metabólicos alcanzados con las diferentes dietas, completarían la interpretación fisiológica de los datos obtenidos como producto del análisis de los datos de la topología del genoma generados en este trabajo y de manera novedosa para la dieta restringida en tiempo.

2. Estandarización y ejecución del protocolo de Hi-C para tejido adiposo.

Una vez establecido el modelo murino, fue crucial estandarizar el protocolo de Hi-C *in situ* para el WAT, ya que se trata de un protocolo que no se había llevado a cabo en el laboratorio para ese tejido. Para este fin se realizó un experimento piloto, con tejido no experimental, en el que se corroboró que el protocolo de Hi-C del laboratorio puede emplearse de manera exitosa para el WAT. Se logró generar doce bibliotecas de Hi-C, para las tres condiciones alimenticias y a dos puntos

circadianos corroborando con una serie de controles a lo largo del protocolo que se trata de experimentos con un buen estándar de calidad. Cabe destacar que la generación de estas bibliotecas supone un importante aporte a la investigación científica dado que aún no se han descrito los mecanismos de regulación transcripcional y en un contexto circadiano del WAT bajo una dieta normal y aún menos bajo otros paradigmas de alimentación. Actualmente existe sólo una publicación en la que se analiza la organización tridimensional del WAT en un modelo de obesidad generada por exposición en estadios tempranos del desarrollo a BPA¹²⁶, por lo que todo el trabajo aquí desarrollado resulta relevante en áreas de frontera de la investigación.

3. Análisis bioinformático de datos de Hi-C en WAT, grupo HFD.

Dentro de esta tesis se planteó como objetivo establecer los flujos de trabajo para análisis de datos genómicos provenientes de Hi-C utilizando el grupo de dieta alta en grasa (HFD) para dos tiempos circadianos, ZT4 y ZT16, por duplicados biológicos. Este análisis incluyó herramientas básicas para establecer la calidad de los experimentos de Hi-C, obteniendo el porcentaje de pares válidos y su filtrado, la construcción de matrices de interacción y el análisis de estructuras a los niveles de compartimento y de dominios topológicamente asociados. Finalmente, realizamos un llamado de TADs diferenciales entre los puntos temporales y anotamos los genes que ahí se ubican.

3.1. Compartimentos cromatínicos en general estables entre el día y la noche

El primer hallazgo al analizar los datos de Hi-C fue que la segregación de la cromatina en compartimentos identificados mediante PCA se muestra altamente estable entre ambos tiempos circadianos para el tejido adiposo. Esta observación puede explicarse por diferentes razones; en primer lugar, el tejido adiposo no muestra una ritmicidad tan robusta, en comparación con otros tejidos como por ejemplo el hígado, en el que se han reportado un 16% de genes rítmicos en contraste con 4% en tejido adiposo blanco⁶⁵. Experimentos de Hi-C resueltos en cuatro puntos temporales durante las 24 horas en el hígado de ratones alimentados con una dieta normal *ad libitum* mostraron que la porción del genoma que cambia su asignación de compartimento en el tiempo constituye un 17.3% del genoma⁹⁶. Dada la menor proporción de genes rítmicos en WAT, es esperado que existan menos regiones del genoma que estén cambiando de compartimento en diferentes horas del día y será importante confirmar dicha observación en el grupo control del presente trabajo. En este sentido, la dieta alta en grasa ha demostrado disminuir la ritmicidad en la expresión de genes circadianos^{58,74}. Por lo tanto, es probable entonces que esta estabilidad en la compartimentación se origine en la naturaleza del WAT bajo ese régimen de alimentación en donde

se promueven amplitudes menos robustas en la expresión de genes circadianos. Finalmente, esto puede deberse también a que los tiempos elegidos para el muestreo pueden no ser los que mejor representen las oscilaciones circadianas bajo estas condiciones. Se ha observado que bajo una dieta alta en grasa la expresión rítmica de genes no se encuentra sincronizada entre tejidos por lo que estos pueden tener diferentes acrofases en la expresión de genes⁷⁶. Será importante completar el análisis de compartimentos en el resto de los tratamientos y puntos temporales y verificar con datos de expresión génica a una mayor resolución temporal si es que existen otros puntos temporales a los que haya un mayor cambio en la expresión de genes.

Si bien no hay grandes regiones que cambian su asignación de manera significativa entre compartimentos A y B, como se ha descrito para el hígado en condiciones normales, sí hay una porción del genoma que muestra cambios a nivel de subcompartimentos. Los compartimentos han cobrado relevancia como regiones dentro de compartimentos que tienen características que permiten definir más allá de la dicotomía de compartimento A o B. En un estudio que integra información de contactos genómicos con patrones de marcas epigenómicas y transcripción se identificaron 6 subcompartimentos que pueden desglosar diferencias entre regiones transcripcionalmente activas (compartimento A) e inactivas (compartimento B)¹¹⁰. Se han desarrollado algoritmos cuya función es la de inferir la segmentación en estos subcompartimentos partiendo únicamente de las matrices de contactos tales como SNIPER¹¹¹, Calder¹²⁷ incluido dHiC¹⁰⁴, utilizado en este trabajo. Estos algoritmos muestran que las diferencias en subcompartimentos son variables entre tipos celulares y están asociadas a la heterogeneidad epigenética y transcripcional entre diferentes tejidos. En un modelo de diferenciación celular, en el que ocurren cambios en la transcripción de genes se ha demostrado que transiciones dentro de subcompartimentos identificados con dHiC correlacionan con cambios sustanciales en la actividad transcripcional de los genes en estas regiones de transición¹⁰⁴.

Sin embargo, para poder concluir y robustecer las observaciones descritas en cuanto al cambio temporal de subcompartimentos para WAT de ratones alimentados con HFD será importante concluir el análisis en los diferentes tratamientos e integrar los datos topológicos con datos de cambios en la expresión de genes en las mismas condiciones. De confirmarse cambios a nivel de subcompartimentos asociados a cambios en la transcripción de genes el presente trabajo contribuiría también a la comprensión de procesos de regulación transcripcional a nivel de subcompartimentos que han recibido atención recientemente.

3.2 Dominios topológicamente asociados estables y subdominios dinámicos en el día y la noche

El siguiente nivel de estructuración del genoma que nos interesó fue el de los dominios topológicamente asociados o TADs. Observamos que los TADs de orden 1, muestran una mayor estabilidad temporal entre los puntos de muestreo. Esto concuerda con la observación a lo largo del ciclo diurno en hígado, en el que los TADs son estructuras altamente estables⁹⁶. Además, estas estructuras tienen fronteras con una mayor fuerza de aislamiento en comparación con fronteras de subdominios de órdenes 2 y 3, lo cual refuerza la observación de regiones del genoma que permanecen estables a lo largo del ciclo circadiano. Al analizar los subdominios anidados, de orden 2 y 3, encontramos una decreciente fuerza en el aislamiento de sus fronteras. Esto significa que las mismas permiten que crucen una mayor cantidad de contactos entre subdominios. Estos contactos al interior de dominios (orden 1) que cruzan entre los subdominios anidados, reestructurándolos de manera dependiente del día, pueden corresponder a contactos entre enhancers y promotores. Se han descrito evidencias que ligan mecanismos estructurales en el genoma a lo largo del día dentro de dominios topológicos en el hígado de ratón. Por ejemplo, la cohesina, que en conjunto con CTCF estructura fronteras de dominios, es importante para facilitar contactos entre enhancers y promotores¹²⁸. Particularmente esta observación se dio en una región que contiene un *super-enhancer* que establece contactos con CCGs. Por otro lado, un componente del reloj molecular REV-ERB α ejerce una función contraria, disrumpiendo asas de cromatina entre enhancers y promotores al reclutar complejos represores (NCoR-HDAC3) y evitando que proteínas que participan en la unión de estos elementos (BRD4 y MED1) se unan a la cromatina⁹⁵, todo en el contexto de dominios estables. Cabe mencionar también que se han descrito asas de cromatina tanto estables como rítmicas para los CCGs y que además muestran contactos entre genes con coherencia en su fase transcripcional^{96,129}. Esta combinación de estructuras estables y algunas con cierto dinamismo pueden ser las que generan la observación de nuestros datos en las que los subdominios, particularmente de orden 3 muestran cambios dependientes del momento del día.

Estas observaciones en contexto con los antecedentes descritos sugieren que las estructuras topológicas del genoma contenidas dentro de los dominios permiten cierto grado de dinamismo espaciotemporal en el WAT de animales alimentados con HFD. Considerando el enriquecimiento de genes implicados en procesos importantes en un contexto de obesidad consecuencia de la dieta sugiere que los mecanismos estructurales al interior de los TADs son importantes para la regulación de la expresión génica. Entre los genes que puede ser relevante prestar atención al comparar las diferentes dietas y el contexto circadiano están el receptor PPAR γ que integra el metabolismo y la

ritmicidad circadiana, genes codificantes para proteínas del complejo NF- κ B (*nfkb1* y *nfkb2*) y para TNF- α , fuertemente implicados en procesos inmunes, además de otros genes no sospechados.

Como se ha ido describiendo a lo largo de la discusión los datos acerca de la topología del genoma con los que podemos contrastar nuestros hallazgos son principalmente observaciones en hígado. Es por esta razón que será muy importante corroborar estas observaciones en el WAT y para el resto de las condiciones. El resto de las bibliotecas obtenidas (12 en total) serán analizadas de manera integral posteriormente como perspectiva del proyecto doctoral.

Todo lo discutido en esta tesis refuerza el aporte a la investigación que supone el presente trabajo al proveer de información novedosa, de la topología del genoma del WAT, a este punto bajo HFD, pero con la perspectiva de ampliarlo con los datos de la dieta control y la dieta restringida en tiempo. La relevancia del trabajo radica también en que todo el conjunto de datos genómicos permitirá hacer análisis exploratorios a partir de los cuales se aumentan las posibilidades de nuevas preguntas y proyectos de investigación científica con un alto impacto en tópicos de salud. Tales como la obesidad y el estudio de intervenciones para su tratamiento y prevención como es el caso de la alimentación restringida en tiempo.

X. Conclusiones

1. Los modelos de ratones bajo paradigmas de alimentación recapitulan los efectos adversos de las enfermedades metabólicas (HFD) o la adaptación metabólica incluso bajo desafíos nutricionales al promover la ritmicidad circadiana mediante la restricción temporal de la alimentación (TRF). En este sentido los modelos generados resultan relevantes para estudiar el impacto de la dieta en la enfermedad y en alternativas para tratarlas.
2. La segregación de cromatina en compartimentos no muestra un cambio considerable entre el día y la noche para el tejido adiposo blanco de ratones alimentados con HFD para los puntos de muestreo evaluados. Esto correlaciona con la disminución general en la ritmicidad como consecuencia de la alimentación alta en grasa descrita en la literatura.
3. Nuestros resultados sugieren que los TAD de orden 1 son más estables y pueden actuar como unidades estructurales y de regulación que permiten cierto nivel de dinamismo y ritmicidad en los subdominios anidados dentro de ellos.
4. Los genes que pueden estar regulados por la estructura del genoma 3D en el tejido adiposo blanco de ratones alimentados con dieta alta en grasa *ad libitum* coinciden con genes que son relevantes para la función del tejido adiposo blanco y que, además, previamente se ha reportado que participan en la obesidad y padecimientos metabólicos, tales como procesos inflamatorios, homeostasis energética, señalización hormonal y silenciamiento de genes por RNAs.
5. En nuestros datos hallamos enriquecido el motivo de unión para el factor PPAR como un posible regulador de los genes en dominios dependientes del tiempo circadiano. Este hallazgo remarca la relevancia de PPAR como un regulador maestro para el WAT que se ha descrito capaz de integrar la ritmicidad circadiana, la alimentación y el metabolismo.

XI. Perspectivas

La principal contribución del presente proyecto fue generar todo el conjunto de datos que permitirán el explorar e investigar cambios en la regulación transcripcional mediada por la organización tridimensional del genoma ante diferentes señales nutricionales y en un contexto circadiano. Ya que se cuenta con todas las bibliotecas secuenciadas se proyecta realizar un análisis comparativo con el conjunto completo de datos de los tres grupos: Dieta control, Dieta alta en grasa ad libitum y Dieta alta en grasa a los diferentes niveles de organización del genoma, incluidas las asas de cromatina. En este trabajo no se exploró con detalle este nivel de estructuración. Sin embargo, la cercanía en el espacio tridimensional de secuencias reguladoras distales con los promotores de sus genes blanco tiene mucha relevancia en la regulación génica, tan sólo para el genoma humano se estima hasta 1 millón de secuencias regulatorias distales para regular los aproximadamente 20,000 genes codificantes para proteína anotados en el genoma¹³⁰. Adicionalmente se ha descrito que existen asas de cromatina entre promotores y *enhancers* diferenciales a lo largo de las 24 horas del día⁹⁶ y también que pueden cambiar como producto de dietas obesogénicas⁹⁸. Por lo tanto, aunque no se haya incluido un análisis para identificar contactos entre *enhancers* y promotores de genes será muy importante considerarlo como perspectiva para los tres tratamientos generados en este trabajo y en el contexto circadiano.

Como perspectiva también resultará importante el integrar los datos aquí generados con otro tipo de datos genómicos, en particular datos de expresión génica y accesibilidad en los que se está trabajando a la par en el grupo de la Dra. Lorena Aguilar Arnal (Instituto de Investigaciones Biomédicas), colaboradora del proyecto.

Será fundamental contar con datos de expresión génica de WAT bajo los diferentes paradigmas de alimentación y en los mismos tiempos circadianos. Estos datos permitirán confirmar y caracterizar de una manera integral el papel en la regulación transcripcional de los descubrimientos en la topología genómica. Será importante también para identificar que procesos se encuentran sobre o sub-regulados en determinada dieta y tiempo del día. Específicamente para datos de Hi-C los datos de expresión también será muy importantes para orientar la señal de compartimentación emparejando las matrices de contacto con señal de RNA-seq de una misma dieta y hora del día.

Por otra parte, los datos de accesibilidad permitirán identificar los motivos de factores de transcripción que pueden estar dirigiendo programas transcripcionales específicos de las diferentes dietas en el WAT. El ATAC-seq es un protocolo relativamente sencillo que permite identificar

regiones accesibles debido a la ocupación de proteínas en la cromatina¹³¹. Además, el ATAC-seq permite alcanzar una resolución de pares de base por lo que permitirá dilucidar con gran precisión los motivos de factores transcripcionales enriquecidos en cada tratamiento y tiempos del día. El integrar los datos de ATAC-seq con datos de Hi-C permite enriquecer y robustecer los hallazgos. Por ejemplo, será posible realizar una búsqueda de factores en las fronteras de subdominios y asas de cromatina diferenciales para explorar algún factor que contribuya a reestructurar el genoma debido a las diferentes señales nutricionales y/o tiempo del día.

Finalmente, también existe la posibilidad de generar otro tipo de datos genómicos que contribuyan a caracterizar a mayor detalle la regulación transcripcional en las diferentes dietas. Por ejemplo, se puede integrar nuestro conjunto de datos con datos acerca de la distribución de marcas de histonas. Particularmente de aquellas asociadas a la actividad de elementos de regulación como la acetilación de la lisina veintisiete de la histona tres (H3K27ac). También resultaría relevante realizar inmunoprecipitación de cromatina para factores de transcripción candidatos identificados con los datos generados en este trabajo que regulen los programas transcripcionales detrás de los beneficios de la dieta restringida en tiempo.

XII. Anexos

Figuras Suplementarias

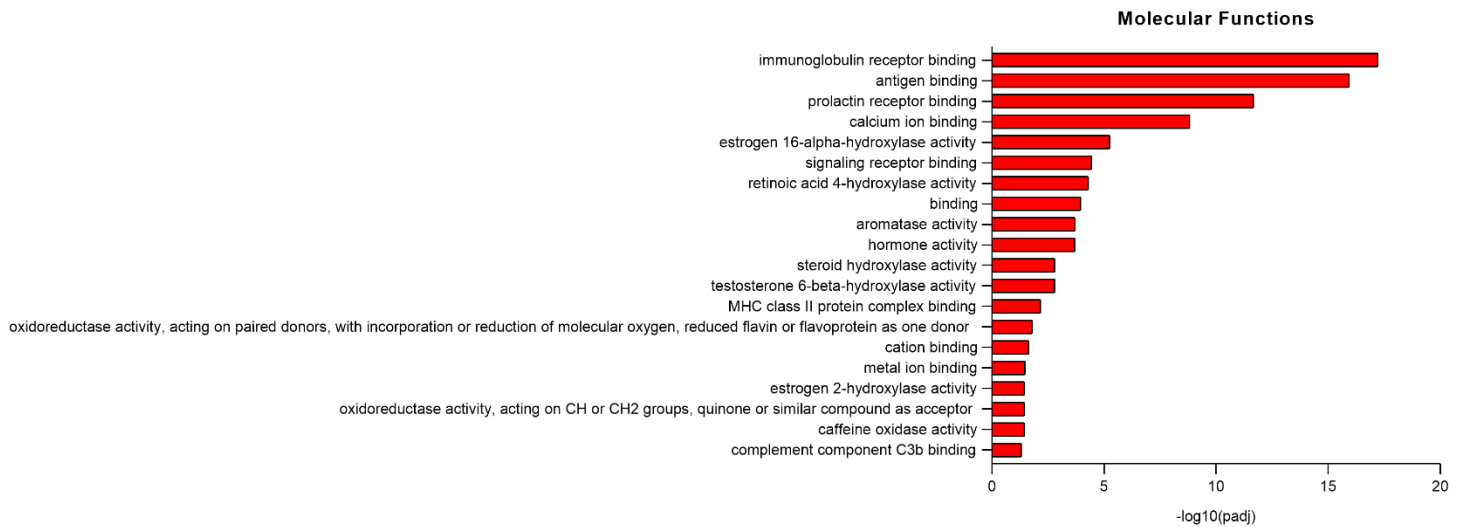
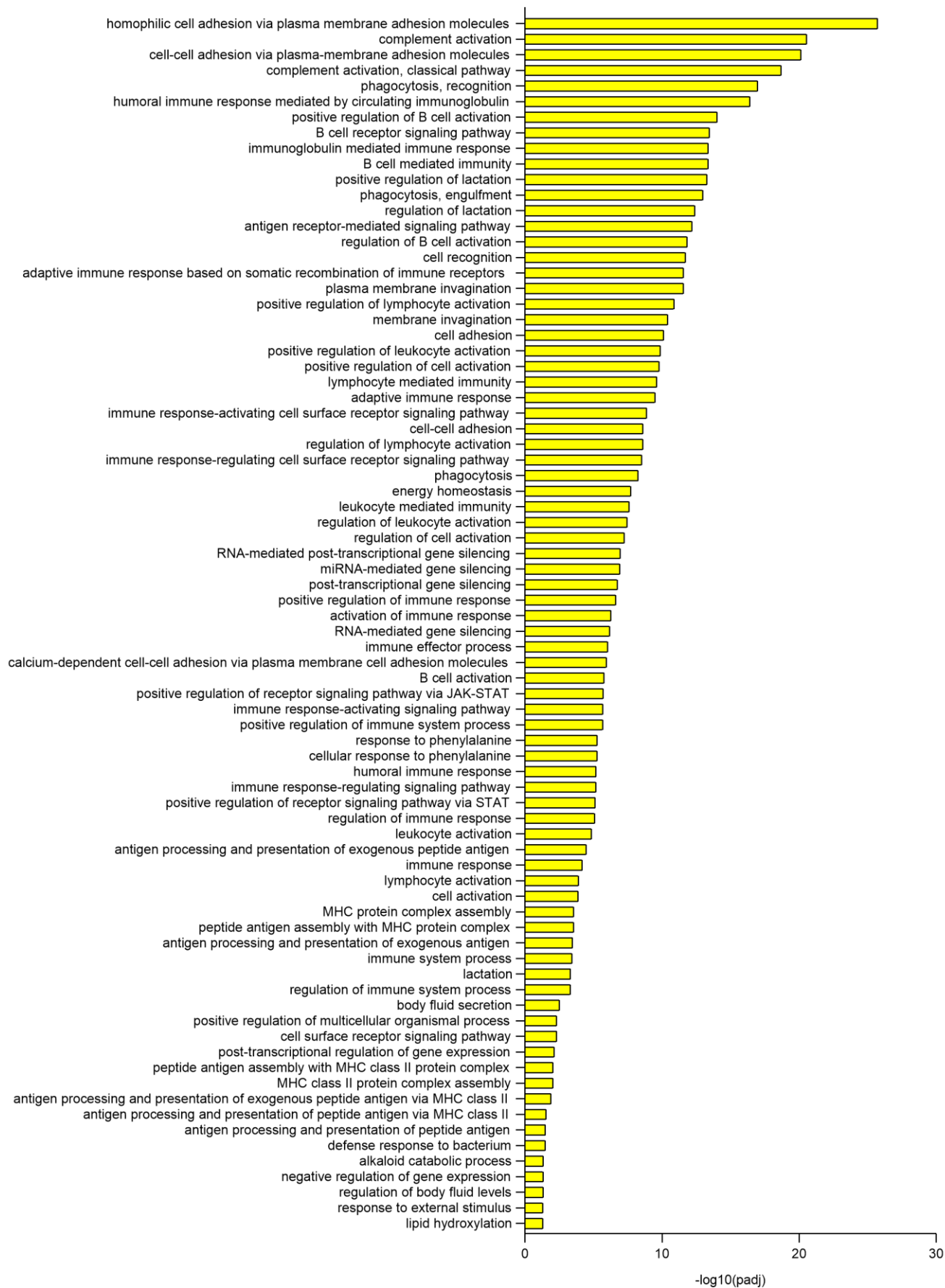


Figura suplementaria 1. Funciones moleculares enriquecidos de manera significativa ($p < 0.05$) en los genes dentro de los dominios que cambian entre tiempos circadianos. Destacan funciones inmunes, del metabolismo de moléculas lipídicas y procesos de señalización hormonal.

► **Figura suplementaria 2.** Procesos Biológicos enriquecidos de manera significativa ($p < 0.05$) en los genes dentro de los dominios que cambian entre tiempos circadianos. Destacan un gran número de procesos importantes para distintas células inmunes, incluidos macrófagos (Fagocitosis, adhesión célula-célula), homeostasis energética, Silenciamiento post-transcripcional por RNAs,

Biological Process



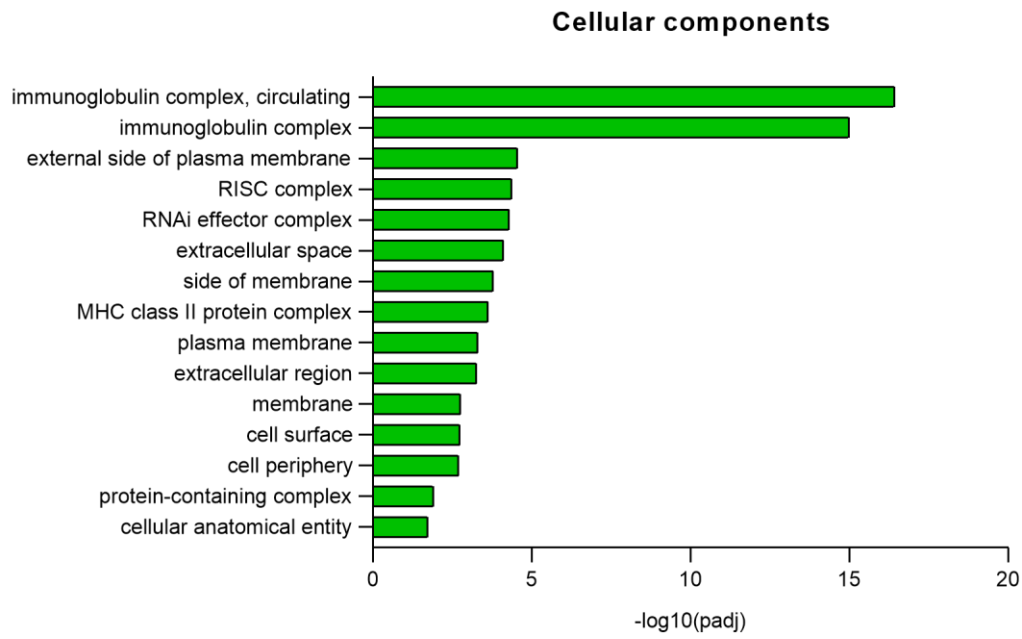


Figura suplementaria 3. Componentes celulares enriquecidos de manera significativa ($p < 0.05$) en los genes dentro de los dominios que cambian entre tiempos circadianos. Destacan complejos de inmunoglobulinas, El Complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), El complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC).

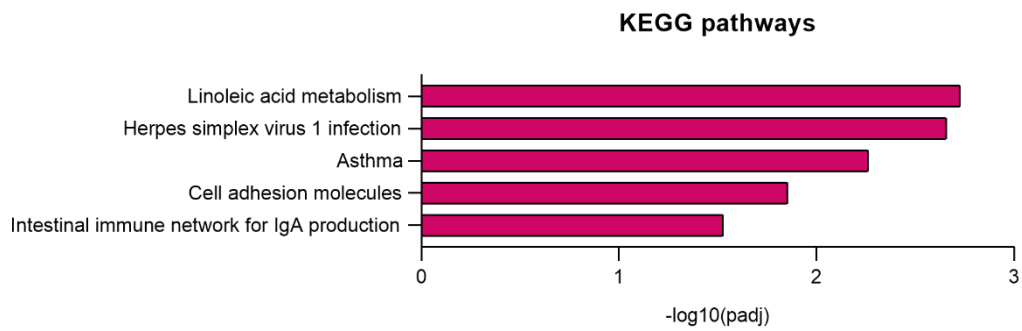


Figura suplementaria 4. Vías de KEGG enriquecidas de manera significativa ($p < 0.05$) en los genes dentro de los dominios que cambian entre tiempos circadianos. Destaca el metabolismo de ácido linoleico, componente importante de la dieta empleada aquí.

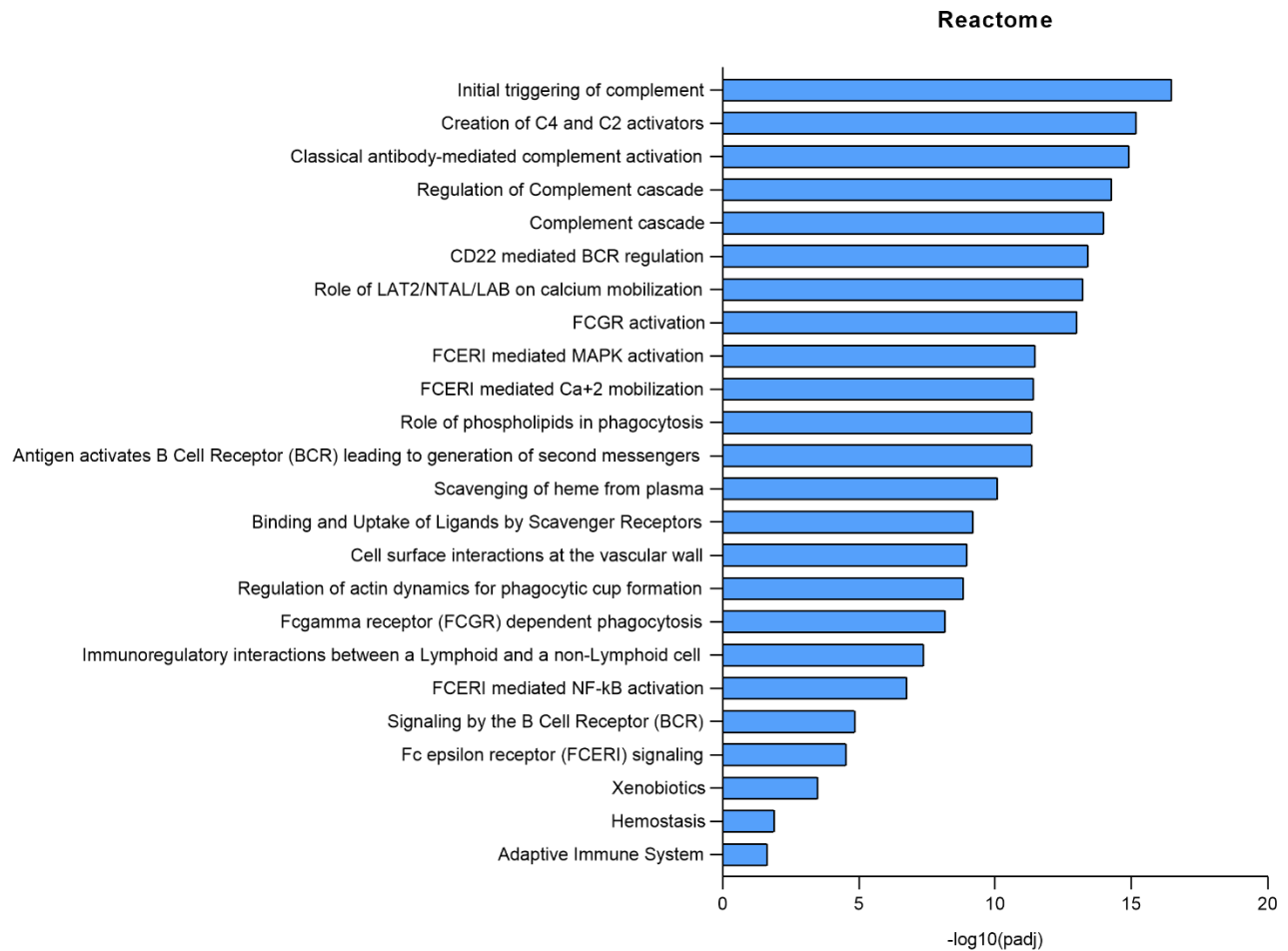


Figura suplementaria 5. Vías de reactoma enriquecidas de manera significativa ($p < 0.05$) en los genes dentro de los dominios que cambian entre tiempos circadianos. Destacan un enriquecimiento en procesos de sistema de complemento importante en procesos inflamatorios, fosfolípidos implicados en fagocitosis, y activación de NF κ B.

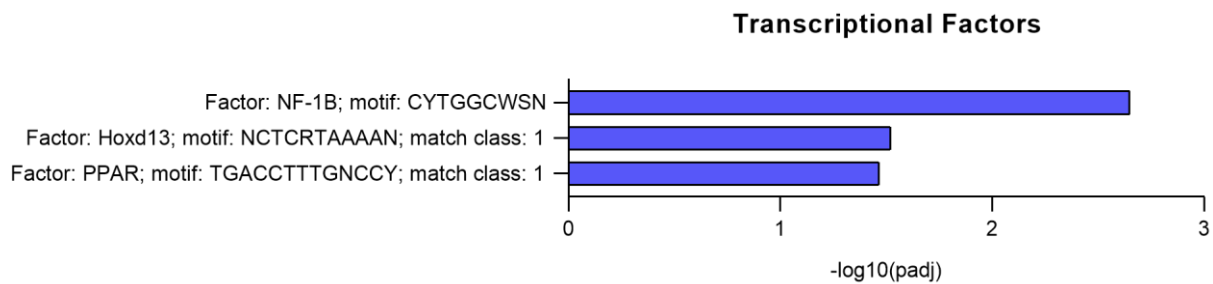


Figura suplementaria 6. Motivos de factores de transcripción enriquecidos de manera significativa ($p < 0.05$) en los genes dentro de los dominios que cambian entre tiempos circadianos. Destaca el motivo de PPAR, receptores que integran metabolismo y ritmicidad circadiana.

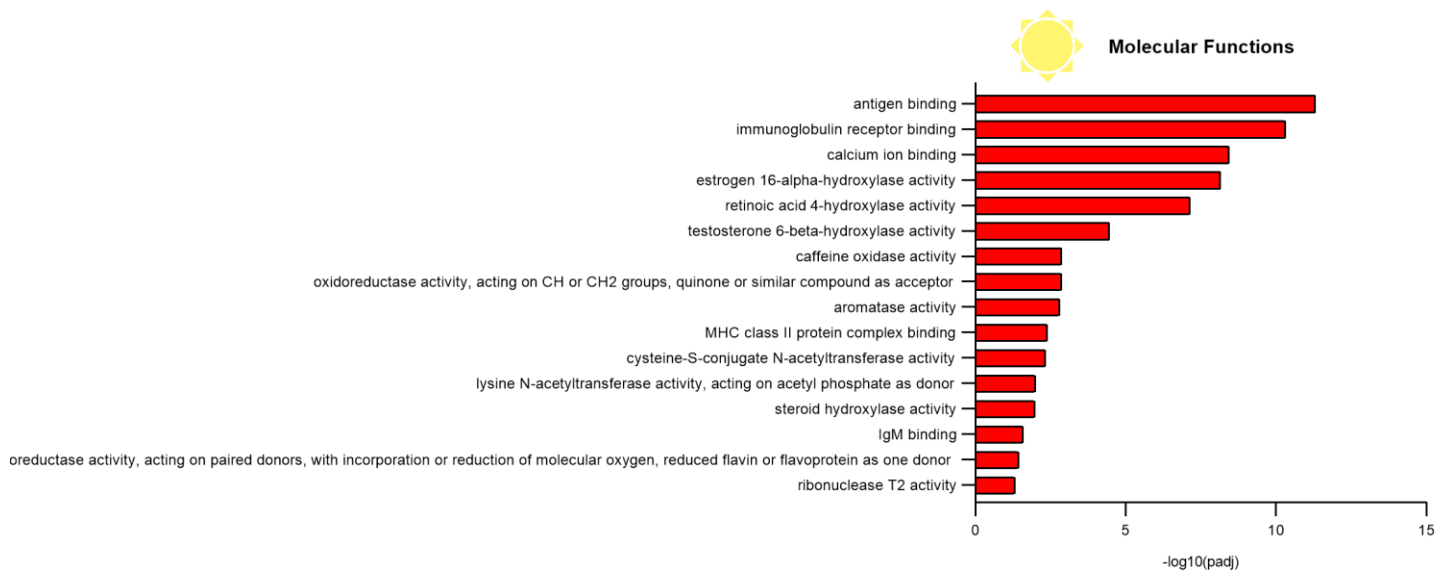


Figura suplementaria 7. Funciones moleculares enriquecidos de manera significativa ($p < 0.05$) en los genes dentro de los dominios exclusivos de ZT4. Destacan funciones de unión para procesos inmunes y actividad de hidroxilasas.

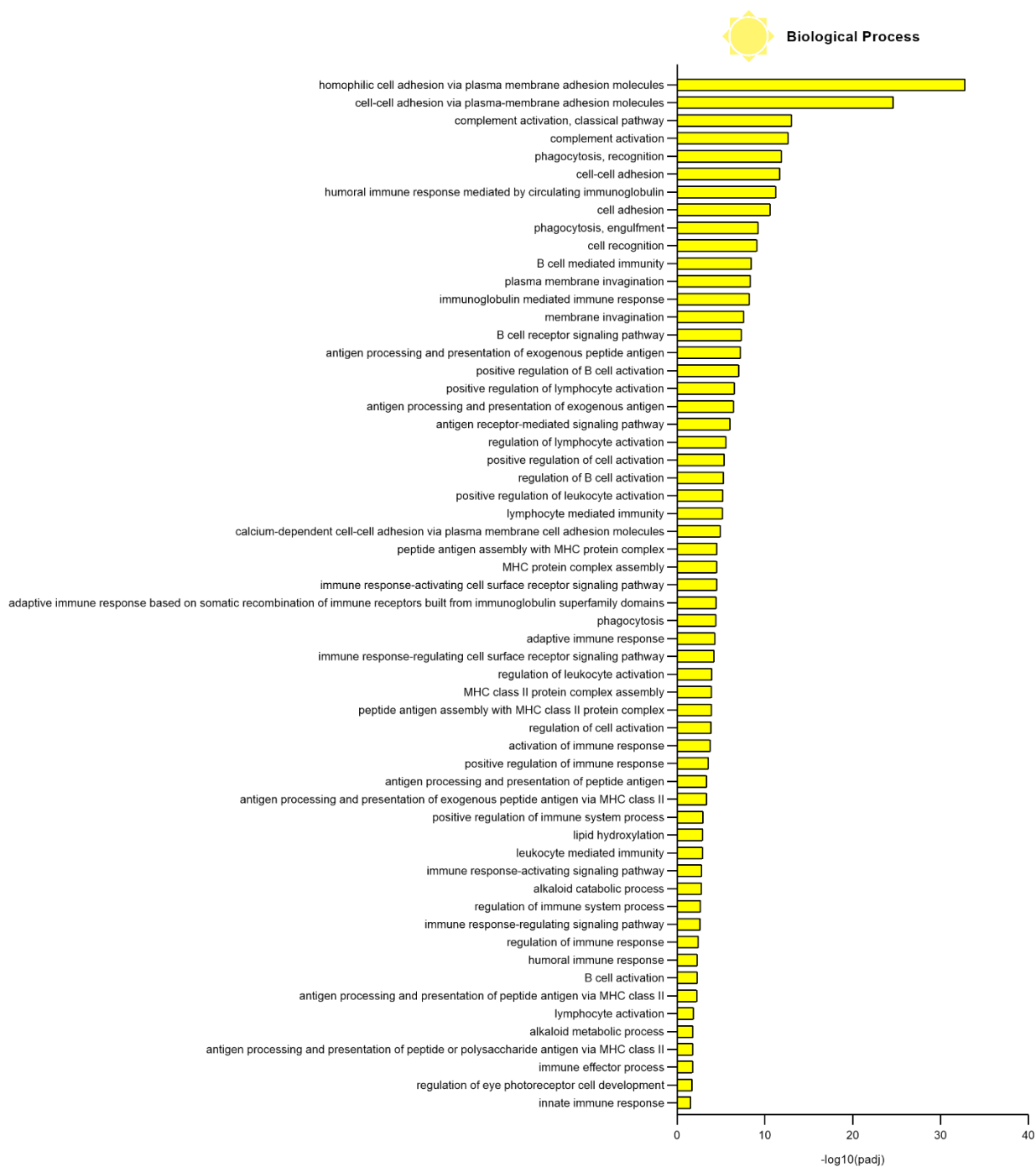


Figura suplementaria 8. Procesos Biológicos enriquecidos de manera significativa ($p < 0.05$) en los genes dentro de los dominios exclusivos de ZT4. Destacan procesos de respuestas inmunes como adhesión celular, fagocitosis, activación de complemento, presentación de antígenos. También se enriquecen procesos catabólicos y de hidroxilación de lípidos.

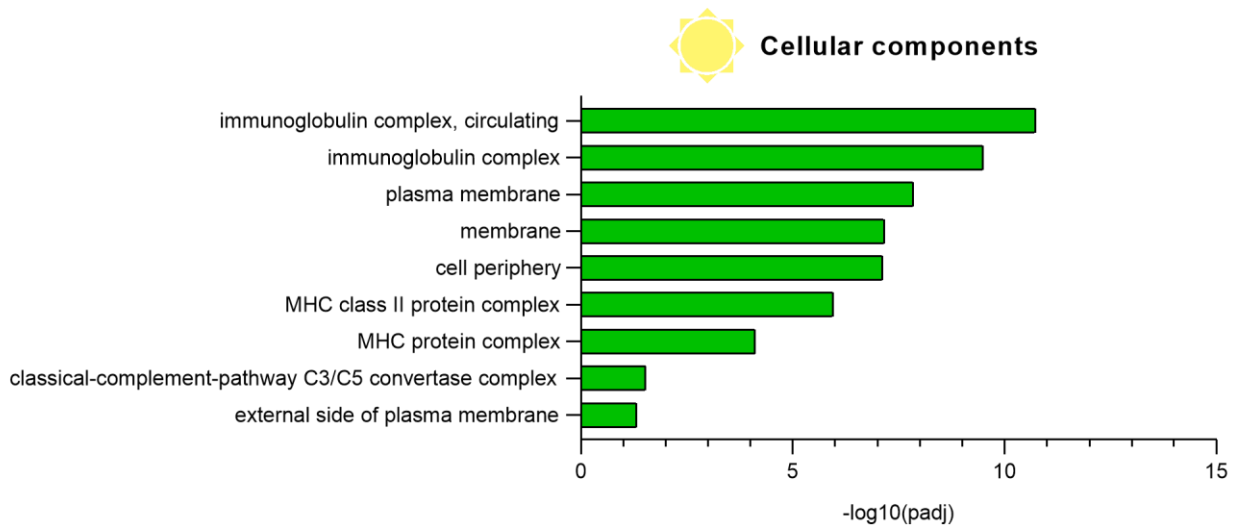


Figura suplementaria 9. Componentes celulares enriquecidos de manera significativa ($p < 0.05$) en los genes dentro de los dominios exclusivos de ZT4. Se destacan complejos inmunes.

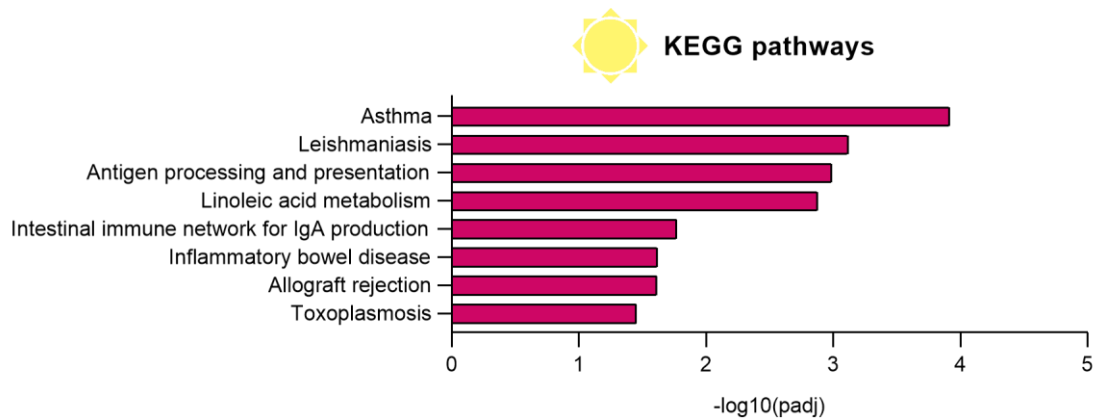


Figura suplementaria 10. Vías de KEGG enriquecidas de manera significativa ($p < 0.05$) en los genes dentro de los dominios exclusivos de ZT4. Se destacan procesamiento y presentación de antígenos y metabolismo de ácido linoleico.

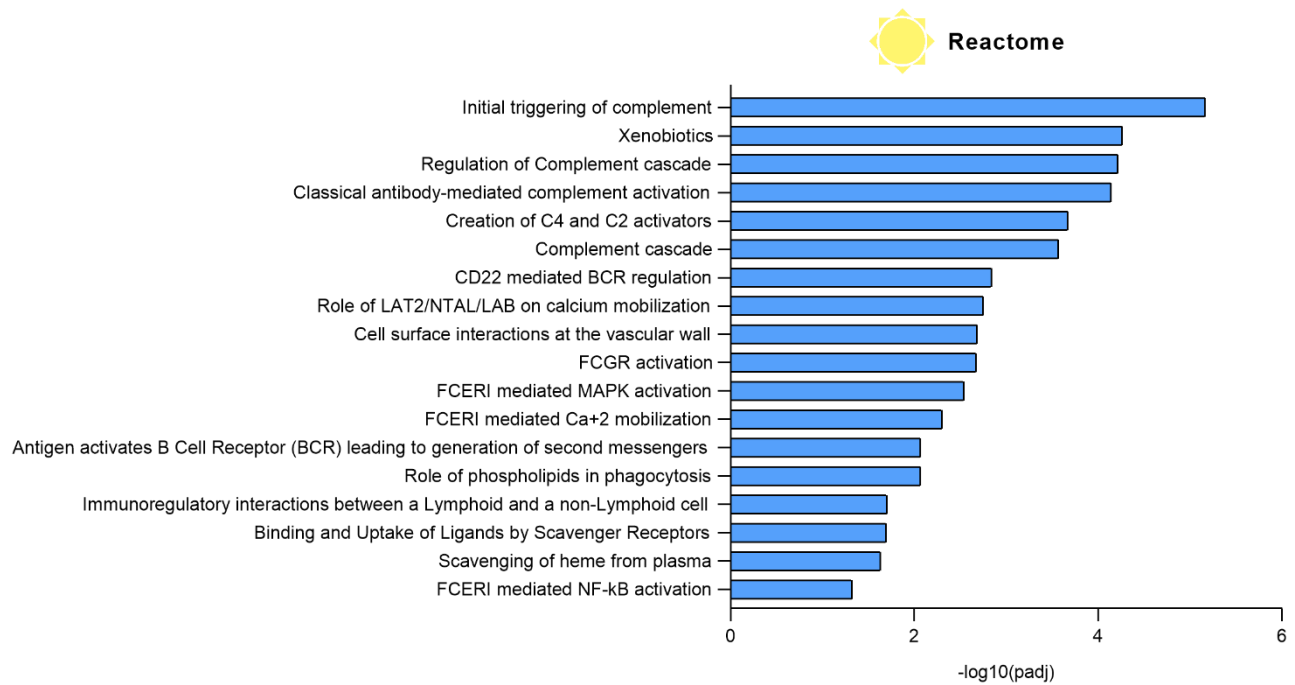


Figura suplementaria 11. Vías de reactoma enriquecidas de manera significativa ($p < 0.05$) en los genes dentro de los dominios exclusivos de ZT4. Destacan procesos de activación del sistema de complemento, activación de procesos inmunes, incluida la vía de NF κ B.

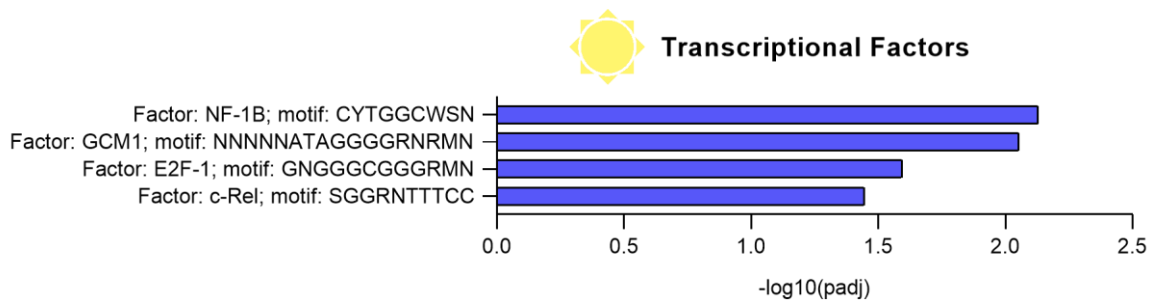


Figura suplementaria 12. Motivos de factores de transcripción enriquecidos de manera significativa ($p < 0.05$) en los genes dentro de los dominios exclusivos de ZT4. Destaca el motivo para c-Rel que es miembro de la familia proteica del complejo NF κ B.

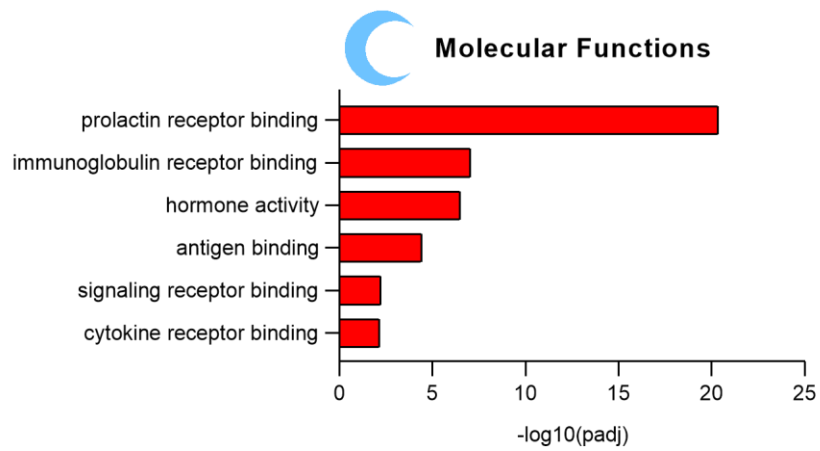


Figura suplementaria 13. Funciones moleculares enriquecidos de manera significativa ($p < 0.05$) en los genes dentro de los dominios exclusivos de ZT16. Se encuentran enriquecidos procesos de unión para señalización celular y procesos inmunes.



Figura suplementaria 14. Procesos Biológicos enriquecidos de manera significativa ($p < 0.05$) en los genes dentro de los dominios exclusivos de ZT16. Destacan en primer lugar la homeostasis energética, procesos de señalización y silenciamiento génico por RNAs además de procesos inmunes.

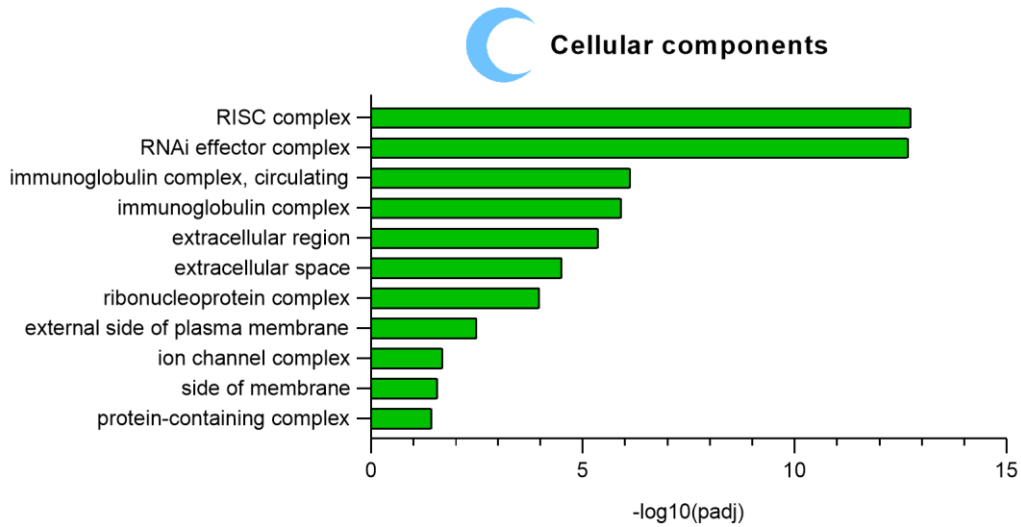


Figura suplementaria 15. Componentes celulares enriquecidos de manera significativa ($p < 0.05$) en los genes dentro de los dominios exclusivos de ZT16. Destacan complejos de silenciamiento post-transcripcional por RNAs y de inmunoglobulinas.

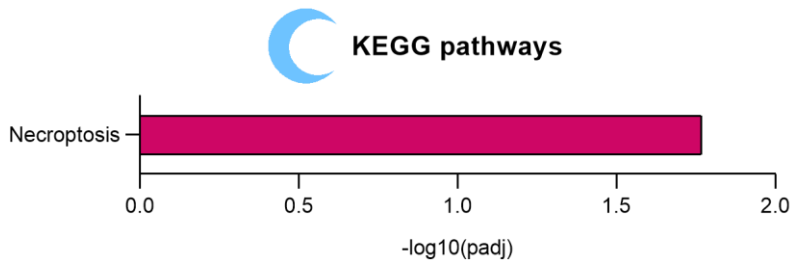


Figura suplementaria 16. Vía de KEGG enriquecidas de manera significativa ($p < 0.05$) en los genes dentro de los dominios exclusivos de ZT16. Se trata de el proceso de necroptosis, cabe mencionar que la muerte celular es una de las características del WAT disfuncional por dietas altas en grasa.

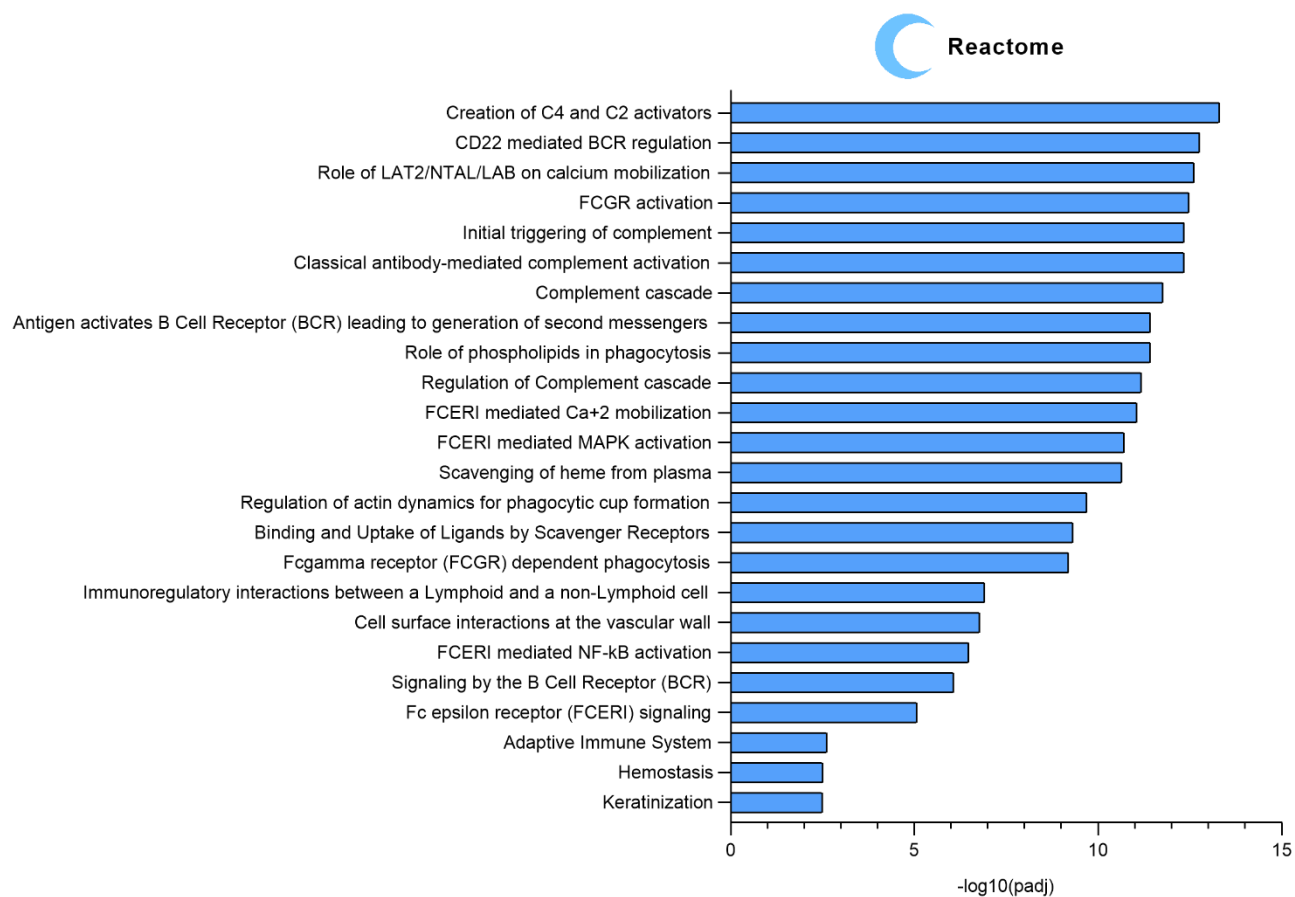


Figura suplementaria 17. Vías de reactoma enriquecidas de manera significativa ($p < 0.05$) en los genes dentro de los dominios exclusivos de ZT16. Destacan vías de señalización y del sistema de complemento.

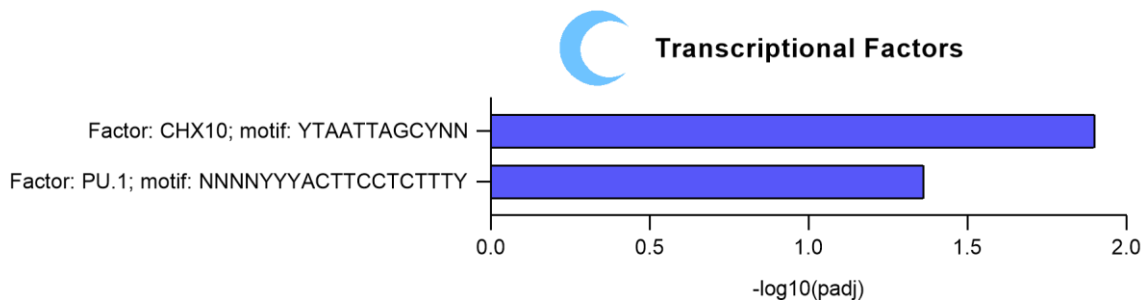


Figura suplementaria 18. Motivos de factores de transcripción enriquecidos de manera significativa ($p < 0.05$) en los genes dentro de los dominios exclusivos de ZT16. Destaca el motivo para el factor PU.1 que se ha descrito su papel en el desarrollo de resistencia a insulina en ratones alimentados con HFD¹³².

Composición de dietas empleadas

2018S



Teklad Global 18% Protein Rodent Diet (Sterilizable)

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

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

Standard Product Form: *Pellet*

Macronutrients		
Crude Protein	%	18.6
Fat (ether extract) ^a	%	6.2
Carbohydrate (available) ^b	%	44.2
Crude Fiber	%	3.5
Neutral Detergent Fiber ^c	%	14.7
Ash	%	5.3
Energy Density ^d	kcal/g (kJ/g)	3.1 (13.0)
Calories from Protein	%	24
Calories from Fat	%	18
Calories from Carbohydrate	%	58

Minerals		
Calcium	%	1.0
Phosphorus	%	0.7
Non-Phytate Phosphorus	%	0.4
Sodium	%	0.2
Potassium	%	0.6
Chloride	%	0.4
Magnesium	%	0.2
Zinc	mg/kg	70
Manganese	mg/kg	100
Copper	mg/kg	15
Iodine	mg/kg	6
Iron	mg/kg	200
Selenium	mg/kg	0.23

Amino Acids		
Aspartic Acid	%	1.4
Glutamic Acid	%	3.4
Alanine	%	1.1
Glycine	%	0.8
Threonine	%	0.7
Proline	%	1.6
Serine	%	1.1
Leucine	%	1.8
Isoleucine	%	0.8
Valine	%	0.9
Phenylalanine	%	1.0
Tyrosine	%	0.6
Methionine	%	0.6
Cystine	%	0.3
Lysine	%	1.1
Histidine	%	0.4
Arginine	%	1.0
Tryptophan	%	0.2

Vitamins		
Vitamin A ^{e,†}	IU/g	30.0
Vitamin D ₃ ^{e,‡}	IU/g	2.0
Vitamin E	IU/kg	135
Vitamin K ₃ (menadione)	mg/kg	100
Vitamin B ₁ (thiamin)	mg/kg	117
Vitamin B ₂ (riboflavin)	mg/kg	27
Niacin (nicotinic acid)	mg/kg	115
Vitamin B ₆ (pyridoxine)	mg/kg	26
Pantothenic Acid	mg/kg	140
Vitamin B ₁₂ (cyanocobalamin)	mg/kg	0.15
Biotin	mg/kg	0.90
Folate	mg/kg	9
Choline	mg/kg	1200

Fatty Acids		
C16:0 Palmitic	%	0.7
C18:0 Stearic	%	0.2
C18:1ω9 Oleic	%	1.2
C18:2ω6 Linoleic	%	3.1
C18:3ω3 Linolenic	%	0.3
Total Saturated	%	0.9
Total Monounsaturated	%	1.3
Total Polyunsaturated	%	3.4

Other		
Cholesterol	mg/kg	--

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

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

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

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

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

[†] 1 IU vitamin A = 0.3 µg retinol

[‡] 1 IU vitamin D = 25 ng cholecalciferol

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

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

Teklad Diets are designed and manufactured for research purposes only.



© 2015 Envigo

0915

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

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

58Y1

DESCRIPTION

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

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 #
Meal	1810473
1/2" Pellet, Irradiated	56833
1/2" Pellet	58126

*Other Forms Available By Request

INGREDIENTS

Lard	31.6600
Casein - Vitamin Free	25.8450
Maltodextrin	16.1530
Sucrose	8.8910
Powdered Cellulose	6.4610
Soybean Oil	3.2310
Potassium Citrate, Tribasic Monohydrate	2.1320
Dicalcium 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
Blue Dye	0.0060

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

DIO Rodent Purified Diet w/10% Energy From Fat - Yellow

1/2" Pellet - Catalog # 58124 (58Y2)
Meal - Catalog # 56834 (58Y2)

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

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

FEEDING DIRECTIONS

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

CAUTION:

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

NUTRITIONAL PROFILE ¹

Protein, %	23.6	Minerals	
Arginine, %	0.90	Calcium, %	0.78
Histidine, %	0.67	Phosphorus, %	0.59
Isoleucine, %	1.24	Phosphorus (available), %	0.59
Leucine, %	2.24	Potassium, %	0.77
Lysine, %	1.88	Magnesium, %	0.07
Methionine, %	0.67	Sodium, %	0.13
Cystine, %	0.48	Chlorine, %	0.20
Phenylalanine, %	1.24	Fluorine, ppm	1.2
Tyrosine, %	1.31	Iron, ppm	60
Threonine, %	1.00	Zinc, ppm	46
Tryptophan, %	0.29	Manganese, ppm	76
Valine, %	1.47	Copper, ppm	7.8
Alanine, %	0.71	Cobalt, ppm	0.0
Aspartic Acid, %	1.66	Iodine, ppm	0.27
Glutamic Acid, %	5.28	Chromium, ppm	2.6
Glycine, %	0.50	Molybdenum, ppm	2.11
Proline, %	3.04	Selenium, ppm	0.21
Serine, %	1.43		
Taurine, %	0.00		
Fat, %	34.9	Vitamins	
Cholesterol, ppm	301	Vitamin A, IU/g	5.2
Linoleic Acid, %	4.70	Vitamin D-3 (added), IU/g	1.3
Linolenic Acid, %	0.39	Vitamin E, IU/kg	64.6
Arachidonic Acid, %	0.06	Vitamin K (as menadione), ppm	0.65
Omega-3 Fatty Acids, %	0.39	Thiamin Hydrochloride, ppm	7.8
Total Saturated Fatty Acids, %	13.68	Riboflavin, ppm	7.8
Total Monounsaturated Fatty Acids, %	14.00	Niacin, ppm	39
		Pantothenic Acid, ppm	19
		Folic Acid, ppm	2.6
		Pyridoxine, ppm	7.4
Fiber (max), %	6.5	Biotin, ppm	0.3
		Vitamin B-12, mcg/kg	13
Carbohydrates, %	25.9	Choline Chloride, ppm	1,290
		Ascorbic Acid, ppm	0.0
Energy (kcal/g) ²	5.16		
From:	kcal	%	
Protein	0.943	18.3	
Fat (ether extract)	3.140	60.9	
Carbohydrates	1.037	20.1	

1. Based on the latest ingredient analysis information. Since nutrient composition of natural ingredients varies, 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.

Soluciones para HiC

Buffer de lisis:

- 10mM Tris-HCl pH8
- 0.2% Igepal CA-420
- 10 mM NaCl

Tween Buffer 1x, TB:

- 5mM Tris-HCl pH8
- 0.5mM EDTA
- 1M NaCl
- 0.05% Tween 20

2x No Tween Buffer, 2x NTB:

- 10mM Tris-HCl pH8
- 1mM EDTA
- 2M NaCl

1x No Tween Buffer, NTB:

- 5mM Tris-HCl pH8
- 0.5mM EDTA
- 1M NaCl

0.5x Tween Buffer, 0.5x TB:

- 2.5mM Tris-HCl pH8
- 0.25mM EDTA
- 5mM NaCl
- 0.025% Tween 20

Oligonucleótidos Utilizados

Tabla 2. oligonucleótidos empleados para los controles de PCR para validar los experimentos de HiC.

Identificador	Secuencia
mHist1h4i_R1	CGGTTTACATACTGAAAACATTC
mHist1h4i_R2	GACAATGTGGCATGTGACTA
mHist1h2bf_R	GAACTCGTTTGTGAACGACA

XIII. Referencias

- 1 Alberti, K. G. M. M. *et al.* Harmonizing the Metabolic Syndrome. *Circulation* **120**, 1640-1645 (2009). <https://doi.org:10.1161/circulationaha.109.192644>
- 2 Saklayen, M. G. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Current Hypertension Reports* **20** (2018). <https://doi.org:10.1007/s11906-018-0812-z>
- 3 Kinlen, D., Cody, D. & O'Shea, D. Complications of obesity. *QJM: An International Journal of Medicine* **111**, 437-443 (2018). <https://doi.org:10.1093/qjmed/hcx152>
- 4 Shamah-Levy, T. *et al.* Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2021 sobre Covid-19. Resultados nacionales. *Instituto Nacional de Salud Pública* (2022).
- 5 Hall, K. D. *et al.* Ultra-Processed Diets Cause Excess Calorie Intake and Weight Gain: An Inpatient Randomized Controlled Trial of Ad Libitum Food Intake. *Cell Metabolism* **30**, 67-77.e63 (2019). <https://doi.org:10.1016/j.cmet.2019.05.008>
- 6 Castro-Barquero, S., Ruiz-León, A. M., Sierra-Pérez, M., Estruch, R. & Casas, R. Dietary Strategies for Metabolic Syndrome: A Comprehensive Review. *Nutrients* **12**, 2983 (2020). <https://doi.org:10.3390/nu12102983>
- 7 Longo, M. *et al.* Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, 2358 (2019). <https://doi.org:10.3390/ijms20092358>
- 8 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). <https://doi.org:10.1159/000453317>
- 9 Sakers, A., De Siqueira, M. K., Seale, P. & Villanueva, C. J. Adipose-tissue plasticity in health and disease. *Cell* **185**, 419-446 (2022). <https://doi.org:https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.016>
- 10 Vázquez-Vela, M. E. F., Torres, N. & Tovar, A. R. White Adipose Tissue as Endocrine Organ and Its Role in Obesity. *Archives of Medical Research* **39**, 715-728 (2008). <https://doi.org:https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2008.09.005>
- 11 Funcke, J.-B. & Scherer, P. E. Beyond adiponectin and leptin: adipose tissue-derived mediators of inter-organ communication. *Journal of Lipid Research* **60**, 1648-1697 (2019). <https://doi.org:10.1194/jlr.r094060>
- 12 Vishvanath, L. & Gupta, R. K. Contribution of adipogenesis to healthy adipose tissue expansion in obesity. *Journal of Clinical Investigation* **129**, 4022-4031 (2019). <https://doi.org:10.1172/jci129191>
- 13 Spalding, K. L. *et al.* Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* **453**, 783-787 (2008). <https://doi.org:10.1038/nature06902>
- 14 Hotamisligil, G. S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* **444**, 860-867 (2006). <https://doi.org:10.1038/nature05485>
- 15 Lumeng, C. N. & Saltiel, A. R. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *Journal of Clinical Investigation* **121**, 2111-2117 (2011). <https://doi.org:10.1172/jci57132>
- 16 Lumeng, C. N., Bodzin, J. L. & Saltiel, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *Journal of Clinical Investigation* **117**, 175-184 (2007). <https://doi.org:10.1172/JCI29881>
- 17 Cinti, S. *et al.* Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *Journal of Lipid Research* **46**, 2347-2355 (2005). <https://doi.org:10.1194/jlr.m500294-jlr200>
- 18 Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S. & Spiegelman, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* **259**, 87-91 (1993). <https://doi.org:10.1126/science.7678183>
- 19 Romano, M. *et al.* Association of Inflammation Markers with Impaired Insulin Sensitivity and Coagulative Activation in Obese Healthy Women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **88**, 5321-5326 (2003). <https://doi.org:10.1210/jc.2003-030508>
- 20 Taylor, A. W., Ku, N. O. & Mortensen, R. F. Regulation of cytokine-induced human C-reactive protein production by transforming growth factor- β 1. *Journal of Immunology* **145**, 2507-2513 (1990).

- 21 Fantuzzi, G. Adiponectin and inflammation: Consensus and controversy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **121**, 326-330 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.10.018>
- 22 Turer, A. T. *et al.* Adipose tissue mass and location affect circulating adiponectin levels. *Diabetologia* **54**, 2515-2524 (2011). <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2252-z>
- 23 Obradovic, M. *et al.* Leptin and Obesity: Role and Clinical Implication. *Frontiers in Endocrinology* **12**, 563 (2021).
- 24 Arner, P. *et al.* Dynamics of human adipose lipid turnover in health and metabolic disease. *Nature* **478**, 110-113 (2011). <https://doi.org/10.1038/nature10426>
- 25 Liu, Q. *et al.* Is shift work associated with a higher risk of overweight or obesity? A systematic review of observational studies with meta-analysis. *International Journal of Epidemiology* **47**, 1956-1971 (2018). <https://doi.org/10.1093/ije/dyy079>
- 26 Knutsson, A. & Kempe, A. Shift work and diabetes--a systematic review. *Chronobiol Int* **31**, 1146-1151 (2014). <https://doi.org/10.3109/07420528.2014.957308>
- 27 Gill, S. & Panda, S. A Smartphone App Reveals Erratic Diurnal Eating Patterns in Humans that Can Be Modulated for Health Benefits. *Cell Metabolism* **22**, 789-798 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.005>
- 28 Gupta, N. J., Kumar, V. & Panda, S. A camera-phone based study reveals erratic eating pattern and disrupted daily eating-fasting cycle among adults in India. *PLOS ONE* **12**, e0172852 (2017). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172852>
- 29 Di Francesco, A., Di Germanio, C., Bernier, M. & De Cabo, R. A time to fast. *Science* **362**, 770-775 (2018). <https://doi.org/10.1126/science.aau2095>
- 30 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 Metabolism* **27**, 1212-1221.e1213 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.04.010>
- 31 Hutchison, A. T. *et al.* Time-Restricted Feeding Improves Glucose Tolerance in Men at Risk for Type 2 Diabetes: A Randomized Crossover Trial. *Obesity* (2019). <https://doi.org/10.1002/oby.22449>
- 32 Wilkinson, M. J. *et al.* Ten-Hour Time-Restricted Eating Reduces Weight, Blood Pressure, and Atherogenic Lipids in Patients with Metabolic Syndrome. *Cell Metabolism* **31**, 92-104.e105 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.11.004>
- 33 Hatori, M. *et al.* Time-Restricted Feeding without Reducing Caloric Intake Prevents Metabolic Diseases in Mice Fed a High-Fat Diet. *Cell Metabolism* **15**, 848-860 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.019>
- 34 Chaix, A., Zarrinpar, A., Miu, P. & Panda, S. Time-Restricted Feeding Is a Preventative and Therapeutic Intervention against Diverse Nutritional Challenges. *Cell Metabolism* **20**, 991-1005 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.11.001>
- 35 Olsen, M. K., Choi, M. H., Kulseng, B., Zhao, C.-M. & Chen, D. Time-restricted feeding on weekdays restricts weight gain: A study using rat models of high-fat diet-induced obesity. *Physiology & Behavior* **173**, 298-304 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.02.032>
- 36 Woodie, L. N. *et al.* Restricted feeding for 9h in the active period partially abrogates the detrimental metabolic effects of a Western diet with liquid sugar consumption in mice. *Metabolism* **82**, 1-13 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.12.004>
- 37 Pittendrigh, C. S. Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu Rev Physiol* **55**, 16-54 (1993). <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.55.030193.000313>
- 38 Albrecht, U. & Eichele, G. The mammalian circadian clock. *Current Opinion in Genetics & Development* **13**, 271-277 (2003). [https://doi.org/10.1016/s0959-437x\(03\)00055-8](https://doi.org/10.1016/s0959-437x(03)00055-8)
- 39 Pittendrigh, C. S. Circadian Rhythms and the Circadian Organization of Living Systems. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **25**, 159-184 (1960). <https://doi.org/10.1101/sqb.1960.025.01.015>
- 40 Agostinelli, F., Ceglia, N., Shahbaba, B., Sassone-Corsi, P. & Baldi, P. What time is it? Deep learning approaches for circadian rhythms. *Bioinformatics* **32**, i8-i17 (2016). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw243>

- 41 Hastings, M. H., Maywood, E. S. & Brancaccio, M. Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Nature Reviews Neuroscience* **19**, 453-469 (2018). <https://doi.org:10.1038/s41583-018-0026-z>
- 42 Reinke, H. & Asher, G. Crosstalk between metabolism and circadian clocks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **20**, 227-241 (2019). <https://doi.org:10.1038/s41580-018-0096-9>
- 43 Baron, K. G. & Reid, K. J. Circadian misalignment and health. *International Review of Psychiatry* **26**, 139-154 (2014). <https://doi.org:10.3109/09540261.2014.911149>
- 44 Petrenko, V. & Dibner, C. Circadian orchestration of insulin and glucagon release. *Cell Cycle* **16**, 1141-1142 (2017). <https://doi.org:10.1080/15384101.2017.1326768>
- 45 Polonsky, K. S., Given, B. D. & Van Cauter, E. Twenty-four-hour profiles and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects. *Journal of Clinical Investigation* **81**, 442-448 (1988). <https://doi.org:10.1172/jci113339>
- 46 Stenvers, D. J., Scheer, F. A. J. L., Schrauwen, P., La Fleur, S. E. & Kalsbeek, A. Circadian clocks and insulin resistance. *Nature Reviews Endocrinology* **15**, 75-89 (2019). <https://doi.org:10.1038/s41574-018-0122-1>
- 47 Kalsbeek, A. *et al.* The Suprachiasmatic Nucleus Generates the Diurnal Changes in Plasma Leptin Levels. *Endocrinology* **142**, 2677-2685 (2001). <https://doi.org:10.1210/endo.142.6.8197>
- 48 Natalucci, G., Riedl, S., Gleiss, A., Zidek, T. & Frisch, H. Spontaneous 24-h ghrelin secretion pattern in fasting subjects: maintenance of a meal-related pattern. *European Journal of Endocrinology* **152**, 845-850 (2005). <https://doi.org:10.1530/eje.1.01919>
- 49 Désir, D. *et al.* Circadian and Ultradian Variations of ACTH and Cortisol Secretion. *Hormones* **13**, 302-316 (1980). <https://doi.org:10.1159/000179297>
- 50 Patterson, R. E. & Sears, D. D. Metabolic Effects of Intermittent Fasting. *Annual Review of Nutrition* **37**, 371-393 (2017). <https://doi.org:10.1146/annurev-nutr-071816-064634>
- 51 Greenwell, B. J. *et al.* Rhythmic Food Intake Drives Rhythmic Gene Expression More Potently than the Hepatic Circadian Clock in Mice. *Cell Reports* **27**, 649-657.e645 (2019). <https://doi.org:10.1016/j.celrep.2019.03.064>
- 52 Davidson, A. J., Poole, A. S., Yamazaki, S. & Menaker, M. Is the food-entrainable circadian oscillator in the digestive system? *Genes, Brain and Behavior* **2**, 32-39 (2003). <https://doi.org:10.1034/j.1601-183x.2003.00005.x>
- 53 Damiola, F. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes & Development* **14**, 2950-2961 (2000). <https://doi.org:10.1101/gad.183500>
- 54 Stokkan, K. A., Yamazaki, S., Tei, H., Sakaki, Y. & Menaker, M. Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* **291**, 490-493 (2001). <https://doi.org:10.1126/science.291.5503.490>
- 55 Kolbe, I., Leinweber, B., Brandenburger, M. & Oster, H. Circadian clock network desynchrony promotes weight gain and alters glucose homeostasis in mice. *Mol Metab* **30**, 140-151 (2019). <https://doi.org:10.1016/j.molmet.2019.09.012>
- 56 Yamamuro, D. *et al.* Peripheral circadian rhythms in the liver and white adipose tissue of mice are attenuated by constant light and restored by time-restricted feeding. *PLOS ONE* **15**, e0234439 (2020). <https://doi.org:10.1371/journal.pone.0234439>
- 57 Le Minh, N. Glucocorticoid hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral circadian oscillators. *The EMBO Journal* **20**, 7128-7136 (2001). <https://doi.org:10.1093/emboj/20.24.7128>
- 58 Kohsaka, A. *et al.* High-Fat Diet Disrupts Behavioral and Molecular Circadian Rhythms in Mice. *Cell Metabolism* **6**, 414-421 (2007). <https://doi.org:10.1016/j.cmet.2007.09.006>
- 59 Dyar, K. A. *et al.* Atlas of Circadian Metabolism Reveals System-wide Coordination and Communication between Clocks. *Cell* **174**, 1571-1585.e1511 (2018). <https://doi.org:10.1016/j.cell.2018.08.042>
- 60 Chaix, A., Manoogian, E. N. C., Melkani, G. C. & Panda, S. Time-Restricted Eating to Prevent and Manage Chronic Metabolic Diseases. *Annual Review of Nutrition* **39**, 291-315 (2019). <https://doi.org:10.1146/annurev-nutr-082018-124320>

- 61 Moro, T. *et al.* Effects of eight weeks of time-restricted feeding (16/8) on basal metabolism, maximal strength, body composition, inflammation, and cardiovascular risk factors in resistance-trained males. *Journal of Translational Medicine* **14** (2016). <https://doi.org:10.1186/s12967-016-1044-0>
- 62 Carroll, R. G., Timmons, G. A., Cervantes-Silva, M. P., Kennedy, O. D. & Curtis, A. M. Immunometabolism around the Clock. *Trends in Molecular Medicine* **25**, 612-625 (2019). <https://doi.org:10.1016/j.molmed.2019.04.013>
- 63 Takahashi, J. S. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nature Reviews Genetics* **18**, 164-179 (2017). <https://doi.org:10.1038/nrg.2016.150>
- 64 Ueda, H. R. *et al.* System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nature Genetics* **37**, 187-192 (2005). <https://doi.org:10.1038/ng1504>
- 65 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 16219-16224 (2014). <https://doi.org:10.1073/pnas.1408886111>
- 66 Zhu, Q. & Belden, W. J. Molecular Regulation of Circadian Chromatin. *Journal of Molecular Biology* **432**, 3466-3482 (2020). <https://doi.org:10.1016/j.jmb.2020.01.009>
- 67 Sahar, S. & Sassone-Corsi, P. Regulation of metabolism: the circadian clock dictates the time. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **23**, 1-8 (2012). <https://doi.org:10.1016/j.tem.2011.10.005>
- 68 Panda, S. *et al.* Coordinated Transcription of Key Pathways in the Mouse by the Circadian Clock. *Cell* **109**, 307-320 (2002). [https://doi.org:10.1016/s0092-8674\(02\)00722-5](https://doi.org:10.1016/s0092-8674(02)00722-5)
- 69 Turek, F. W. Obesity and Metabolic Syndrome in Circadian Clock Mutant Mice. *Science* **308**, 1043-1045 (2005). <https://doi.org:10.1126/science.1108750>
- 70 Pan, X., Jiang, X.-C. & Hussain, M. M. Impaired Cholesterol Metabolism and Enhanced Atherosclerosis in Clock Mutant Mice. *Circulation* **128**, 1758-1769 (2013). <https://doi.org:10.1161/circulationaha.113.002885>
- 71 Cho, H. *et al.* Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB- α and REV-ERB- β . *Nature* **485**, 123-127 (2012). <https://doi.org:10.1038/nature11048>
- 72 Eckel-Mahan, L., Kristin *et al.* Reprogramming of the Circadian Clock by Nutritional Challenge. *Cell* **155**, 1464-1478 (2013). <https://doi.org:10.1016/j.cell.2013.11.034>
- 73 Guan, D. *et al.* Diet-Induced Circadian Enhancer Remodeling Synchronizes Opposing Hepatic Lipid Metabolic Processes. *Cell* **174**, 831-842.e812 (2018). <https://doi.org:10.1016/j.cell.2018.06.031>
- 74 Hong, H.-K. *et al.* Requirement for NF- κ B in maintenance of molecular and behavioral circadian rhythms in mice. *Genes & Development* **32**, 1367-1379 (2018). <https://doi.org:10.1101/gad.319228.118>
- 75 Hepler, C. *et al.* Time-restricted feeding mitigates obesity through adipocyte thermogenesis. *Science* **378**, 276-284 (2022). <https://doi.org:10.1126/science.abl8007>
- 76 Deota, S. *et al.* Diurnal transcriptome landscape of a multi-tissue response to time-restricted feeding in mammals. *Cell Metabolism* **35**, 150-165.e154 (2023). <https://doi.org:10.1016/j.cmet.2022.12.006>
- 77 Goodpaster, B. H. & Sparks, L. M. Metabolic Flexibility in Health and Disease. *Cell Metabolism* **25**, 1027-1036 (2017). <https://doi.org:10.1016/j.cmet.2017.04.015>
- 78 Smith, R. L., Soeters, M. R., Wüst, R. C. I. & Houtkooper, R. H. Metabolic Flexibility as an Adaptation to Energy Resources and Requirements in Health and Disease. *Endocrine Reviews* **39**, 489-517 (2018). <https://doi.org:10.1210/er.2017-00211>
- 79 Pacheco-Bernal, I., Becerril-Pérez, F. & Aguilar-Arnal, L. Circadian rhythms in the three-dimensional genome: implications of chromatin interactions for cyclic transcription. *Clinical Epigenetics* **11** (2019). <https://doi.org:10.1186/s13148-019-0677-2>
- 80 Kim, Y. H. & Lazar, M. A. Transcriptional Control of Circadian Rhythms and Metabolism: A Matter of Time and Space. *Endocrine Reviews* **41**, 707-732 (2020). <https://doi.org:10.1210/endrev/bnaa014>
- 81 Etchegaray, J.-P., Lee, C., Wade, P. A. & Reppert, S. M. Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock. *Nature* **421**, 177-182 (2003). <https://doi.org:10.1038/nature01314>
- 82 Curtis, A. M. *et al.* Histone Acetyltransferase-dependent Chromatin Remodeling and the Vascular Clock. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 7091-7097 (2004). <https://doi.org:10.1074/jbc.m311973200>

- 83 Doi, M., Hirayama, J. & Sassone-Corsi, P. Circadian Regulator CLOCK Is a Histone Acetyltransferase. *Cell* **125**, 497-508 (2006). <https://doi.org:10.1016/j.cell.2006.03.033>
- 84 Katada, S. & Sassone-Corsi, P. The histone methyltransferase MLL1 permits the oscillation of circadian gene expression. *Nature Structural & Molecular Biology* **17**, 1414-1421 (2010). <https://doi.org:10.1038/nsmb.1961>
- 85 Nam, J., Hye *et al.* Phosphorylation of LSD1 by PKC α Is Crucial for Circadian Rhythmicity and Phase Resetting. *Molecular Cell* **53**, 791-805 (2014). <https://doi.org:10.1016/j.molcel.2014.01.028>
- 86 Ditacchio, L. *et al.* Histone Lysine Demethylase JARID1a Activates CLOCK-BMAL1 and Influences the Circadian Clock. *Science* **333**, 1881-1885 (2011). <https://doi.org:10.1126/science.1206022>
- 87 Dai, Z., Ramesh, V. & Locasale, J. W. The evolving metabolic landscape of chromatin biology and epigenetics. *Nature Reviews Genetics* **21**, 737-753 (2020). <https://doi.org:10.1038/s41576-020-0270-8>
- 88 Asif, S., Morrow, N. M., Mulvihill, E. E. & Kim, K.-H. Understanding Dietary Intervention-Mediated Epigenetic Modifications in Metabolic Diseases. *Frontiers in Genetics* **11** (2020). <https://doi.org:10.3389/fgene.2020.590369>
- 89 Lieberman-Aiden, E. *et al.* Comprehensive Mapping of Long-Range Interactions Reveals Folding Principles of the Human Genome. *Science* **326**, 289-293 (2009). <https://doi.org:10.1126/science.1181369>
- 90 Bonev, B. & Cavalli, G. Organization and function of the 3D genome. *Nature Reviews Genetics* **17**, 661-678 (2016). <https://doi.org:10.1038/nrg.2016.112>
- 91 Dixon, J. R. *et al.* Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* **485**, 376-380 (2012). <https://doi.org:10.1038/nature11082>
- 92 Davidson, I. F. & Peters, J.-M. Genome folding through loop extrusion by SMC complexes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **22**, 445-464 (2021). <https://doi.org:10.1038/s41580-021-00349-7>
- 93 Aguilar-Arnal, L. *et al.* Cycles in spatial and temporal chromosomal organization driven by the circadian clock. *Nature Structural & Molecular Biology* **20**, 1206-1213 (2013). <https://doi.org:10.1038/nsmb.2667>
- 94 Mermet, J. *et al.* Clock-dependent chromatin topology modulates circadian transcription and behavior. *Genes & Development* **32**, 347-358 (2018). <https://doi.org:10.1101/gad.312397.118>
- 95 Kim, Y. H. *et al.* Rev-erba dynamically modulates chromatin looping to control circadian gene transcription. *Science* **359**, 1274-1277 (2018). <https://doi.org:10.1126/science.aao6891>
- 96 Furlan-Magaril, M. *et al.* The global and promoter-centric 3D genome organization temporally resolved during a circadian cycle. *Genome Biology* **22** (2021). <https://doi.org:10.1186/s13059-021-02374-3>
- 97 Román, A., Tenorio-Hernández, L. & Furlan-Magaril, M. Distal and proximal control of rhythmic gene transcription. *Frontiers in Systems Biology* **2** (2022). <https://doi.org:10.3389/fsysb.2022.1026424>
- 98 Qin, Y., Grimm, S. A., Roberts, J. D., Chrysovergis, K. & Wade, P. A. Alterations in promoter interaction landscape and transcriptional network underlying metabolic adaptation to diet. *Nature Communications* **11** (2020). <https://doi.org:10.1038/s41467-020-14796-x>
- 99 Dittmann, A. *et al.* High-fat diet in a mouse insulin-resistant model induces widespread rewiring of the phosphotyrosine signaling network. *Molecular Systems Biology* **15** (2019). <https://doi.org:10.15252/msb.20198849>
- 100 Wingett, S. W. *et al.* HiCUP: pipeline for mapping and processing Hi-C data. *F1000Research* **4**, 1310 (2015). <https://doi.org:10.12688/f1000research.7334.1>
- 101 Servant, N. *et al.* HiC-Pro: an optimized and flexible pipeline for Hi-C data processing. *Genome Biology* **16** (2015). <https://doi.org:10.1186/s13059-015-0831-x>
- 102 Langmead, B. & Salzberg, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* **9**, 357-359 (2012). <https://doi.org:10.1038/nmeth.1923>
- 103 Wolff, J. *et al.* Galaxy HiCExplorer: a web server for reproducible Hi-C data analysis, quality control and visualization. *Nucleic Acids Research* **46**, W11-W16 (2018). <https://doi.org:10.1093/nar/gky504>
- 104 Chakraborty, A., Wang, J. G. & Ay, F. dHiC detects differential compartments across multiple Hi-C datasets. *Nature Communications* **13** (2022). <https://doi.org:10.1038/s41467-022-34626-6>

- 105 Xiao, T. *et al.* T(regs) in visceral adipose tissue up-regulate circadian-clock expression to promote fitness and enforce a diurnal rhythm of lipolysis. *Sci Immunol* **7**, eabl7641 (2022).
<https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abl7641>
- 106 Yu, W., He, B. & Tan, K. Identifying topologically associating domains and subdomains by Gaussian Mixture model And Proportion test. *Nature Communications* **8** (2017). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00478-8>
- 107 Quinlan, A. R. & Hall, I. M. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* **26**, 841-842 (2010). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>
- 108 Raudvere, U. *et al.* g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Research* **47**, W191-W198 (2019). <https://doi.org/10.1093/nar/gkz369>
- 109 Oh, Y. S., Bae, G. D., Baek, D. J., Park, E. Y. & Jun, H. S. Fatty Acid-Induced Lipotoxicity in Pancreatic Beta-Cells During Development of Type 2 Diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)* **9**, 384 (2018).
<https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00384>
- 110 Rao, S. P., Suhas *et al.* A 3D Map of the Human Genome at Kilobase Resolution Reveals Principles of Chromatin Looping. *Cell* **159**, 1665-1680 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.021>
- 111 Xiong, K. & Ma, J. Revealing Hi-C subcompartments by imputing inter-chromosomal chromatin interactions. *Nature Communications* **10** (2019). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12954-4>
- 112 Corrales, P., Vidal-Puig, A. & Medina-Gómez, G. PPARs and Metabolic Disorders Associated with Challenged Adipose Tissue Plasticity. *Int J Mol Sci* **19** (2018). <https://doi.org/10.3390/ijms19072124>
- 113 Chen, L. & Yang, G. PPARs Integrate the Mammalian Clock and Energy Metabolism. *PPAR Research* **2014**, 1-6 (2014). <https://doi.org/10.1155/2014/653017>
- 114 Baker, R. G., Hayden, M. S. & Ghosh, S. NF- κ B, Inflammation, and Metabolic Disease. *Cell Metabolism* **13**, 11-22 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.12.008>
- 115 Catrysse, L. & van Loo, G. Inflammation and the Metabolic Syndrome: The Tissue-Specific Functions of NF- κ B. *Trends in Cell Biology* **27**, 417-429 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.01.006>
- 116 Shen, Y. *et al.* NF- κ B modifies the mammalian circadian clock through interaction with the core clock protein BMAL1. *PLoS Genetics* **17**, e1009933 (2021). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009933>
- 117 Spengler, M. L. *et al.* Core circadian protein CLOCK is a positive regulator of NF- κ B-mediated transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, E2457-E2465 (2012).
<https://doi.org/10.1073/pnas.1206274109>
- 118 Iacomino, G. & Siani, A. Role of microRNAs in obesity and obesity-related diseases. *Genes & Nutrition* **12** (2017). <https://doi.org/10.1186/s12263-017-0577-z>
- 119 Li, H. *et al.* MiRNA-181a Regulates Adipogenesis by Targeting Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) in the Porcine Model. *PLoS ONE* **8**, e71568 (2013). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071568>
- 120 Loftus, T. M. & Lane, M. D. Modulating the transcriptional control of adipogenesis. *Current Opinion in Genetics & Development* **7**, 603-608 (1997). [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(97\)80006-8](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(97)80006-8)
- 121 Ye, J. Regulation of PPAR γ function by TNF- α . *Biochemical and Biophysical Research Communications* **374**, 405-408 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.07.068>
- 122 Bitto, A., Tatom, N., Krivak, T., Grotz, P. & Kaeberlein, M. Evidence that C/EBP- β LAP Increases Fat Metabolism and Protects Against Diet-Induced Obesity in Response to mTOR Inhibition. *Front Aging* **2**, 738512 (2021). <https://doi.org/10.3389/fragi.2021.738512>
- 123 Benedé-Ubieto, R., Estévez-Vázquez, O., Ramadori, P., Cubero, F. J. & Nevzorova, Y. A. <p>Guidelines and Considerations for Metabolic Tolerance Tests in Mice</p>. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* **Volume 13**, 439-450 (2020). <https://doi.org/10.2147/dmso.s234665>
- 124 Nakahara, K. *et al.* Characterization of a novel genetically obese mouse model demonstrating early onset hyperphagia and hyperleptinemia. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **305**, E451-E463 (2013). <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00540.2012>
- 125 Mehus, A. A. *et al.* Time-restricted feeding mice a high-fat diet induces a unique lipidomic profile. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **88**, 108531 (2021).
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2020.108531>

- 126 Jung, Y. H. *et al.* Recruitment of CTCF to an Fto enhancer is responsible for transgenerational inheritance of BPA-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **119**, e2214988119 (2022). <https://doi.org:10.1073/pnas.2214988119>
- 127 Liu, Y. *et al.* Systematic inference and comparison of multi-scale chromatin sub-compartments connects spatial organization to cell phenotypes. *Nature Communications* **12** (2021). <https://doi.org:10.1038/s41467-021-22666-3>
- 128 Xu, Y. *et al.* Long-Range Chromosome Interactions Mediated by Cohesin Shape Circadian Gene Expression. *PLoS Genetics* **12**, e1005992 (2016). <https://doi.org:10.1371/journal.pgen.1005992>
- 129 Mermet, J., Yeung, J. & Naef, F. Oscillating and stable genome topologies underlie hepatic physiological rhythms during the circadian cycle. *PLoS Genetics* **17**, e1009350 (2021). <https://doi.org:10.1371/journal.pgen.1009350>
- 130 An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* **489**, 57-74 (2012). <https://doi.org:10.1038/nature11247>
- 131 Corces, M. R. *et al.* An improved ATAC-seq protocol reduces background and enables interrogation of frozen tissues. *Nature Methods* **14**, 959-962 (2017). <https://doi.org:10.1038/nmeth.4396>
- 132 Lackey, D. E. *et al.* Adipocyte PU.1 knockout promotes insulin sensitivity in HFD-fed obese mice. *Scientific Reports* **9** (2019). <https://doi.org:10.1038/s41598-019-51196-8>