



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EFFECTO DE LA CRONOTERAPIA CON NAD⁺ SOBRE LA TRANSCRIPCIÓN CÍCLICA DE GENES EN EL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO DE RATONES OBESOS.

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Roberto Enrique López Valiente

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Lorena Aguilar Arnal

[Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Aliesha Araceli González Arenas

[Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM](#)

Dra. Selma Eréndira Avendaño Vázquez

[Instituto Nacional de Medicina Genómica-UNAM](#)

Ciudad de México, octubre, 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.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Este proyecto fue realizado a través del Programa de Doctorado y Maestría en Ciencias Bioquímicas en el Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Se extiende un profundo agradecimiento a todas las personas que permitieron que se llevara a cabo. Particularmente, se extiende un agradecimiento a la M. en C. Norma Trejo Medina por su apoyo durante el trámite de documentos migratorios.

Durante la realización de estudios de maestría, se otorgó la beca para manutención #1148328 por parte del Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT). Este trabajo fue realizado con el apoyo y financiamiento del proyecto no. FORDECYT – PRONACES/15758/2020 de CONAHCYT, y el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-DGAPA de la UNAM, número IN208022, otorgados a la Dra. Lorena Aguilar Arnal.

Los experimentos con modelos animales fueron realizados en la Unidad de Modelos Biológicos del IIB. Se agradece la labor de cada una de las personas cuyo trabajo permite el funcionamiento de la Unidad. Particularmente, se extiende un agradecimiento al Dr. Daniel Garzón Cortés, jefe de la unidad, a la MVZ Ruby Zabala Gaytán, médica veterinaria de la unidad y al MVZ Filipo César Paczka García, coordinador de experimentación.

También, se agradece a los técnicos académicos M.C. Marcia Bustamante Zepeda y M.C. Jesús Ramírez Santos, del Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM, por su disposición de tiempo en el apoyo técnico para la realización de los experimentos.

Por último, nada de esto hubiera sido posible sin la guía y retroalimentación de mi comité tutor: Dra. Lorena Aguilar Arnal, Dra. Aliesha Araceli Gonzáles Arenas y la Dra. Selma Eréndira Avendaño Vásquez. Particularmente, agradezco a la Dra. Lorena Aguilar Arnal por haberme recibido con brazos abiertos en su laboratorio y cuyo ingenio permiten que la investigación científica sea un proceso verdaderamente creativo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 Ritmos Circadianos	11
1.1.1 Características de los ritmos circadianos	13
1.1.2 Parámetros de los ritmos circadianos	17
1.1.3 Experimentos en oscuridad completa (DD)	21
1.1.4 <i>Zeitgebers</i> : Sincronizadores de tiempo.	21
1.1.5 Los núcleos hipotalámicos	27
1.2 Mecanismos moleculares del reloj circadiano	32
1.3 Disfunción del metabolismo en respuesta a dieta hipercalórica	34
1.3.1 Resistencia a la Insulina	35
1.3.2 Diabetes tipo 2	35
1.4 El metabolismo y los ritmos circadianos	36
1.5 Beneficios del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD⁺) para prevenir enfermedades relacionadas al síndrome metabólico.	37
1.5.1 NAD ⁺	38
1.5.2 El rol de NAD ⁺ en el metabolismo energético.	39
1.5.3 El rol de NAD ⁺ en la expresión de genes y reparación del DNA.	40
1.5.4 El NAD ⁺ y los ritmos circadianos	40
1.5.6 Los niveles de ENAMPT circulante en la sangre y su influencia en los ritmos circadianos	41
1.5.7 El ejercicio y su influencia en los niveles de NAD ⁺	41
1.5.8 Beneficios de la suplementación con NAD ⁺	42
2. ANTECEDENTES DIRECTOS	44
2.1 La cronoterapia con NAD ⁺ revierte el fenotipo de obesidad inducida por la dieta.	44
2.2 El tratamiento con NAD ⁺ produce una reorganización transcripcional extensa.	45
2.3 La efectividad del NAD ⁺ como tratamiento para la disfunción metabólica inducida por la dieta varía según el momento del día de su administración.	45
2.4 El tratamiento crono terapéutico del NAD ⁺ reorganiza el reloj hepático	46
2.5 La actividad locomotora se mantiene alineada a la luz sin importar la hora del tratamiento del NAD ⁺ .	47
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	48
4. JUSTIFICACIÓN	49
5. HIPÓTESIS	50

6. OBJETIVO	51
6.1 Objetivos particulares	51
7. METODOLOGÍA	52
7.1 Diagrama experimental	52
7.2 Cortes Histológicos en Criostato	52
7.3 Estudio histológico con la tinción de Nissl.	53
7.4 Disección de núcleos hipotalámicos	53
7.5 Extracción de RNA a partir de los tejidos de los núcleos hipotalámicos	56
7.6 Síntesis de cDNA	56
7.7 Cuantificación de transcritos por qPCR.	56
7.8 Estudios de comportamiento circadiana	57
7.8.1 Ratones y dietas	57
7.8.2 Tratamiento con NAD ⁺	58
7.8.3 Determinación de perfiles de actividad motriz y conducta alimentaria	59
7.8.4 Análisis de poder	59
8. RESULTADOS	61
8.1 La tinción de cortes de 30 μ M de grosor permite la identificación de núcleos hipotalámicos.	61
8.2 Estandarización del protocolo para qPCR.	61
8.3 La expresión de los genes <i>Six6</i> y <i>Vip</i> es mayor en el SCN en comparación a los núcleos ARC y VMH.	62
8.4 La expresión de los genes <i>Pomc</i> y <i>Agrp</i> es mayor en el ARC en comparación a los núcleos SCN y VMH.	63
8.5 La expresión de los genes <i>Sf1</i> es mayor en el VMH en comparación a los núcleos SCN y ARC.	64
8.6 El tratamiento de NAD ⁺ determina la fase en la que se transcriben los genes principales del reloj circadiano.	65
8.7 El NAD ⁺ cambia la fase de expresión de los genes péptido intestinal vasoactivo (<i>Vip</i>) y su receptor (<i>Vipr2</i>).	68
8.8 El NAD ⁺ promueve un cambio de fase de los genes prokineticina 2 y su receptor.	69
8.9 El NAD ⁺ promueve un cambio de fase para el gen <i>Rasd1</i> .	70
8.10 El NAD ⁺ no cambió de manera significativa los patrones de expresión del gen zinc finger homeobox 3.	72
8.11 La administración del NAD ⁺ protege de la ganancia de peso en condiciones de oscuridad constante	73
8.12 La administración del NAD ⁺ no cambia el consumo de alimentos.	75

8.13 El tratamiento con NAD⁺ al CT11 suprime la actividad inicial de los ratones tratados con NAD⁺ al CT11. _____ **76**

8.14 El tratamiento con NAD⁺ resulta en un cambio significativo del período y de la amplitud del ciclo de actividad. _____ **82**

83

8.15 El tratamiento con NAD⁺ disminuye la actividad motora _____ **84**

9. DISCUSION _____ **85**

10. CONCLUSOINES _____ **94**

10. BIBLIOGRAFÍA _____ **95**

11. ANEXOS _____ **108**

LISTA DE ABREVIATURAS

Agrp	Neuropeptido relacionado a aguti
ARC	Núcleo Arqueado
ATP	Adenosín trifosfato
AVP	Arginina vasopresina
BMAL1	Cerebro y músculo ARNT-Like 1
CCGs	Genes controlados por el reloj
CD	Dieta Control
CLOCK	Ciclos de Salida Locomotora Circadiana Kaput
CRY1/2	Cryptochrome1/2
CRY1/2	Regulador circadiano de cryptocromo
CT	Tiempo circadiano
DD	Oscuro-Oscuro
DNA	Ácido desoxiribonucleíco
DM	Diabetes Mellitus
GRP	Péptido Liberador de Gastrina
HF	Dieta alta en grasas
HFN	Dieta alta en grasas con tratamiento de NAD ⁺ al ZT11
HFN11	Dieta alta en grasas con tratamiento de NAD ⁺ al ZT11
HFN23	Dieta alta en grasas con tratamiento de NAD ⁺ al ZT23
IGL	Intergeniculate leaflet
LL	Condiciones de luz constante (Light-Light)
NAD ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleótido (forma oxidada)

NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido (forma reducida)
NAMPT	Nicotinamida fosforibosil transferasa
NMN	Mononucleótido de Nicotinamida
NR	Nicotinamida Ribósido
Nr1d1	Receptor nuclear subfamilia 1 grupo D miembro 1
<i>PER1</i>	Regulador circadiano del período 1
<i>PER1/2/3</i>	Periodo 1/2/3
<i>PER2</i>	Regulador circadiano del período 2
PRC	Curva de respuesta de fase
Prok2	Prokineticin 2
RFX4	Factor regulatorio X4
SCN	Núcleo Supraquiasmático
SF1	Factor esteriodogénico 1
Six6	Seis Homeobox 6
SMet	Síndrome Metabólico
T2D	Type 2 Diabetes (Diabetes tipo 2)
VIP	Péptido Intestinal Vasoactivo
VIPAC2	Receptor de VIP
VMH	Núcleo Ventromedial
ZFH3	Homeobox de Dedo de Zinc 3
ZT	Tiempo del sincronizador

TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Reloj de 24 horas que ilustra los ciclos circadianos en humanos.....	12
Figura 2. Actograma hipotético en condiciones que conducen a la sincronización circadiana y ritmo en libre curso..	15
Figura 3. Estructura del SCN en ratones.	28
Figura 4. El mecanismo molecular de los ritmos circadianos.....	34
Figura 5. Estructura del NAD ⁺	38
Figura 6. Papel del NAD ⁺ en el metabolismo energético.....	39
Figura 7. La acumulación de proteínas que controlan el reloj circadiano se encuentra de manera invertida en el tratamiento de NAD ⁺ al ZT23.....	46
Figura 8. Tinción de Nissl donde se observa el SCN.	54
Figura 9. Tinción de Nissl donde se observan a los núcleos ARC y VMH.....	55
Figura 10. Diagrama para experimento de comportamiento de ratones con tratamiento de NAD ⁺ al CT11 y CT23 en condiciones LD y DD.	58
Figura 11. Expresión de los genes Vip y Six6 en el SCN, el ARC y el VMH del hipotálamo en ratones bajo dieta normal (n=5).	63
Figura 12. Expresión de los genes Agrp y Six6 en el SCN, el ARC y el VMH del hipotálamo en ratones bajo dieta normal (n=5)..	64
Figura 13. Expresión del gen de Sf1 en el SCN, el ARC y el VMH del hipotálamo en ratones bajo dieta normal (n=5).....	65
Figura 14 RT-qPCR de los genes del reloj y genes controlados por el reloj en el SCN.....	67
Figura 15 RT-qPCR de los genes de Vip y Vipr2..	68
Figura 16 RT-qPCR de los genes de Prok2 y Prokr2.....	70
Figura 17 RT-qPCR del gen Rasd1. .	71
Figura 18. RT-qPCR del gen de Zhfx3.....	73
Figura 19. Efecto del tratamiento con NAD ⁺ a los CT11 y CT23 en el peso corporal de ratones con dieta hipercalórica.....	74
Figura 20. Efecto de la cronoterapia con NAD ⁺ en la ingesta de alimento de ratones con dieta hipercalórica.....	76
Figura 21. Actogramas de monitoreo de actividad individual a través de interrupciones de fotobeam a cada 6 minutos para el grupo de ratones HF. .	78
Figura 22 Actogramas de monitoreo de actividad individual a través de interrupciones de fotobeam cada 6 minutos en el grupo de ratones HFN11.....	79
Figura 23 Actogramas de monitoreo de actividad individual a través de interrupciones de fotobeam cada 6 minutos para el grupo de ratones HFN23.....	80
Figura 24. Cuantificación de la actividad motriz por hora de los grupos HF, HFN11, y HFN23.	81
Figura 25 Cuantificación de la actividad motriz cada 30 minutos de los grupos HF, HFN11, y HFN23.....	82
Figura 26 Análisis de los períodos a partir de los datos de movimiento.	83
Figura 27 Evaluación de la amplitud y robustez de los ritmos circadianos en los grupos HF, HFN11 y HFN23 bajo diferentes condiciones de luz y tratamiento.....	84
Figura 28. Cuantificación de movimiento de ratones.....	84

RESUMEN

Los ritmos circadianos, que son patrones fisiológicos y moleculares que se repiten cada 24 horas, son esenciales para la función biológica de la mayoría de los organismos. Estos ritmos, regulados por señales ambientales como la luz solar, se caracterizan por el período, la amplitud y la fase. El núcleo supraquiasmático (SCN) en el hipotálamo actúa como el reloj maestro, coordinando estos ritmos en el cuerpo y alineando la información fótica externa con el reloj interno. Sin embargo, factores como la alimentación pueden desincronizar este sistema, afectando la homeostasis energética. En este contexto, el NAD⁺, un metabolito crucial para la homeostasis energética ha emergido como un potencial sincronizador de tiempo. En el laboratorio Aguilar-Arnal, se descubrió que la cronoterapia con NAD⁺ puede combatir el síndrome metabólico, y su eficacia varía según el momento del día en el que se administra. Esta terapia también puede modificar la fase de expresión de genes relacionados con el reloj biológico en el hígado. Este estudio se centró en analizar los efectos del NAD⁺ en el SCN. Utilizando RT-qPCR, se observaron inversiones en la fase de expresión de genes del reloj y de genes reguladores circadianos en el SCN. Además, los análisis de comportamiento en ratones con obesidad inducida revelaron alteraciones en su actividad circadiana tras el tratamiento con NAD⁺ en el ZT11. Estos hallazgos sugieren que el NAD⁺ tiene un potencial impacto en la sincronización del reloj circadiano, aunque se requiere investigación adicional para comprender completamente su papel como sincronizador.

ABSTRACT

Circadian rhythms, which are physiological and molecular patterns that repeat every 24 hours, are essential for the biological function of most organisms. These rhythms, regulated by environmental signals such as sunlight, are characterized by their period, amplitude, and phase. The suprachiasmatic nucleus (SCN) in the hypothalamus acts as the master clock, coordinating these rhythms in the body and aligning external photic information with the internal clock. However, factors such as diet can desynchronize this system, affecting energy homeostasis. In this context, NAD⁺, a crucial metabolite for energy homeostasis, has emerged as a potential time synchronizer. In the Aguilar-Arnal laboratory, it was discovered that chronotherapy with NAD⁺ can combat metabolic syndrome, and its effectiveness varies depending on the time of day it is administered. This therapy can also modify the expression phase of genes related to the biological clock in the liver. This study focused on analyzing the effects of NAD⁺ on the SCN. Using RT-qPCR, inversions in the expression phase of clock genes and circadian regulatory genes in the SCN were observed. Additionally, behavioral analyses in mice with induced obesity revealed alterations in their circadian activity after treatment with NAD⁺ at ZT11. These findings suggest that NAD⁺ has a potential impact on the synchronization of the circadian clock, although further research is needed to fully understand its role as a synchronizer.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Ritmos Circadianos

El término “circadiano”, derivado del latín “circa”, se traduce como “aproximadamente un día” y hace referencia a los patrones fisiológicos, moleculares, y de comportamiento que se repiten aproximadamente cada 24 horas. La mayoría de las funciones biológicas están reguladas con patrones rítmicos, tales como el sueño, la presión sanguínea, la temperatura, concentraciones hormonales, etc., que siguen patrones (Schulz & Steimer, 2009). Estos “relojes biológicos” se encuentran en casi toda forma de vida, incluyendo las bacterias, las plantas, los hongos, y los animales (Hastings et al., 2003). Recientemente se encontró que hasta en algunas bacterias no fotosintéticas, los relojes circadianos se encuentran presentes (Eelderink-Chen et al., 2021). La ubicuidad de los ritmos circadianos nos indica que estos le confieren una ventaja evolutiva a los organismos que los poseen.

Los organismos con ritmos circadianos pueden anticipar cambios en el ambiente y, por lo tanto, tienen una ventaja evolutiva sobre aquellos que carecen de este sistema (Vaze & Sharma, 2013). Varios estudios en diversas especies han demostrado que un reloj circadiano saludable mejora tanto la aptitud física como la reproductiva (Beaver et al., 2002; Sharma, 2003; Woelfle et al., 2004). Esto ocurre de dos maneras: en primer lugar, un organismo con un reloj circadiano funcional puede sincronizar su comportamiento y fisiología para ajustarse a los cambios cíclicos en el ambiente. Esta sincronización provee un valor evolutivo extrínseco ya que le permite al organismo adaptarse para obtener el máximo provecho a los recursos que tiene disponibles. En segundo lugar, un reloj molecular funcional confiere una ventaja evolutiva intrínseca al coordinar los cambios internos metabólicos y fisiológicos permitiendo un funcionamiento más eficiente.

En humanos, los ritmos circadianos no solo controlan aspectos fisiológicos como el estado de alerta y el sueño, sino también la capacidad cognitiva. Nuestra atención, por ejemplo, varía a lo largo del día. Un ritmo circadiano típico en humanos tiene un grado

de alerta que dura 2 o 3 horas y esto ocurre alrededor de 4 horas después de despertar (Valdez, 2019). La **Figura 1** muestra los cambios físicos y mentales que ocurren en humanos a lo largo del día, destacando sus puntos máximos en un reloj de 24 horas. Durante el día se observan cambios que activan el cuerpo para estados de alerta y movimiento. La coordinación, por ejemplo, está en su punto máximo a las 15:00 horas (Campos et al., 2001).

Los ritmos circadianos son sincronizados por *zeitgebers*, señales ambientales que actúan como indicadores de tiempo. La luz solar es el *zeitgeber* más influyente, ya que la información fótica atraviesa la retina y llega hasta el núcleo supraquiasmático (SCN) ubicado en el hipotálamo cerebral a través de células ganglionares especializadas en el tracto retino hipotalámico (RHT) (Hannibal, 2002). El SCN actúa como el reloj maestro, estando en la cima jerárquica de los ritmos circadianos. El SCN se encarga de distribuir la señal de luz a los distintos órganos y sus relojes periféricos.

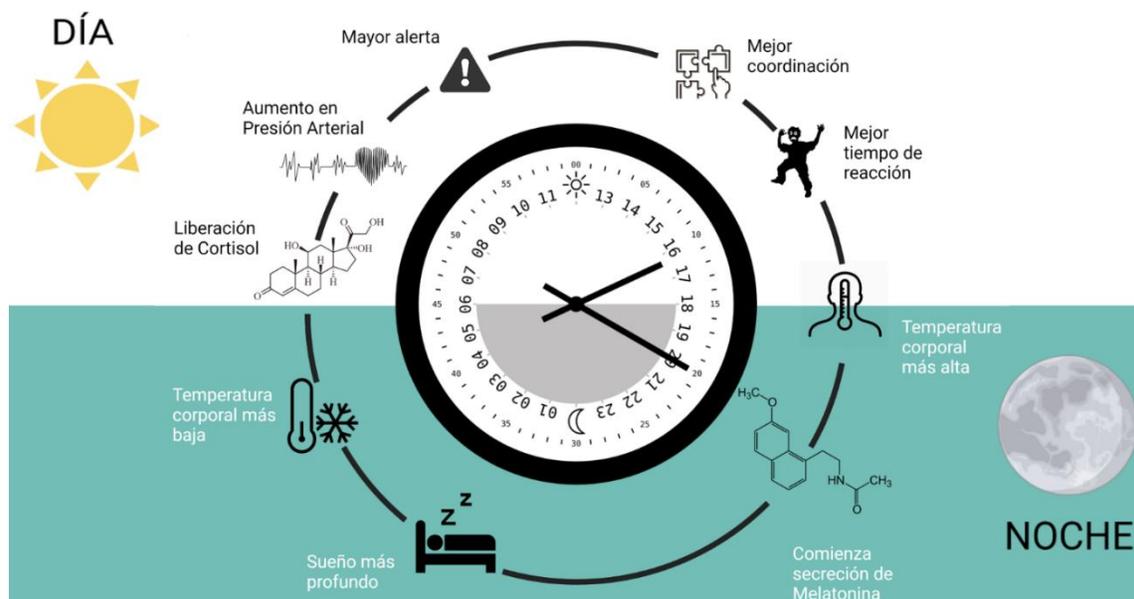


Figura 1. Reloj de 24 horas que ilustra los ciclos circadianos en humanos. La figura muestra un reloj de 24 horas que ilustra a los ritmos circadianos, los cuales son cambios oscilatorios que ocurren a lo largo del día. En los humanos, estos ritmos se manifiestan principalmente por el ciclo de sueño-vigilia (sección oscura versus sección en blanco) y también se reflejan en nuestra fisiología y comportamiento. (Creado con BioRender.com)

Sin embargo, también existen otras señales como los ciclos de temperatura, el ejercicio, la hora del alimento o, inclusive, señales sociales tales como los horarios de trabajo o

interacciones sociales (Lewis et al., 2018; Lewis et al., 2020; Quante et al., 2019; Sandahl et al., 2021). Es interesante que el SCN también es el encargado de interpretar los estímulos no fóticos a través de la lámina intergeniculada (IGL), en el tálamo (Harrington, 1997; Moore & Card, 1994; Morin, 1994). No obstante, los *zeitgebers* no son vitales para la existencia de los ritmos circadianos ya que estos persisten incluso en la ausencia de estos y, por lo tanto, son considerados endógenos (Breitenbach et al., 2021).

1.1.1 Características de los ritmos circadianos

Existen tres criterios principales para que un ritmo biológico se considere circadiano (Khan & Tian, 2019):

1. El ritmo debe tener un período endógeno que dure aproximadamente 24 horas y que funcione incluso en ausencia de *zeitgebers* (ritmo en libre curso).
2. El ritmo es sincronizable. A través del proceso de sincronización, el reloj biológico del organismo se sincroniza con señales externas.
3. El ritmo tiene compensación de temperatura. El organismo es capaz de mantener un ritmo robusto en un rango de temperaturas fisiológicas.

A continuación, se procede a explicar cada uno de estos a detalle.

1.1.1.1 Los ritmos circadianos son endógenos

Los primeros descubrimientos sobre la naturaleza endógena de los ritmos circadianos se dieron en observaciones en plantas. En 1728, Jean-Jacques d'Ortois de Mairan, un científico francés, encontró que el movimiento de las hojas de una planta, posiblemente *Mimosa pudica*, persiste incluso cuando la planta se mantiene en oscuridad completa (McClung, 2006). Este descubrimiento sugirió la idea de que existe un reloj interno que está controlando los movimientos de la planta y sirvió de base para investigaciones posteriores en otros organismos.

Sin embargo, a pesar de varias observaciones de patrones circadianos, no fue hasta 1971 que se encontró que los hámsteres mantenían sus ritmos circadianos incluso en

oscuridad constante (Boulos & Morin, 1985) . Unos años más tarde, en 1984, se encontró el primer gen involucrado en la regulación de los ritmos circadianos, *Per* (Sangoram et al., 1998). Desde entonces se han encontrado más genes que son parte de una compleja red de regulación que mantienen la naturaleza endógena de los ritmos circadianos. Hoy en día se sabe que es el SCN el encargado de mantener a los ritmos circadianos en ausencia de estímulos externos (Nassan & Videnovic, 2022).

1.1.1.2 Los ritmos circadianos son sincronizables

La sincronización circadiana es el proceso por el cual los ritmos circadianos se ajustan al ambiente, ya sea por estímulos fóticos o estímulos no fóticos (Lall et al., 2012). La potencia de los *zeitgebers*, las señales en el ambiente que indican la hora del día, o variaciones genéticas pueden afectar que tan fácil se da la sincronización y alineamiento del sistema circadiano. En la **Figura 2** se puede observar un actograma (gráfico que muestra los patrones de movimiento o actividad de los roedores) hipotético donde la sincronización se da a través de la luz y también se muestra la actividad en condiciones de ritmo en libre curso (en ausencia de luz). En condiciones de sincronización, la fase de actividad de los ratones, que son nocturnos, coincide con el apagado de las luces, mientras que su fase inactiva ocurre cuando las luces están encendidas. Día tras día, si los patrones de luz y oscuridad no cambian, los ratones seguirán teniendo los mismos patrones de movimiento durante los mismos horarios.

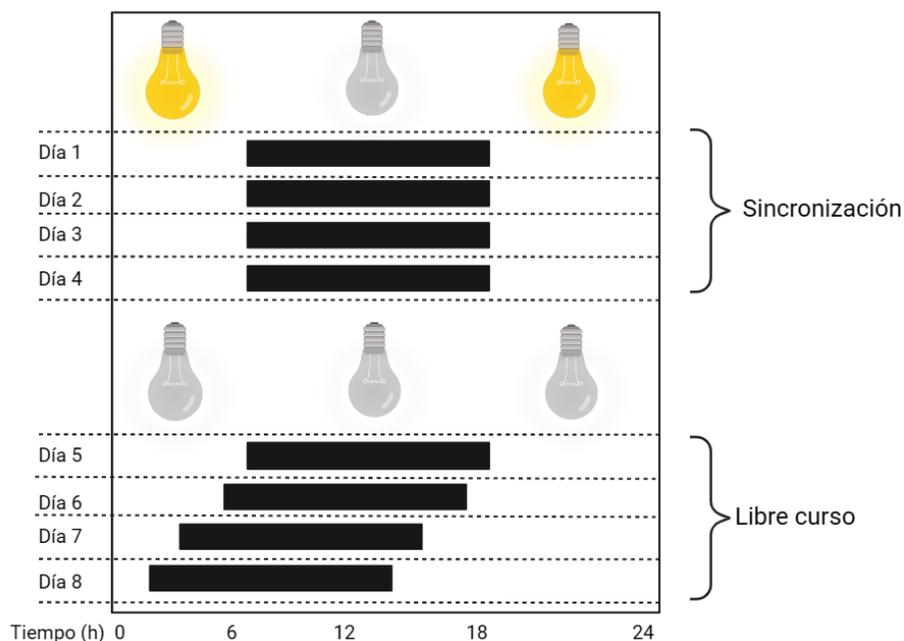


Figura 2. Actograma hipotético en condiciones que conducen a la sincronización circadiana y ritmo en libre curso. En este experimento de 8 días las barras negras denotan el período de actividad de un organismo nocturno. Durante los primeros 5 días del experimento, el individuo muestra un ritmo circadiano con *sincronización* mientras que a partir de que las luces se apagan por completo se observa un desfase en el inicio de la actividad. Las barras negras indicarían las horas a las que el animal monitoreado presentaría mayor actividad locomotora. (Creado con BioRender.com)

En un ritmo en libre curso, los ratones pueden despertarse más tarde o más temprano cada día según su genética u otras condiciones ambientales, ya que sus ritmos endógenos no son exactamente de 24 horas, sino que solo se aproximan a este periodo. Se ha observado que los ratones de laboratorio de la cepa C57BL/6 tienen períodos en sus ritmos de actividad más cortos que 24 horas mientras que estos mismos ratones con obesidad inducida por la dieta tienen períodos que se aproximan más a las 24 horas (Miranda-Anaya et al., 2017), aunque su potencia (robustez del ritmo) se ve disminuida. En la **Figura 2**, se puede observar que a medida que pasa cada día, los individuos despiertan cada vez más temprano debido a que sus ritmos endógenos tienen un período inferior a 24 horas. La sincronización de los ritmos circadianos a nivel molecular involucra un extenso y entrelazado mecanismo donde actúan genes, señales ambientales y hormonas. Además de las proteínas reguladoras del reloj molecular (CLOCK, BMAL1,

CRY1,2, *PER1,2,3*), existen modificaciones postraduccionales tales como la fosforilación, la degradación y la entrada al núcleo son necesarias para este proceso (Patke et al., 2020).

1.1.1.3 Los ritmos circadianos presentan compensación a la temperatura

Los ritmos circadianos poseen una notable característica de compensación térmica la cual permite que el organismo mantenga un ritmo constante a pesar de variaciones en la temperatura fisiológica (Sorek & Levy, 2012). Por ejemplo, a pesar de un incremento o un descenso en la temperatura fisiológica, el período del ritmo circadiano se mantiene constante, evitando cambios significativos (Prokkola & Nikinmaa, 2018). Sin esta habilidad, variaciones en la temperatura podrían desalinearse el reloj interno biológico con el ambiente externo, teniendo potenciales efectos negativos en la salud del organismo.

Un ejemplo de la robustez de estos ritmos es evidente en el SCN de ratas. Se ha demostrado que los ritmos neuronales circadianos *in vitro* muestran compensaciones térmicas tanto a 37°C como a 31°C, mostrando resistencia a pulsos de calor (Ruby et al., 1999). Sin embargo, es fundamental subrayar que la respuesta del SCN o de los ritmos circadianos en general a temperaturas extremadamente bajas, que son atípicas para muchos organismos, sigue siendo un área poco explorada que requiere investigación adicional.

A pesar de que los ritmos circadianos constituyen un fenómeno ampliamente estudiado, los mecanismos que los sustentan aún no se entienden completamente. Se ha propuesto que las variaciones en la compensación térmica están vinculadas a modificaciones en las constantes de reacción de las enzimas que participan en las oscilaciones de los represores del sistema circadiano (Kurosawa & Iwasa, 2002). En el SCN, considerado el regulador central de estos ritmos, se ha demostrado que la interacción entre sus secciones ventrolaterales y dorsomediales otorga resistencia a reinicios inducidos por cambios de temperatura (Buhr et al., 2010).

No obstante, es importante señalar que esta resistencia y compensación térmica podrían no ser tan robustas como se sugiere en algunos contextos. Por ejemplo, se cree que los animales en hibernación pueden perder sus ritmos circadianos, aunque los estudios en este ámbito son escasos (Revel et al., 2007). Adicionalmente, estudios que emplearon KNK437, un inhibidor de la vía de respuesta al *heat shock*, han demostrado un deterioro significativo en la capacidad de la compensación térmica, acompañado de cambios de fase (Herzog & Huckfeldt, 2003). Un hallazgo reciente en *Drosophila Melanogaster* identificó una mutación que afecta la exportación nuclear y modifica el período circadiano en función de la temperatura (Giesecke et al., 2023).

Es interesante que se han identificado numerosas mutaciones que, a pesar de alterar el período del ritmo, mantienen intacta su capacidad de compensación térmica (Hong et al., 2007). Esto sugiere que los mecanismos responsables de la compensación térmica podrían estar localizados a nivel de la maquinaria intrínseca del reloj circadiano. La compensación a la temperatura es un fenómeno bastante conocido en el área de los ritmos circadianos, sin embargo, sus mecanismos subyacentes aún no son del todo comprendidos. Se ha hipotetizado que las variaciones que ocurren cuando hay compensación a la temperatura son resultado de cambios en las constantes de reacción de las enzimas involucradas en las oscilaciones de los represores del sistema circadiano.

En resumen, aunque la compensación térmica es un fenómeno bien documentado en el campo de los ritmos circadianos, los mecanismos subyacentes que lo regulan continúan siendo un área de investigación activa y su robustez podría variar en diferentes contextos biológicos.

1.1.2 Parámetros de los ritmos circadianos

Los parámetros de los ritmos circadianos son la amplitud, el período y la fase. En conjunto, estos determinan las características de un ritmo circadiano. En la **Figura 3** se ilustra un ejemplo hipotético de lo que ocurre en un ritmo circadiano a lo largo de varios días. El período, por ejemplo, es el tiempo en el que un punto específico—en este caso el punto más alto, la acrofase—se repite. Por otra parte, la amplitud es la magnitud o

fuerza con la que sucede el ritmo. También, la fase, se refiere al tiempo en el que sucede el ritmo relativo al ciclo ambiental. En las condiciones de oscuridad completa (DD), a diferencia de condiciones de luz y oscuridad (LD), ocurre un cambio de fase debido a que los ritmos circadianos en la mayoría de los casos no son exactamente de 24 horas de manera endógena. A continuación, se procede a definir cada uno de estos parámetros.

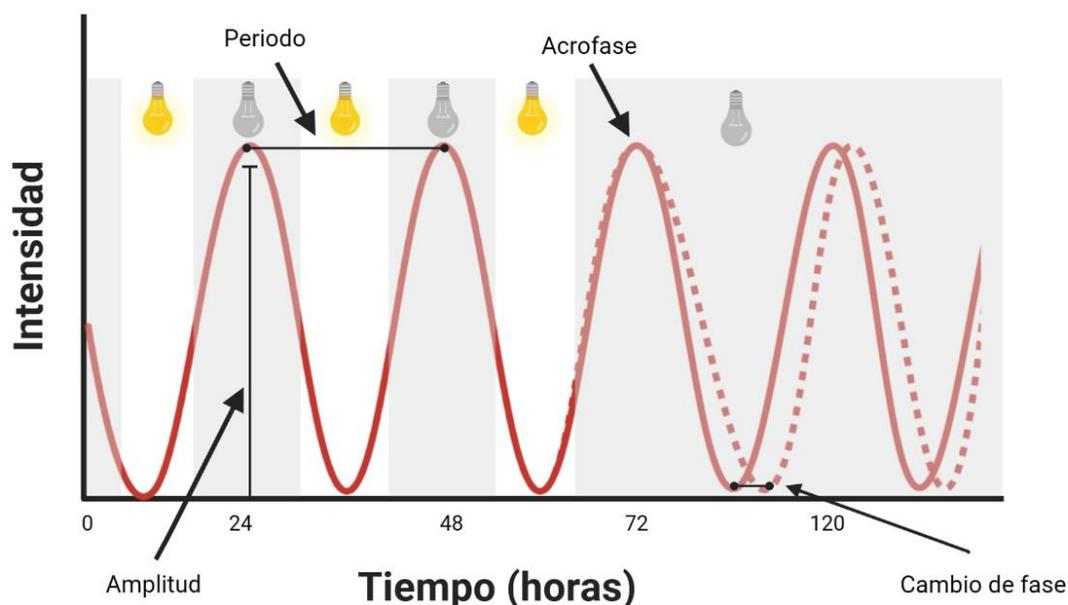


Figura 3. Representación gráfica de los parámetros que definen a un ritmo circadiano. El período es el tiempo que le toma a un ritmo completar un ciclo, generalmente de 24 horas. La fase es un momento del ritmo en relación con un tiempo estándar, esto podría ser el amanecer o el atardecer. La amplitud es la magnitud del cambio entre el punto más alto de expresión del ritmo y el punto de expresión mínima. En oscuridad constante, ocurre un desplazamiento de fase el cual es consecuencia de un ritmo en libre curso. (Creado con BioRender.com)

1.1.2.1 El período

El período circadiano es un factor clave que determina el cronometraje y la naturaleza de los ritmos circadianos. Aunque su duración puede ser influenciada por condiciones ambientales como la luz y temperatura, en seres humanos, el período circadiano promedio es de aproximadamente 24 horas (Ayyar & Sukumaran, 2021). Este periodo está regulado por una intrincada red de proteínas y genes que interactúan en ciclos de retroalimentación (Ayyar & Sukumaran, 2021). Estímulos externos como la luz y la

temperatura pueden reiniciar o ajustar este sistema, afectando los genes del reloj y, por ende, la duración del período (Fonken & Nelson, 2014). Estas fluctuaciones tienen importantes implicaciones para el funcionamiento óptimo de los organismos y en su capacidad de adaptarse al entorno.

Es importante señalar que la robustez de los ritmos circadianos puede variar considerablemente entre diferentes especies y contextos. La exposición a condiciones de luz constante (LL) u oscuridad total (DD) puede tener efectos divergentes en el ritmo circadiano, dependiendo de la especie (Blume et al., 2019). Por ejemplo, según las observaciones, la mayoría de los animales nocturnos pierden sus ritmos circadianos en condiciones LL, lo que podría tener implicaciones significativas para su comportamiento y bienestar.

En el caso de los humanos, las variaciones en los períodos circadianos pueden tener un impacto significativo en el bienestar y la salud (Emens, 2020). Por ejemplo, las personas que carecen de una sincronización adecuada, especialmente aquellas que han perdido por completo la visión, pueden presentar períodos circadianos más cortos o largos que las 24 horas estándar. Este fenómeno puede tener como resultado diversas consecuencias como la depresión, insomnio, y mayor propensión a enfermedades cardiovasculares (Sack & Lewy). Comprender estas variaciones y sus implicaciones podría ser clave para desarrollar tratamientos más efectivos y estrategias de adaptación personalizadas.

1.1.2.2 La fase

La fase circadiana, también conocida como “la hora del reloj”, es un aspecto crucial que determina cuándo comienzan diversos fenómenos circadianos (Auerbach et al., 2022) (Takahashi, 2017). Este concepto es particularmente relevante en situaciones como el *jet lag*, que se produce al viajar entre diferentes zonas horarias y provoca interrupciones en el ciclo vigilia y sueño hasta que el organismo se ajusta al nuevo entorno. En personas mayores, se ha observado que la respuesta al estímulo de luz reducida puede desencadenar cambios de fase similares a los del *jet lag* (Klerman et al., 2001). Se ha

propuesto que la exposición a luz azul podría ser útil para catalizar el cambio de fase y así reducir las inconveniencias del *jet lag* (Crunkhorn, 2020; Klerman et al., 2001).

En mamíferos, el SCN desempeña un papel central en la sincronización de la fase de los relojes periféricos, principalmente a través de ciclos de luz y oscuridad (Buhr et al., 2010). Según estudios, la salida glutamatérgica del SCN estimula la síntesis de melatonina durante la noche (Perreau-Lenz et al., 2004). Además, se ha demostrado que el SCN controla la interrupción de la síntesis de melatonina al amanecer, lo que indica un mecanismo de regulación sofisticado (Perreau-Lenz et al., 2005). No obstante, es crucial tener en cuenta que la exposición a luz durante la noche inhibe la producción de melatonina, lo cual puede alterar la fase circadiana (Chang et al., 2011). Estos hallazgos indican que la regulación de la melatonina y, por ende, la sincronización de los ritmos circadianos es un proceso más complejo y está fuertemente influenciado por mecanismos neuronales y hormonales, más allá que la simple exposición a la luz.

1.1.3.3 La amplitud

El tamaño o la intensidad de las oscilaciones o cambios de un ritmo circadiano durante un período de 24 horas se denomina amplitud circadiana. Representa la variación entre los puntos más altos y bajos de un ritmo durante su ciclo. En otras palabras, mide cuánto cambia un proceso biológico o un comportamiento a lo largo del día. La amplitud circadiana ofrece datos reveladores sobre la estabilidad y la potencia del ritmo. Mientras que una amplitud menor significa un ritmo más débil y menos claro, una amplitud mayor denota un patrón más prominente y predecible, con picos y valles más fáciles de identificar.

La amplitud circadiana y la estabilidad del ritmo circadiano son aspectos cruciales de los ritmos circadianos. Aunque los mecanismos que rigen los ritmos circadianos han sido ampliamente estudiados, los mecanismos específicos responsables de regular la amplitud de los ritmos circadianos siguen siendo menos conocidos. Es fundamental coordinar la regulación del tiempo del ciclo, incluidos el período, la fase y la amplitud

circadiana, para garantizar el buen funcionamiento de los procesos fisiológicos rítmicos (Ramkisoensing y Meijer, 2015).

1.1.3 Experimentos en oscuridad completa (DD)

Una de las áreas más intrigantes en el estudio de los ritmos circadianos es el comportamiento de estos ritmos en ausencia de *zeitgebers*. En condiciones DD, el SCN carece de información fótica necesaria para sincronizar el reloj interno del organismo con el entorno. En estas circunstancias, el organismo entra en un estado denominado “ritmo en libre curso” (*free running*). Aunque podría pensarse que la falta de *zeitgebers* anularía los ritmos circadianos, esto no es así. En realidad, los ritmos persisten pero se desvinculan del ciclo diario de 24 horas (Di Milia & Folkard, 2021). A manera de ilustración, en estudios donde se sometió a individuos a condiciones a oscuridad total, se notó un desplazamiento gradual en sus ciclos de sueño-vigilia, lo que demuestra que los ritmos circadianos continúan, aunque desincronizados del entorno externo.

Este estado de ritmo en libre curso ha sido invaluable para entender la naturaleza intrínseca de los ritmos circadianos. Experimentos en estas condiciones han revelado que el período circadiano puede variar entre organismos (Vitaterna et al., 2001). En humanos, por ejemplo, el período en condiciones de ritmo en libre curso es de aproximadamente 24.09 horas, mientras que en ratones es de 23.5 horas (McHill et al., 2017). Estos hallazgos subrayan la importancia de los *zeitgebers* en la sincronización de nuestros relojes biológicos con el mundo exterior. Es crucial destacar que la desincronización de estos ritmos tiene implicaciones para la salud. Los trabajadores nocturnos, por ejemplo, enfrentan un mayor riesgo de obesidad, enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer (Kervezee et al., 2020). Por lo tanto, es imperativo explorar estrategias que permitan mantener una alineación adecuada con el ciclo diario para fomentar la salud y el bienestar.

1.1.4 *Zeitgebers*: Sincronizadores de tiempo.

Los sincronizadores de tiempo son esenciales debido a que el ambiente está en constante cambio, y son estos los que conducen al entrenamiento circadiano. Sin embargo, no todas las señales externas, incluso si son recurrentes, pueden considerarse como sincronizadores de tiempo. Para ser considerado como tal, se deben cumplir las condiciones desarrolladas por Aschoff en 1954 (Aschoff, 1954) .

1. Si se elimina el *zeitgeber*, el período biológico debe comenzar a desviarse de las 24 horas exactas. Si el *zeitgeber* está presente, debe causar entrenamiento circadiano a la periodicidad del *zeitgeber*.
2. La inversión de un *zeitgeber* periódico debe conducir a la inversión del ritmo biológico. Por ejemplo, la inversión del ciclo de luz y oscuridad debe causar una inversión en los patrones de actividad física. Así también, un cambio temporal en el *zeitgeber* periódico debe causar un adelanto o atraso en el ritmo, dependiendo del cambio.
3. La efectividad del *zeitgeber* puede influir en los cambios del ritmo biológico al incrementar o disminuir la frecuencia de su exposición.

1.1.4.1 La luz

El *zeitgeber* más potente tanto para los animales como para plantas es la luz del sol. De hecho, en la cronobiología, regularmente se utiliza la luz como estímulo para desencadenar respuestas del reloj circadiano (Xie et al., 2019). La exposición durante el día activa al SCN, lo cual ayuda a mantener un estado de vigilia en humanos, mientras que en ratas y ratones favorece el sueño o una actividad reducida.

No solo es la exposición sino también su intensidad, lo que puede producir cambios en los ritmos circadianos. Un fenómeno conocido como la regla de Aschoff relaciona la intensidad de luz con el período en algunos organismos (Carpenter, 1986). La importancia de la luz como *zeitgeber* se ha demostrado en experimentos en laboratorios, así como en experimentos epidemiológicos a gran escala en la vida real (Roenneberg et al., 2013). La luz como un *zeitgeber* se describió alrededor de los años 60's al descubrir que el reloj molecular biológico del SCN puede ser reiniciado por la luz.

El SCN, en el hipotálamo, se encarga de distribuir esta información a los relojes periféricos. En la sección 1.5.1 se discutirá a profundidad la anatomía y fisiología del reloj circadiano. Ahora, si bien la luz solar es el principal *zeitgeber*, este se ve reflejado en el ciclo luz-oscuridad. Sin embargo, esta no es la única forma de sincronizar los relojes internos: el alimento, actividad física, o incluso el estrés pueden actuar como *zeitgebers* (Koch et al., 2017).

1.1.4.2 La temperatura

La temperatura es otro *zeitgeber* de gran importancia que regula la fisiología y el comportamiento en organismos vivos. La temperatura de un organismo sigue un ritmo circadiano el cual es influenciado por la temperatura del ambiente y el reloj interno biológico (Refinetti, 2020). En humanos, por ejemplo, la temperatura corporal tiene un ritmo que alcanza su pico máximo al finalizar la tarde y alcanza su punto más bajo durante el sueño (Zheng et al., 2019).

El hipotálamo controla la termorregulación. Cuando el hipotálamo siente cambios en la temperatura interna, este envía señales para que los órganos, tales como la piel, las glándulas y los músculos, se ajusten automáticamente (Todd et al., 2020). Se sabe que las neuronas en la parte preóptica (POA) que proyectan al núcleo dorsomedial (DMH), son las encargadas de regular la temperatura interna basado en la temperatura externa (Zhao et al., 2017). Ahora, el SCN tiene proyecciones directas hacia el DMH y se propone que son particularmente las neuronas VIP en el SCN, las cuales inhiben a las neuronas en el SPZ las cuales proyectan hacia el DMH (SCNVIP – SPZ – DMH) (Todd et al., 2020). Esta comunicación también podría ocurrir de manera bidireccional ya que el DMH puede responder a cambios de temperatura en el ambiente (Li et al., 2022).

La temperatura afecta además directamente al SCN, el cual contiene neuronas que pueden percibir cambios en la temperatura ambiental, así como en la temperatura

corporal. Adicionalmente, otros núcleos en el hipotálamo que están involucrados en la regulación de los ritmos circadianos son influenciados por la temperatura.

1.1.4.3 La alimentación

La alimentación desempeña un papel crucial en la regulación de los ritmos circadianos. Aunque la evidencia en humanos es limitada, estudios sugiere que la comida puede actuar como un *zeitgeber*, o sincronizador, en el sistema circadiano humano (Lewis et al., 2020). Esta idea se refuerza con investigaciones que exploran cómo la restricción del acceso a la comida en ciertos horarios del día puede sincronizar un oscilador alimentario (Stephan, 2002).

La interacción entre la nutrición, el metabolismo y el reloj circadiano también ha sido objeto de estudio. Se ha encontrado que la ingesta de alimentos en horarios específicos tiene un impacto significativo en la fisiología humana. Por ejemplo, se encontró que la ingesta de alimentos en horarios específicos puede tener un impacto significativo en la fisiología humana. Estos estudios sugieren que el momento y la frecuencia de las comidas, incluido el desayuno, están estrechamente vinculados al control circadiano de la digestión y el metabolismo. Esto está relacionado a la observación de que ciertos fitoquímicos en los alimentos, como polifenoles, flavonoides y melatonina, pueden influir en la expresión y el ritmo de los genes del reloj circadiano (Krieger, 1974)

La comida es considerada el segundo *zeitgeber* más importante después de la luz, y puede inducir cambios significativos en variables fisiológicas como la temperatura corporal y los niveles de cortisol (Lewis et al., 2018). En el reino animal, se ha observado que los mamíferos aumentan su actividad locomotora de 2 a 4 horas antes de que se les proporcione comida (Stephan et al., 1979). En resumen, la alimentación actúa como un *zeitgeber* en la regulación de los ritmos circadianos. Sin embargo, aún se requiere más investigación para entender los mecanismos subyacentes en esta compleja interacción.

1.1.4.4 El ejercicio

El ejercicio puede influenciar varios aspectos de los ritmos circadianos tales como el sueño, la secreción de hormonas, la temperatura corporal y la expresión de genes (Reilly, 1990). Por lo mismo, ha sido propuesto como un sincronizador del reloj biológico (Czeisler, 2015). Se considera que la forma principal en la cual el ejercicio actúa como un *zeitgeber* es a través de la regulación del sueño. El ejercicio puede aumentar la duración y la calidad del sueño, y esto puede reiniciar el reloj molecular (Dolezal et al., 2017; Gabriel & Zierath, 2019). Además, el restablecimiento del reloj circadiano a nivel molecular, combate los efectos negativos debidos a la disrupción de sueño (Gabriel & Zierath, 2019). Se ha propuesto que los ritmos circadianos son clave en la mejora a la salud y el rendimiento físico que proporciona el ejercicio (Lewis et al., 2018).

Una forma en la cual el ejercicio puede actuar como un sincronizador del tiempo es a través de la secreción de hormonas que a su vez regulan el ciclo de sueño y vigilia. El ejercicio promueve la secreción de varias hormonas que están estrechamente implicadas en la regulación de los ritmos circadianos tales como la hormona del crecimiento, testosterona y cortisol (Haupt et al., 2021; Teo et al., 2011). La hormona del crecimiento es esencial para la reparación y crecimiento de los tejidos (Dattilo et al., 2011). Por otra parte, la testosterona, está involucrada en la regulación del ciclo sueño y vigilia y puede promover el sueño profundo (Carrier et al., 2017). Es interesante notar que la testosterona podría estar afectando la expresión de los genes del reloj en el SCN (Hashimoto et al.). Sin embargo, los mecanismos de este proceso no son del todo claros y varían considerablemente dependiendo de factores como la edad y el sexo (Carrier et al., 2017). Finalmente, el cortisol, el cual participa en la regulación del ciclo sueño y vigilia (De Nys et al., 2022), ha sido propuesto como un mensajero secundario entre el reloj central y los relojes periféricos (Chan & Debono, 2010).

El ejercicio también puede actuar como *zeitgeber* al promover la activación de neuronas involucradas en el gasto energético (Tran et al., 2022). En específico, las neuronas de propiomelancortina (POMC) producen a la hormona Alpha melanocyte-stimulating hormone (alfa-MSH), la cual tras unirse a los receptores de melanocortina en receptores

localizados en PVN y otros núcleos estimula a un aumento en el gasto energético y reduce la alimentación (Tran et al., 2022). En resumen, el ejercicio emerge como un potente regulador de los ritmos circadianos, con múltiples mecanismos de acción que incluyen la regulación del sueño, la secreción hormonal y la activación neuronal.

1.1.4.5 Interacciones sociales

Las interacciones sociales también han sido propuestas como un potencial *zeitgeber* (Ehlers et al., 1988). Una de las maneras en las cuales este proceso podría suceder es al regular la fase y el período de los ritmos circadianos de forma directa o indirecta (Mistlberger & Skene, 2004). De manera indirecta, por ejemplo, a través del sería del condicionamiento a la exposición de señales fóticas asociadas con cierto comportamiento. Por otra parte, de forma directa, se ha encontrado que en algunas especies las señales maternas, tales como el amamantamiento o contacto físico, actúan como el *zeitgeber* principal (Mistlberger & Skene, 2004). En los adultos, las interacciones sociales pueden resultar en cambios de fase que pueden ser sincronizadas por una interacción social discreta recurrente. Sin embargo, es importante notar que esta sincronización es más débil que la de la luz, esto medido a través de la curva de respuesta de fase (PRC) (Mistlberger & Skene, 2004).

La mejor evidencia de una potencial sincronización social en los humanos se encuentra en individuos con ceguera. A excepción de todas las personas con ceguera específicamente causada por extirpación quirúrgica de ambos ojos, las personas con ceguera en general muestran ritmos libres (Mistlberger & Skene, 2004). Sin embargo, un porcentaje significativo de individuos con ceguera, sin aparente percepción a la luz, muestran ritmos de 24 horas (Emens, 2020). Es interesante notar que, en estos casos, el estímulo sincronizador no ha sido identificado.

1.1.4.6 Moléculas

Hasta la fecha, se han encontrado una gran cantidad de moduladores del sistema circadiano. Los moduladores del reloj circadiano actúan sobre varias proteínas,

particularmente aquellas que participan en la regulación del reloj circadiano y resultan en cambios en uno o varios parámetros de los ritmos circadianos (Ribeiro et al., 2021). Estas moléculas tienen el potencial de tratar enfermedades relacionadas con defectos de los ritmos circadianos, como trastornos del sueño, trastornos metabólicos y cáncer. Entre estos moduladores, se han identificado pequeñas moléculas que pueden regular los ritmos circadianos (Lee et al., 2011).

En este contexto, la melatonina emerge como un factor crucial en la regulación de los ritmos circadianos (Cajochen et al., 2003). Esta hormona, cuya síntesis y secreción muestra ritmicidad circadiana, no solo regula el sueño, sino que también se produce en respuesta a la oscuridad y puede cumplir la función de un *zeitgeber*. Sin embargo, la melatonina puede tener efectos inconsistentes en los ritmos de actividad circadiana en *free-running* (Benloucif & Dubocovich, 1996).

Por otra parte, debido a su rol como *zeitgeber* la melatonina ha ganado reconocimiento como un potencial tratamiento terapéutico para trastornos del ritmo circadiano. La melatonina tiene la capacidad de inducir cambios de fase en los ritmos circadianos (Arendt & Deacon, 1997) y de corregir trastornos del ritmo circadiano (Nir, 2003). Estudios recientes sugieren que el tratamiento con melatonina puede tener efectos positivos en ritmos circadianos en diversas condiciones. Se recomienda el uso de melatonina liberación prolongada para el tratamiento de síntomas de insomnio o insomnio comórbido en trastornos neuropsiquiátricos y la mejora de la calidad del sueño (Palagini et al., 2021). Por último, se ha propuesto la restauración de los ritmos circadianos para manejo de condiciones hepáticas (Sato et al., 2020).

1.1.5 Los núcleos hipotalámicos

1.1.5.1 El núcleo supraquiasmático (SCN)

El descubrimiento del SNC como el principal regulador del mecanismo del reloj fue en el 1970. Al lesionar directamente este núcleo, se obtiene una completa pérdida de los ritmos circadianos de comportamiento (Klein & Weller, 1970). Poco después de este

descubrimiento, se encontró que cuando se realiza un trasplante de SCN saludable a individuos cuyo SCN esté defectuoso, se obtiene una recuperación de estos ritmos circadianos (Drucker-Colín et al., 1984).

1.1.5.1.1 Estructura y función del SCN

El SCN está compuesto por dos núcleos. En roedores, cada núcleo es de aproximadamente 10,000 neuronas—mientras que en humanos son cerca de 40mil neuronas—y se encuentran situados a cada lado del tercer ventrículo, directamente encima del quiasma óptico. Gracias a la heterogeneidad de su composición de pequeños neuropéptidos, este se puede subdividir en dos regiones: el centro y el caparazón. En la región central encontramos neuronas que producen al péptido de vasoactivo intestinal (VIP) y al péptido secretor de gastrina (GRP) y en la parte del caparazón está la vasopresina (AVP) (Hastings et al., 2018). Estos péptidos no sólo muestran expresión oscilatoria, sino que también están implicados en el control de los ritmos circadianos (Abrahamson & Moore, 2001) (**Figura 3**).

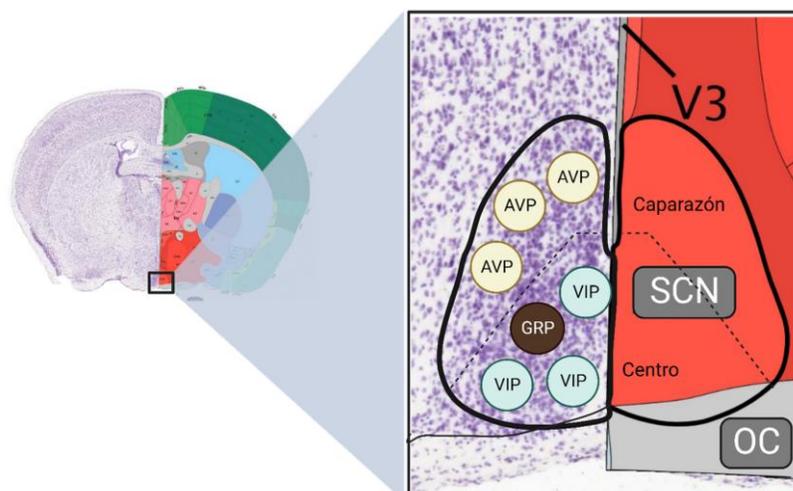


Figura 3. Estructura del SCN en ratones. El SCN está compuesto por dos núcleos simétricos situados a cada lado del tercer ventrículo, encima del quiasma óptico. El SCN se puede dividir en dos regiones, caparazón y centro, dependiendo de las neuronas que producen diferentes péptidos, como VIP, GRP, Y AVP. Estos péptidos oscilan y están involucrados en el control de los ritmos circadianos. (Creado con BioRender.com; imagen del cerebro tomada de Allen Mouse Brain Atlas disponible en mouse.brain.map.org)

El neuropéptido VIP es un sincronizador vital de los relojes internos en las neuronas del SCN (Herzog et al., 2017). Este neuropéptido se produce por las neuronas retino cepetoras que abarcan una décima parte de la red neuronal del SCN (Maywood et al., 2011). En los experimentos con un *knock-out* de *Vip* o de uno de sus receptores, *Vipr2*, la robustez de los ritmos circadianos disminuye considerablemente (Aton et al., 2005). También, la introducción de cantidades excesivas de VIP en cultivos celulares atenúa la sincronización de los ritmos circadianos (Harmar et al., 2002). Incluso, agregar VIP de forma exógena puede cambiar la fase *in vitro* e *in vivo* (Piggins et al., 1995). Esto sugiere que el VIP es requerido para una correcta sincronización de los ritmos circadianos. También, al hacer una delección de *Vip* en ratón, la fase se recorre por aproximadamente 8 horas. Estos cambios de fase por VIP podrían darse a través de la señalización intracelular por cAMP (Hamnett et al., 2019).

El neuropéptido AVP potencialmente juega un papel más importante del que anteriormente se le había atribuido (Mieda, 2019). A falta de señalización por VIP, la señalización de AVP para la sincronización del SCN se vuelve evidente (Ono et al., 2016). El promotor para *Avp* contiene una caja de tipo E-box (la diana del dímero CLOCK/BMAL1). A lo largo del día, los niveles de AVP cambian de manera robusta. En el caso que se tenga el gen de *Clock* mutado, los niveles de AVP se muestran tenues (Jin et al., 1999). Además, la aplicación de un antagonista del receptor de AVP en un cultivo celular WT SCN/VIPR2 en el cual se habían restaurado anteriormente los ritmos circadianos, inhibe dichos ritmos (Maywood et al., 2006).

1.1.5.1.2 Regulación del cortisol y melatonina a través del SCN

Además de controlar los ritmos circadianos, el SCN juega un papel en mecanismos homeostáticos no circadianos, incluida la secreción de cortisol y melatonina (Stoynev et al., 2022). Esta función reguladora se evidencia en la variabilidad de la densidad y distribución de los receptorSi es MIT1 de melatonina en el SCN a lo largo del ciclo

circadiano, lo cual subraya su importancia en la modulación de la función del SCN (Waly & Hallworth, 2015). Además, el SCN regula directamente la producción de melatonina en la glándula pineal del cerebro. Esta regulación se lleva a cabo mediante factores sinápticos difusibles, como el ácido gamma aminobutírico (GABA), que ejerce una señal inhibitoria en la vía PVN pineal durante el día subjetivo, esto garantiza así un equilibrio adecuado para la producción de esta hormona (Claustrat et al., 2005).

Adicionalmente, el SCN es fundamental en la respuesta del cuerpo a estímulos lumínicos, transmitiendo señales a diferentes regiones del cerebro y células endócrinas (Mohawk et al., 2012). Una de sus funciones es asegurar, a través de una conexión polisintética, que la glándula pineal produzca melatonina de manera rítmica. La melatonina alcanza su pico de concentración durante la noche, lo cual promueve el estado de sueño en animales diurnos. Paralelamente, el SCN, a través del PVN y la glándula pituitaria, impulsa un ritmo circadiano para la liberación de la hormona adrenocorticotrópica (HACT). Esta hormona a su vez desencadena un aumento matutino en la liberación de corticosterona desde la glándula suprarrenal. Los corticosteroides, como la corticosterona, promueven la excitación y el estado de alerta además de impulsar el metabolismo catabólico. Es interesante notar que, la luz azul suprime significativamente la producción de melatonina (Panda et al., 2003) y, a su vez, estimula la producción de corticosterona en la glándula suprarrenal a través de una vía simpática que no depende de HACT (Ishida et al., 2005).

1.1.5.2 El núcleo arqueado

El núcleo arqueado (ARC) se encuentra en el medio basal del hipotálamo, formando una entidad neuronal con la eminencia media (ME) (Korf & Møller, 2021). Es esencial en la regulación de la homeostasis energética del metabolismo. El ARC integra señales de adiposidad y nutrientes circulantes, desempeñando un papel crucial en la regulación de la alimentación, la homeostasis de la glucosa y otras funciones fisiológicas (Jais & Brüning, 2022).

Adicionalmente, las neuronas del ARC detectan y responden a las variaciones en las concentraciones de lactato y glucosa, lo que desencadena una compleja red de respuestas neuroquímicas y neurofisiológicas (Cortes-Campos et al., 2013). Estas respuestas controlan el gasto energético y el comportamiento relacionado con la ingesta de alimentos.

Las neuronas del ARC también están involucradas en la vía de la melanocortina, que tiene un papel fundamental en la regulación del apetito y balance energético. Esta vía es esencial para mantener la homeostasis energética y está compuesta por dos tipos principales de neuronas: las que expresan el neuropéptido Y (NPY) y la proteína relacionada con el agutí (AgRP), y las que expresan la proopiomelanocortina (POMC). Mientras que las neuronas NPY/AgRP prevén la ingesta de alimentos y reducen el gasto energético, las neuronas POMC tienen un efecto opuesto, suprimiendo el apetito y aumentando el gasto energético. Estas neuronas responden a una variedad de señales periféricas, incluyendo hormonas como la leptina y la insulina, que informan al cerebro sobre el estado energético del cuerpo (Belgardt et al., 2009). La interacción y balance entre estas neuronas en el ARC es crucial para la regulación adecuada del apetito y el metabolismo.

El ARC se encuentra en una posición estratégica para comunicar información metabólica periférica al SCN. El ARC transmite información metabólica periférica al SCN, lo que indica una vía para el intercambio de información metabólica y circulante (De Souza et al., 2005). En el contexto de la cronoterapia con NAD⁺, es esencial considerar como el ARC interpreta y transmite señales relacionadas con el equilibrio energético al SCN. Además, el NAD⁺ juega un papel esencial en las funciones cerebrales, incluyendo la neurotransmisión, que es relevante para la actividad del ARC (Ying, 2007).

1.1.5.3 El núcleo ventromedial (VMH)

El VMH es una estructura esencial en el hipotálamo con una variedad de funciones neuroendocrinas. Aunque el ARC ha sido el principal foco de estudio en relación con la regulación del peso y comportamientos alimenticios, el VMH también juega un papel

crucial en estos procesos. La disrupción del VMH puede provocar obesidad, similar a la disrupción del ARC (Albert et al., 1971) Sin embargo, las funciones y mecanismos subyacentes en estos dos núcleos son distintos. Mientras que el ARC integra señales circulantes de sangre y saciedad relacionadas con la disponibilidad de energía y nutrientes (Korf & Møller, 2021).

El VMH está involucrado en la regulación de la glucosa, termogénesis, apetito, y también en comportamientos más complejos como los sociales y sexuales. Se ha demostrado que el VMH está involucrado en la regulación de comportamientos alimenticios y puede recibir información sensorial relacionada con la distensión gástrica (Takeichi & Noda, 1974). Una característica distintiva del VMH es la presencia del factor esteriodogénico 1 (SF1) que juega un papel vital en el desarrollo de las neuronas del VMH y en general en el cerebro. Es importante destacar que SF1 se encuentra exclusivamente en el VMH.

En el contexto de los ritmos circadianos, el VMH tiene un papel significativo, especialmente en relación con la obesidad. Se ha encontrado que las lesiones en el VMH eliminan la ritmicidad adrenal y de temperatura asociada con la alimentación. Además, el reloj circadiano en el VMH controla el gasto energético cíclico, específicamente a través de la modulación de la termogénesis del tejido adiposo pardo (Orozco-Solis et al., 2016).

En cuanto a la relación con el NAD⁺, aunque la información específica sobre el VMH y NAD⁺ es limitada, se ha sugerido que NAD⁺ juega un papel en funciones celulares, incluyendo la homeostasis del calcio y la expresión génica, lo cual es relevante para la actividad del VMH (Ying, 2007). Asimismo, el NAD⁺ se ha identificado en funciones cerebrales, incluyendo en la neurotransmisión, en el aprendizaje y la memoria, lo que podría ser relevante para las funciones cognitivas del VMH (Ying, 2007).

1.2 Mecanismos moleculares del reloj circadiano

El mecanismo molecular del reloj circadiano está presente en todas las células, pero es en el SCN donde se manifiesta un ritmo autónomo, principalmente debido a su función única de acoplamiento con la luz. La **Figura 4** ilustra un mecanismo simplificado del reloj circadiano en mamíferos. Después de dados los mecanismos postraduccionales en el núcleo de las células, después de la transcripción de los genes del reloj, y la exportación de los mensajeros de RNA se procede a la síntesis de proteínas en los ribosomas en el citoplasma celular. En el citoplasma, varias proteínas forman heterodímeros los cuales son importados al núcleo y regulan, ya sea positiva o negativamente, la transcripción de genes. A este tipo de mecanismo se le conoce como regulación bucle de retroalimentación negativa o positiva (en inglés, negative or positive feedback loop).

El heterodímero CLOCK:BMAL1 reconoce la secuencia CACGTG, mejor conocida como E-box, la cual se encuentra en regiones regulatorias como promotores de los genes controlados por el reloj (*Clock Controlled Genes*, CCGs). Los CCGs codifican un gran número de proteínas que le confieren complejidad y robustez al mecanismo del reloj. Los genes, *Period* (*Per1-3*) y *Cryptochrome* (*Cry1-2*) codifican proteínas que forman un heterodímero en el citoplasma y pueden ser importadas al núcleo para desestabilizar la unión de CLOCK:BMAL1 a la E-box. De esta forma se regula negativamente las diversas proteínas que componen a las rutas de regulación del reloj, incluidos acá, PER y CRY.

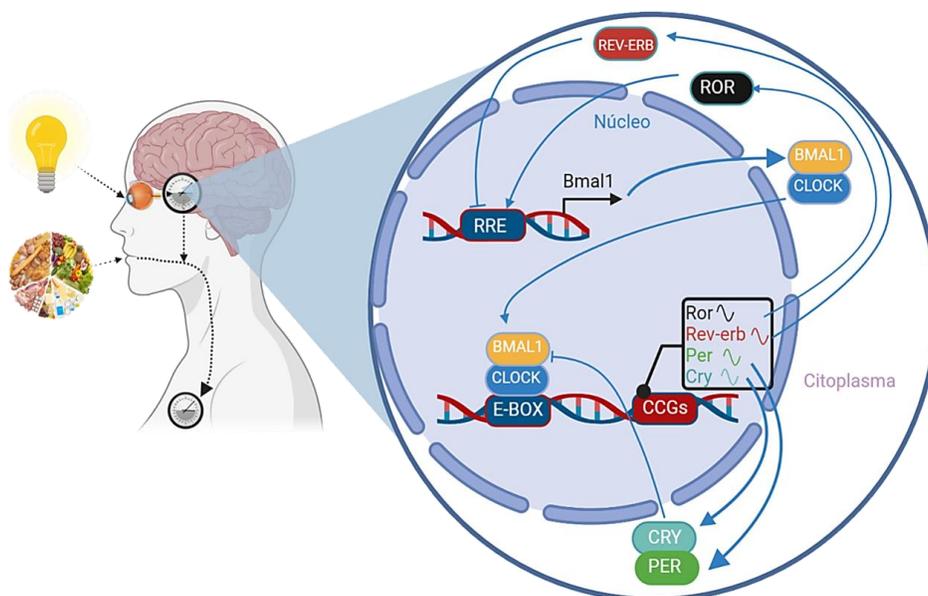


Figura 4. El mecanismo molecular de los ritmos circadianos. Las proteínas CLOCK y BMAL1 se dimerizan y actúan en cis, en la E-box, para comenzar con la transcripción de las proteínas PER y CRY. Estas últimas se pueden dimerizar y unirse al heterodímero CLOCK:BMAL1 y así inhibir la transcripción de los genes controlados por el reloj. Por otra parte, las proteínas ROR y REV-ERB, pueden activar o reprimir, respectivamente, la transcripción de BMAL1. (Creado con BioRender.com)

No solo las proteínas PER y CRY participan en la regulación sino también otros genes del reloj generan un bucle de retroalimentación transcripcional. Los receptores nucleares REV-ERB pueden inhibir la transcripción de *Bmal1* ya que se pueden unir a otra clase de elementos reguladores denominados RRE (En inglés, *Ror-Responsive Element*). Aquí también tenemos un tipo de competencia entre el *retinoica acid-related orphan receptor* (ROR) el cual, de manera contraria a REV-ERB, induce la transcripción de *Bmal1*. Esto añade robustez al reloj molecular biológico.

1.3 Disfunción del metabolismo en respuesta a dieta hipercalórica

El síndrome metabólico (SMet) es un conjunto de anormalidades metabólicas que elevan el riesgo de padecer diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares y ciertos cánceres. ((Esposito et al., 2012). Estas anormalidades incluyen obesidad central, hipertensión, hiperglucemia, hipertrigliceridemia, niveles bajos de colesterol con lipoproteínas de alta densidad, resistencia a la insulina (IR) e intolerancia a la glucosa. Para ser diagnosticado con SMet, es necesario presentar al menos tres de estos signos. En México, se estima que entre 40.2% y 59.99% de adultos padecen de síndrome metabólico (Rojas-Martínez et al., 2021)

Varios factores contribuyen a la aparición del SMet, como el aumento de peso, la inactividad física y una predisposición genética. La resistencia a la insulina es un componente clave en el desarrollo del SMet. De hecho, anteriormente, se le denominaba “síndrome de resistencia a la insulina” (Sarafidis & Nilsson, 2006). Una persona con resistencia a la insulina enfrenta dificultades para procesar la glucosa, lo que resulta en niveles elevados de azúcar en sangre.

1.3.1 Resistencia a la Insulina

La insulina es una hormona esencial producida por el páncreas que permite que las células del cuerpo absorban glucosa y la utilicen como fuente de energía. Su función principal es regular los niveles de azúcar en la sangre y mantenerlos dentro de un rango normal. Sin embargo, en ciertas condiciones, las células pueden volverse menos sensibles a la acción de la insulina, lo que se conoce como resistencia a la insulina (IR).

La IR es un estado patológico de gran complejidad en el cual las células, como los adipocitos y cardiomiocitos, muestran una respuesta reducida a la hormona insulina (Yaribeygi et al., 2019). Aunque comúnmente se asocia con alteraciones en el metabolismo de la glucosa, enfermedades como la hipertensión arterial y anomalías del colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad (cHDL) también están relacionadas con la IR.

En relación con las funciones cerebrales, se ha observado que la insulina, junto con otros factores de desregulación metabólica, se encuentra elevada en la enfermedad de Alzheimer. Un estudio longitudinal, el cual incluyó a 2322 participantes de 50 años, encontró que, durante un seguimiento de 32 años, 102 participantes fueron diagnosticados con Alzheimer, 52 con demencia vascular y 394 con demencia y deterioro cognitivo de cualquier tipo (Rönnemaa et al., 2008). Este estudio reveló que una respuesta insulínica reducida al inicio del estudio estaba asociada con un mayor riesgo acumulado de enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto, no son necesariamente los niveles bajos de insulina los que son peligrosos, sino una respuesta inadecuada o reducida a la insulina lo que puede aumentar el riesgo de ciertas enfermedades.

1.3.2 Diabetes tipo 2

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica que se caracteriza por niveles altos de glucosa en sangre (Sapra & Bhandari, 2023). Existen varias categorías de diabetes, incluyendo la diabetes tipo 1 y tipo 2. La diabetes tipo 1 es una enfermedad autoinmune en la que el cuerpo ataca al páncreas y no puede producir su propia insulina.

La diabetes tipo 2 ocurre cuando el cuerpo no puede utilizar adecuadamente la insulina producida por su organismo y puede producir suficiente insulina.

La DM es una enfermedad crónica frecuentemente asociada con anormalidades metabólicas como la obesidad e hipertensión arterial. La diabetes tipo 2, la forma más común de DM está vinculada con el síndrome metabólico (SMet). Existe evidencia de que el riesgo cardiovascular en pacientes con diabetes se reduce en ausencia de SMet. Sin embargo, factores como el bajo nivel de actividad física, una dieta deficiente y la obesidad aumentan el riesgo de desarrollar esta enfermedad.

Las alteraciones refieren a un cambio en la concentración de glucosa, lípidos, insulina entre otras variables directas como la presión sanguínea y la temperatura, los cuales inducen la aparición de ciertas patologías severas que conllevan a otras alteraciones como el incremento de la masa de tejido graso, alteraciones cardiovasculares, cáncer, incremento de glucosa, lípidos en sangre, y envejecimiento a temprana edad. Debido a ello, es importante considerar el factor circadiano en relación con patologías involucradas con el síndrome metabólico.

1.4 El metabolismo y los ritmos circadianos

La relación entre la alimentación y el sistema circadiano es compleja pero esencial para mantener una buena salud. Diversos estudios sugieren que el control circadiano juega un papel crucial en la homeostasis energética. El reloj circadiano regula varios aspectos del metabolismo energético, incluyendo el metabolismo de la glucosa y lípidos, la secreción de la insulina y la utilización de reservas energéticas a lo largo del ciclo de sueño y vigilia (Serin & Acar Tek, 2019). La interrupción del ritmo circadiano puede tener efectos negativos en el metabolismo energético y aumentar el riesgo de trastornos metabólicos como la diabetes y la obesidad (Kalsbeek et al., 2011). La perturbación de los ritmos circadianos, resultado de la sociedad moderna, debido a factores como la iluminación artificial, el estilo de vida sedentario y los alimentos ricos en calorías, ha contribuido al aumento de patologías relacionadas con el estilo de vida (Gerhart-Hines &

Lazar, 2015). Por último, la sincronización de la actividad y el descanso con el reloj circadiano es crucial y esta puede verse afectada por factores tanto ambientales como fisiológicos (Riede et al., 2017) (Froy, 2007).

Adicionalmente, las hormonas más importantes para el metabolismo, como la insulina, el glucagón, la adiponectina, la corticosterona, la leptina y la ghrelina, experimentan oscilaciones circadianas (Panda, 2016; Stenvers et al., 2019). Estas oscilaciones hormonales juegan un papel crucial en la regulación del apetito, la saciedad y la utilización de energía en función del tiempo del día. El sistema circadiano y el metabolismo mantiene una relación mutua: mientras que los ritmos circadianos proporcionan una periodicidad a los procesos fisiológicos, también reciben señales metabólicas de retroalimentación, especialmente aquellas relacionadas con la ingesta de alimentos.

Los ciclos circadianos tienen una estrecha relación con el metabolismo. De hecho, las enzimas que son clave en la regulación metabólica son expresadas de forma oscilatoria acoplándose a los ciclos de luz-oscuridad y ciclos de ayuno-alimentación. Una desregulación de los ciclos circadianos, como con un trabajo por turno nocturno, por ejemplo, puede contribuir a la aparición de síndrome metabólico. Lo contrario también es cierto, ya que el síndrome metabólico está asociado a una desregulación de los ritmos circadianos que podría acompañarse de alteraciones en la función del mecanismo del reloj molecular.

1.5 Beneficios del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD⁺) para prevenir enfermedades relacionadas al síndrome metabólico.

Aunque la dieta y el ejercicio pueden mejorar el síndrome metabólico, también se ha investigado otros enfoques terapéuticos. El dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD⁺) además de ser una molécula esencial para el metabolismo energético y celular, es relevante en el síndrome metabólico. Se ha demostrado que una falta de regulación en los niveles de NAD⁺ está asociado al síndrome metabólico (Vaziri et al., 2003). Varios estudios han demostrado que en los humanos y en ratones obesos los niveles de NAD⁺

se encuentran reducidos en el tejido adiposo (Okabe et al., 2019). Por lo tanto, la manipulación de los niveles del NAD^+ podría ser una estrategia terapéutica prometedora para abordar el síndrome metabólico.

1.5.1 NAD^+

El NAD^+ fue descrito en 1906 por Sir Arthur Harden y William Young, quienes encontraron que estaba involucrado en los procesos de fermentación de la levadura (Rajman et al., 2018). Varios años más tarde, en 1930, Sir Hans Adolf Krebs descubrió que el NAD^+ tiene un papel crítico en el metabolismo de la glucosa (Rajman et al., 2018). Estos hallazgos permitieron que se estudiara extensamente el rol del NAD^+ y su papel crucial se extiende desde el metabolismo celular hasta la expresión de genes y la reparación de DNA. La estructura del NAD^+ es bastante sencilla; consiste en dos nucleótidos, nicotinamida y adenina, conectados por un grupo fosfato. La adenina contiene una base nitrogenada conectada a una molécula de ribosa, la cual se encuentra unida a los grupos fosfato (**Figura 5**). Por otra parte, el nucleótido de nicotinamida, el cual se encuentra también unida a una molécula de ribosa, es también unida a otro grupo fosfato.

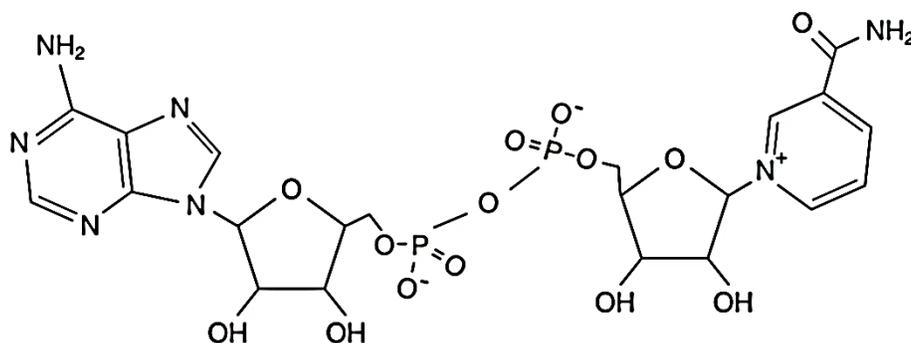


Figura 5. Estructura del NAD^+ . El NAD^+ es un dinucleótido compuesto por nicotinamida y adenina unidos por un enlace entre dos grupos fosfato. La adenina contiene una base nitrogenada unida a una molécula de ribosa, la cual se encuentra unida a un grupo fosfato. La nicotinamida, por su parte, también está unida a una molécula de ribosa y a otro grupo fosfato. (Creado con ChemDoodle.com)

1.5.2 El rol de NAD⁺ en el metabolismo energético.

Uno de los roles principales del NAD⁺ es su participación en los procesos de metabolismo energético celular. El NAD⁺ es un componente clave de la cadena de transporte de electrones, lo que genera la principal forma de energía de las células: la adenosina trifosfato (ATP) (Li & Sauve, 2015). Específicamente, el NAD⁺ actúa como un acarreador de electrones. Estas transferencias de electrones, denominadas reacciones redox, entre NAD⁺ y NADH participan en catabolismo, que es el proceso mediante el cual los organismos obtienen su energía. Por ejemplo, el NAD⁺ es un cofactor en la glucólisis, la oxidación de ácidos grasos, el ciclo del ácido cítrico, el ciclo de Cori, entre otros y recientemente se encontró su rol como cofactor en la síntesis de ácidos grasos altamente insaturados (Katsyuba et al., 2020).

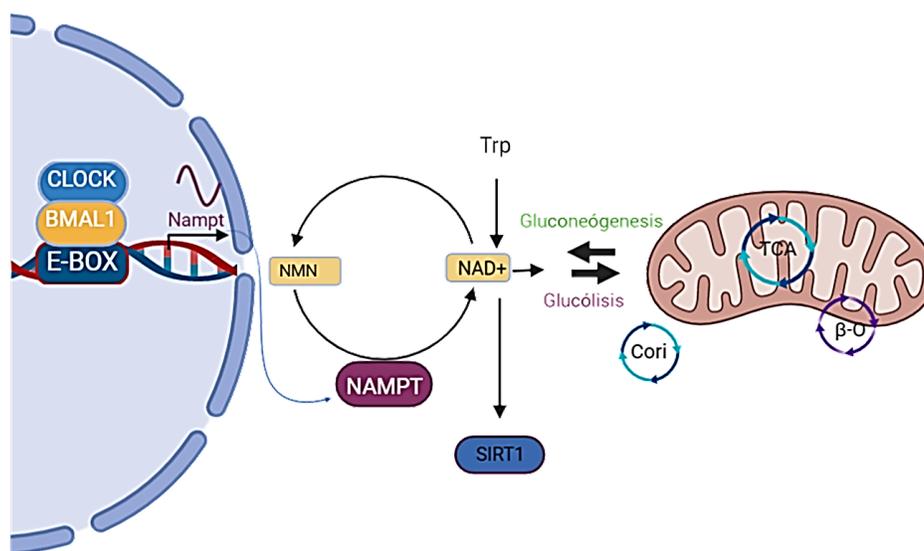


Figura 6. Papel del NAD⁺ en el metabolismo energético. El comportamiento circadiano del NAMPT (enzima que cataliza la conversión de NMN a NAD⁺) y NAD⁺ se conecta a las rutas metabólicas más importantes tales como el ciclo del ácido cítrico, la fermentación y beta oxidación. El NAD⁺ desempeña un papel crucial en el metabolismo energético celular, participando en la generación del ATP y en reacciones REDOX. (Creado con BioRender.com)

El rol del NAD⁺ también actúa como una molécula señalizadora, y en conjunto con sus metabolitos, juega un papel clave en la señalización de Ca²⁺ (Koch-Nolte et al., 2009)

También, los beneficios del NAD⁺ que podrían extenderse hasta para combatir enfermedades neurodegenerativas (Belenky et al., 2007). Los niveles de NAD⁺ están relacionados a una gran cantidad de patologías. De hecho, se sabe que los niveles adecuados de NAD⁺ tienen efectos protectores y previenen la acumulación de grasas, la aparición de inflamación y fibrosis, incluso la resistencia a la insulina, el hígado graso y la esteatosis hepática no alcohólica (Katsyuba et al., 2020). En resumen, el NAD⁺ desempeña un papel fundamental en el metabolismo energético celular actuando como un acarreador de electrones en reacciones redox y participando en las vías metabólicas.

1.5.3 El rol de NAD⁺ en la expresión de genes y reparación del DNA.

El NAD⁺ es importante en el metabolismo como acarreador de protones; sin embargo, su rol celular es mucho más extenso y sorprendente. El NAD⁺ sirve como cofactor de proteínas, entre ellas las sirtuinas. Estas son deacetilasas que en los mamíferos son importantes para la regulación del metabolismo. De hecho, se ha descubierto, gracias a experimentos en gusanos y en moscas, que estas juegan un papel en longevidad (Rogina & Helfand, 2004). Es interesante notar que, la sirtuina más estudiada, la SIRT1, participa en la regulación del reloj circadiano, además de requerir el NAD⁺ como cofactor. SIRT1 desacetila la Lys537 de BMAL1 y de esta forma no se permite el reclutamiento de CRY1 lo cual permite que se reactive la transcripción de los genes del reloj (Hirano et al., 2016).

1.5.4 El NAD⁺ y los ritmos circadianos

La oscilación del NAD⁺ tiene una relación intrínseca con los ritmos circadianos. Se ha observado que tanto los niveles de NAD⁺ como los de NADP⁺ presentan ritmos circadianos complementarios, que podrían estar influenciados por los niveles del complejo calcio modulina (Johnston, 2014). Además, estudios han evidenciado que las alteraciones en las fluctuaciones de NAD⁺ en ratones resulta en cambios en el comportamiento y el metabolismo circadiano (Sahar et al., 2011). De manera interesante, una alteración en el ciclo de sueño y vigilia y en los ritmos circadianos se relaciona con niveles reducidos de NAD⁺ en adultos mayores (Nakahata & Bessho, 2016). También, los ratones deficientes de BMAL1 presentan niveles bajos de NAD⁺ (Nakahata et al.,

2009) Estos descubrimientos indican que las variaciones en el metabolismo de nucleótidos podrían influir en el comportamiento y la genética de los ritmos circadianos. No obstante, es crucial obtener más información para corroborar esta hipótesis.

Estudios recientes corroboran la noción de que los niveles de NAD⁺ mantienen un reloj circadiano saludable al controlar la programación del translocador nuclear de *PER2* y así contrarrestar los efectos negativos del envejecimiento (Levine et al., 2020). Además, se ha propuesto un modelo en donde el NAD⁺ podría controlar los ritmos circadianos durante el daño al DNA (Luna et al., 2015). Es posible que la deacetilasa dependiente de NAD⁺, SIRT1, participe en la relación del metabolismo, ritmos circadianos y envejecimiento (Rehan et al.). Esto debido a que se ha encontrado que los niveles del NAD⁺ pueden reestablecer la robustez de los ritmos circadianos a través de la desacetilación por SIRT1 de *PER2* (Schibler, 2020). Estos estudios sugieren que el NAD⁺ juega un papel en la regulación del reloj circadiano, sin embargo, los mecanismos por los cuales el NAD⁺ actúa no son del todo claros.

1.5.6 Los niveles de ENAMPT circulante en la sangre y su influencia en los ritmos circadianos

La enzima NAMPT, cuyo gen es un CCGs (**Figura 6**), juega un papel en la reacción que genera NAD⁺ y también muestra oscilaciones circadianas (Eckel-Mahan et al., 2013). Por otra parte, el eNAMPT, la enzima NAMPT circulante en la sangre, desempeña un papel esencial en la conducción de los ritmos circadianos, especialmente en la actividad locomotora y el gasto energético. Recientemente se encontró que la circulación eficiente de eNAMPT en el sistema sanguíneo es crucial para mantener un equilibrio en estos ritmos y garantizar el funcionamiento óptimo del organismo (Park et al., 2023). Adicionalmente, se encontró que cualquier desequilibrio o interrupción en la presencia de eNAMPT puede tener efectos adversos en la actividad locomotora y el metabolismo energético.

1.5.7 El ejercicio y su influencia en los niveles de NAD⁺

La interacción entre el ejercicio y los niveles de NAD⁺ está intrínsecamente ligada al sistema circadiano, constituyendo un trío fundamental para la salud óptima del individuo. Investigaciones recientes han evidenciado que la actividad física tiene un impacto directo en la regulación y producción de NAD⁺ (White & Schenk, 2012). Se ha encontrado que el ejercicio moderado, incrementa los niveles de NAD⁺ en los humanos y en ratones (Fukuwatari et al., 2001). Además, el ejercicio puede optimizar los niveles de NAD⁺ en el músculo esquelético. Se encontró que el ejercicio aeróbico y de resistencia puede incrementar la abundancia de NAMPT en individuos jóvenes y adultos (de Guia et al., 2019). Es vital hacer esta distinción dado que el ejercicio juega un papel vital para mantener la homeostasis de NAD⁺ durante el envejecimiento (de Guia et al., 2019). En resumen, estos resultados indican que el ejercicio puede impactar de manera positiva los niveles de NAD⁺ contribuyendo a su optimización.

Por otra parte, también se ha encontrado que la suplementación de NAD⁺ incrementa la capacidad de degradar glucógeno en hígados de ratón (Broetto-Biazon et al., 2004). A pesar de que las investigaciones sugieren que la suplementación de NAD⁺ tiene un impacto en el rendimiento físico es necesaria más investigación para entender completamente la relación entre NAD⁺ y el ejercicio.

1.5.8 Beneficios de la suplementación con NAD⁺

El NAD⁺ tiene un rol importante en varios procesos como la toxicidad celular y el síndrome metabólico. Múltiples investigaciones se orientan a comprender a detalle su funcionamiento, además de los beneficios que tiene aumentar sus niveles de forma exógena. Varias estrategias se han utilizado para este fin, principalmente tenemos tres: aumentar los niveles de NAD⁺ a través del aumento de la enzima que lo produce NAMPT, aumentar la cantidad de precursores de NAD⁺ disponibles o incrementar el mismo NAD⁺, o disminuir los niveles de enzimas de alto consumo de NAD⁺, como las PARP o CD38 (Covarrubias et al., 2021).

La inducción del aumento de las concentraciones de NAD⁺ de forma exógena con NMN, un precursor de NAD⁺, alivia varios problemas asociados al síndrome metabólico en

ratones (Mukhopadhyay et al., 2014). También, se ha encontrado que el tratamiento de NR (Nicotinamida Ribosida) después y durante una dieta hipercalórica tiene como efecto una disminución en la esteatosis hepática. Estos son dos de los miles de ejemplos que se encuentran en la literatura de los beneficios que ofrece el elevar los niveles de NAD⁺. Sin embargo, dado que NAD⁺ participa con regulaciones circadianas en el organismo, es sorprendente que este factor no haya sido considerado en las investigaciones anteriores a pesar de que existe una relación entre los padecimientos del síndrome metabólico y los ciclos circadianos.

2. ANTECEDENTES DIRECTOS

2.1 La cronoterapia con NAD⁺ revierte el fenotipo de obesidad inducida por la dieta.

Los últimos años han evidenciado un crecimiento en el reconocimiento del sistema circadiano como un elemento esencial en la prevención y tratamiento de la disfunción metabólica inducida por la dieta. A pesar de la importancia reconocida de los ritmos circadianos, en la práctica clínica estos suelen ser subestimados, y raras veces se consideran al decidir el momento del día para administrar tratamientos. Esta omisión es aún más sorprendente cuando estudios, como el realizado por Eckel-Mahan et al (2012), han destacado la interrupción de las oscilaciones circadianas del NAD⁺ hepático en contextos de dietas altas en grasas. Se observó que una dieta alta en grasa inhibe completamente la oscilación de NAD⁺, lo que sugiere que la perturbación de estos ritmos puede tener implicaciones significativas en la salud metabólica.

Quetzalcóatl Escalante Covarrubias, durante su proyecto de doctorado en el laboratorio Aguilar-Arnal, administró una inyección intraperitoneal (IT) de NAD⁺ 50mg/kg al ZT11, horario que corresponde a una hora antes del aumento circadiano normal del NAD⁺ hepático en un modelo de obesidad inducida por la dieta (DIO). Los resultados de este estudio indicaron que la cronoterapia con NAD⁺ mejora la patofisiología de la DIO. Se observó una disminución significativa del peso corporal durante las 8 semanas del tratamiento con NAD⁺ en ratones obesos (HFN, ratones obesos tratados con NAD⁺ al ZT11) en comparación con los ratones obesos que recibieron una inyección de solución salina (HF). Además, se restauró la oscilación diaria de NAD⁺ en el grupo HFN, oscilación característica de un estado saludable en ratones con una dieta normo calórica (CD). Los ratones tratados con NAD⁺ mostraron niveles más bajos de insulina circulante y una mejora en la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina. También se encontró una reducción significativa de los lípidos neutrales y de los triglicéridos hepáticos en los ratones obesos tratados con NAD⁺, resultado que indica una mejora en la esteatosis hepática asociada a la obesidad (Escalante-Covarrubias et al., 2023).

A nivel molecular se encontró una sobreexpresión de PPAR γ , el regulador maestro del metabolismo de lípidos, en los hígados de los ratones alimentados con dietas ricas en grasas con inyección salina. Sin embargo, en los ratones tratados con NAD $^{+}$ se observó niveles de expresión reducidos de PPAR γ , lo que indica que hay una modificación en el programa de expresión génica del metabolismo de lípidos.

2.2 El tratamiento con NAD $^{+}$ produce una reorganización transcripcional extensa.

Escalante-Covarrubias et al., 2023, encontraron que existe una reorganización transcripcional extensiva en el hígado de los ratones obesos tratados con NAD $^{+}$. Realizaron un análisis de transcriptómica analizando un punto durante el día (ZT6) y un punto durante la noche (ZT18) para los grupos CD, HF, HFN. Se encontró que los genes del control circadiano tales como Clock, Bmal1, Cry1, y N1r1d2 tuvieron una expresión diferencial en todos los grupos. También, se encontraron mejoras en la expresión génica de genes relacionados al metabolismo lipídico y genes relacionados a la respuesta al estrés en el grupo HFN.

2.3 La efectividad del NAD $^{+}$ como tratamiento para la disfunción metabólica inducida por la dieta varía según el momento del día de su administración.

Los autores también evaluaron si los efectos beneficiosos de restituir farmacológicamente las oscilaciones de NAD $^{+}$ dependen de la hora del día de la administración del tratamiento. Para ello, se suministró NAD $^{+}$ a un nuevo grupo de ratones con disfunción metabólica causada por la dieta con administración de NAD $^{+}$ al ZT23 (HFN23). En comparación con el grupo HFN23, se encontró que después de tres semanas del inicio del tratamiento, los ratones HFN tuvieron una pérdida mayor de su peso corporal. Esto sugiere lo que la eficacia del tratamiento con NAD $^{+}$ para contrarrestar el efecto de una dieta hipercalórica depende de la hora del tratamiento. Es importante mencionar que, en este estudio, no hubo diferencias significativas en el consumo de alimentos. Además, con respecto a los parámetros metabólicos de salud, se encontró que la eficacia del tratamiento con NAD $^{+}$ para la disfunción metabólica depende del

momento en que se administre, con mejores resultados observados cuando el NAD⁺ se administra al ZT11 en comparación con el ZT23 (Escalante-Covarrubias et al., 2023).

2.4 El tratamiento crono terapéutico del NAD⁺ reorganiza el reloj hepático

Las observaciones muestran que las reacciones a tratamientos en diferentes horas del día pueden estar relacionadas con el reloj molecular. Escalante-Covarrubias *et al*, en 2023, analizó la expresión de las proteínas del reloj hepático durante distintas horas del día en los grupos de ratones HFN y HFN23; encontraron una expresión de las proteínas del reloj CRY, *PER2* y REV-ERB α anti fásica entre sí, con una diferencia de 12 horas. Por ejemplo, la **Figura 7A** indica que la proteína P-BMAL1 es visible al ZT0 y su forma no fosforilada aparece al ZT12 en los animales HFN, mientras que esta relación se invierte en el grupo HFN23. Este hallazgo sugiere que al ZT23, el NAD⁺ regula la expresión de genes del reloj hepático.

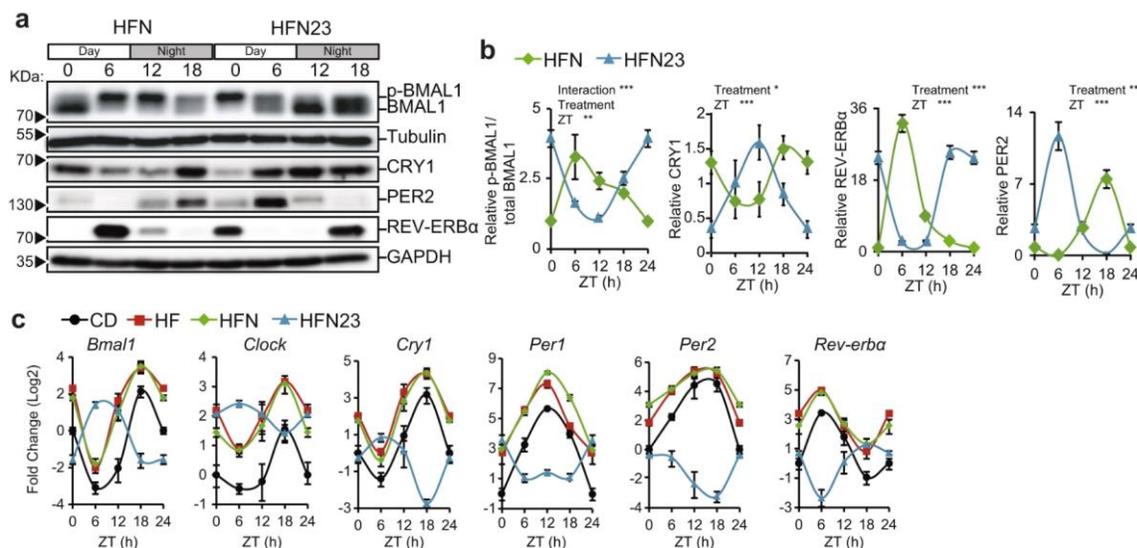


Figura 7. La acumulación de proteínas que controlan el reloj circadiano se encuentra de manera invertida en el tratamiento de NAD⁺ al ZT23. a) Western blot para p-BMAL1 (forma fosforilada), BMAL1, CRY1, *PER2* y REV-ERV α . b) Densitometría del gel en a). c) RT-qPCR para determinar la expresión de genes del reloj en el hígado. Figura modificada del artículo de (Escalante-Covarrubias et al., 2023).

Los niveles de transcritos a lo largo del ciclo circadiano para los genes controlados por el reloj tales como *Clock*, *Cry1*, *Per1*, *Per2* y *Rev α* se invirtieron a consecuencia de la

biodisponibilidad del NAD⁺ (**Figura 7C**). En consecuencia, la acrofase promedio de las oscilaciones, se desplazó de 10 a 12 horas en el grupo HFN23 en comparación con el resto de los grupos. Es importante mencionar que una de las posibles interpretaciones de los resultados de este experimento, era una disminución en la ritmicidad en la expresión de los genes del reloj, sin embargo, este fenómeno no se observó. Además, existe la posibilidad de que la dinámica antifásica no se extienda a los CCGs. La expresión hepática de los genes de *Dbp*, *Tef*, *Nfil3* y *Noct*, que está directamente controlada por el mecanismo del reloj circadiano, coincide con los cambios de expresión observados en los genes del reloj. Esto refuerza la idea de que el NAD⁺ tiene el potencial de sincronizar el reloj molecular hepático.

2.5 La actividad locomotora se mantiene alineada a la luz sin importar la hora del tratamiento del NAD⁺.

La actividad de alimentación y locomoción en ratones tratados con NAD⁺ permanece en gran medida alineada con la luz. Los análisis de comportamiento locomotor mostraron que, en general, el tratamiento con NAD⁺ preservó la alineación entre los patrones de luz-oscuridad y de descanso-actividad. La cuantificación de la locomoción en intervalos de 30 minutos reveló que, después del tratamiento con NAD⁺, los ratones se volvieron significativamente menos activos, pero, aun así, su actividad locomotora se mantuvo en fase con los ciclos de luz/oscuridad. Esto refuerza la idea de que el NAD⁺ puede potencialmente sincronizar el reloj molecular hepático, ajustando su fase al momento del día cuando la biodisponibilidad de NAD⁺ es mayor, sin afectar la alineación de la actividad locomotora con la luz.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La obesidad producto de la dieta es un problema de salud importante que afecta a una gran cantidad de personas a lo largo del mundo. Se ha encontrado que el tratamiento con NAD⁺ en modelos animales puede revertir la obesidad y el síndrome metabólico que la acompaña. El NAD⁺ es una molécula clave en el metabolismo celular que se ha encontrado con capacidad de actuar como señal ambiental de tiempo y puede influir en la sincronización y el ritmo de las oscilaciones circadianas. Además, el NAD⁺ participa en la regulación de la expresión de los genes y proteínas del reloj circadiano. Esto significa que el NAD⁺ puede influir en la fase de las oscilaciones circadianas en distintos tejidos con potencial ajuste de fase en el reloj maestro, el SCN.

Hasta el momento, el rol del NAD⁺ como sincronizador o dador de tiempo ha sido investigado principalmente en el contexto del hígado. Sin embargo, en lo que respecta al SCN, la investigación sobre el papel específico del NAD⁺ como señal ambiental de tiempo es limitada con resultados inconclusos debido a la dificultad para identificar al núcleo en disecciones hipotalámicas. Dado que el SCN es considerado el reloj maestro del sistema circadiano es de gran interés comprender si el NAD⁺ puede actuar como sincronizador o señal ambiental de tiempo para los genes rítmicos del reloj central.

4. JUSTIFICACIÓN

Los ritmos circadianos desempeñan un papel fundamental en la regulación de numerosos procesos fisiológicos en el cuerpo humano. Alteraciones de estos ritmos pueden conducir a trastornos de salud significativos, como la obesidad y el síndrome metabólico. En este contexto, NAD⁺ emerge como una molécula de interés debido a su potencial papel como sincronizador de estos ritmos. Aunque se ha demostrado que el NAD⁺ puede revertir la obesidad en modelos animales, es crucial entender los mecanismos subyacentes, especialmente en relación con la regulación circadiana. Si bien se ha sugerido que el NAD⁺ puede influir en los ritmos circadianos, los efectos específicos del NAD⁺ en el reloj maestro, el SCN, y en el comportamiento general aún no están completamente definidos.

Comprender cómo el NAD⁺ puede afectar la fase y la sincronización de las oscilaciones circadianas en el SCN resulta ser de gran interés, ya que esto conlleva implicaciones importantes en la regulación de los ritmos circadianos en todo el cuerpo. Por ejemplo, se podría desarrollar un tratamiento con NAD⁺ para tratar trastornos del ritmo circadiano, tales como trastornos del sueño, obesidad, o incluso desincronización circadiana causada por ceguera. También, es posible que el NAD⁺ pueda facilitar la sincronización a cambios por viajes entre zonas horarias.

5. HIPÓTESIS

La intervención cronofarmacológica con NAD⁺ puede revertir la obesidad inducida por la dieta en el ratón debido en parte a la reorganización transcripcional dada en el SCN. Los cambios transcripcionales estarán influenciados por la hora en la aplicación del tratamiento del NAD⁺. Esto, a su vez, podría derivar cambios conductuales que sean medibles.

6. OBJETIVO

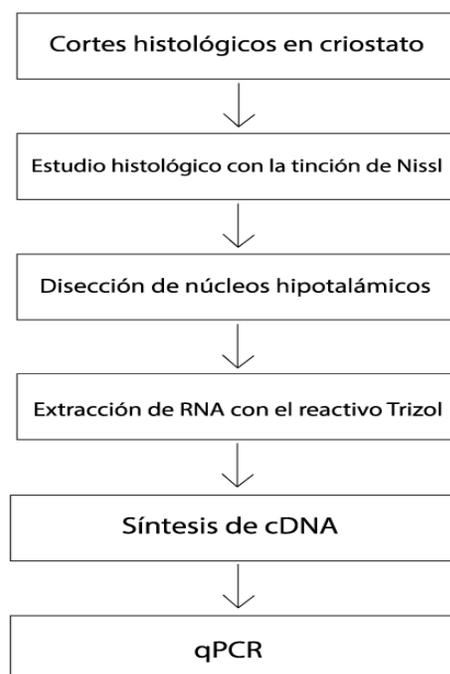
Evaluar el efecto de la restauración de los niveles circadianos del NAD⁺ en la transcripción de genes rítmicos del reloj central (SCN), y en la conducta circadiana.

6.1 Objetivos particulares

1. Aislar los núcleos hipotalámicos SCN, ARC y VMH de las muestras provenientes de ratones control, obesos y obesos tratados con NAD⁺ a ZT11 (HFN11) o a ZT23 (HFN23) y extraer su RNA.
2. Analizar la expresión de los genes del reloj circadiano y genes controlados por el reloj (CGS) en el SCN.
3. Determinar el impacto del suministro de NAD⁺ sobre la conducta circadiana.

7. METODOLOGÍA

7.1 Diagrama experimental



7.2 Cortes Histológicos en Criostato

Se trabajó con los tejidos de las cohortes de ratones descritos en Escalante-Covarrubias et al, 2023. Escalante Covarrubias, utilizó un grupo de 60 ratones de la cepa C57BL/6J4. A las 8 semanas de edad se formaron tres grupos: un grupo control (CD), alimentado ad libitum con la dieta TD. 20185 Teklad global, la cual provee el 18% de las calorías a partir de grasas, el 24 % de proteínas y el 58% a partir de carbohidratos. Un segundo grupo de ratones fue alimentado con dieta rica en grasas (HFD) fue alimentado con la dieta rica en grasas TD. 160547 Teklad Custom Diet, la cual provee el 53% de las calorías a partir de grasas, el 15% de proteínas, y el 38% de carbohidratos. La ruta de la quinurenina convierte el triptófano en NAD+, por lo mismo, ambas dietas fueron modificadas para igualar su contenido en triptófano. Por último, dos grupos más HFN11 y HFN23, los cuales además de tener la dieta rica en grasas también se les suministró una inyección

peritoneal peritoneal (IP) con 50 mg/Kg de NAD⁺ en ZT11 y ZT23, respectivamente, durante exactamente 22 días.

Los cerebros fueron congelados (-80°C) inmediatamente después de que los ratones fueron sacrificados. Para fijar el cerebro al porta muestras se cortó el cerebelo con una navaja lo cual generó una superficie plana que facilitó la fijación utilizando Tissue-Tek (Sakura_4583). Para realizar la extracción de los núcleos hipotalámicos, los cerebros fueron cortados en secciones coronales de 30- μ M y 100- μ M de forma alternativa utilizando un criostato. La temperatura del equipo se mantuvo entre -19 °C y -22 °C. Los cortes se montaron en laminillas previamente tratadas con gelatina (**Apéndice A**). Los cortes más delgados, de 30- μ M, fueron utilizados como plantillas, tras la tinción de Nissl por el método de cresilo de Vogt (ver siguiente apartado), para identificar los núcleos SCN y ARC en los cortes gruesos. Por otra parte, los cortes de 100- μ M se almacenaron a -80°C hasta su uso.

7.3 Estudio histológico con la tinción de Nissl.

La tinción se realizó a los cortes de 30 μ M anteriormente descritos y fueron utilizados para el estudio histológico mediante la tinción de Nissl. Las laminillas fueron colocadas en gradillas de plástico. Seguidamente, fueron transferidas por varias etapas de tinción. Primero se deshidrataron en alcohol x1 (70%) 2 min, x2 (95%) 2 min, x2 (100%) y se aclararon con xileno x2 (5 minutos). Esto fue seguido de una segunda etapa de rehidratación en alcohol x2 (100%) 2 min, x2 (95%) 2 min, x1 (70%) 2 min, x1 (50%) 2 min) y se lavaron rápidamente (30 segundos) en agua desionizada. La etapa de tinción se realizó en una solución de trabajo de violeta de cresilo por 1 minuto. Rápidamente se lavó el exceso con agua desionizada en el fregadero. Por último, se realizó otra etapa de deshidratación: alcohol x1 (50%) x2 min, x1 (70%) 2 min, x2 (95%) 2 min, x2 (100%) y se aclararon con xileno x2 (5 minutos). Finalmente se realizó el montaje con Permount.

7.4 Disección de núcleos hipotalámicos

Los núcleos hipotalámicos son conjuntos compactos de neuronas en el hipotálamo, que cumplen diversas funciones vitales relacionadas con el sistema endocrino, regulación

autónoma y procesos esenciales. Estos núcleos pueden ser identificados a través de la tinción de Nissl; dicha tinción resalta las zonas ricas en ribosomas y retículo endoplasmático rugoso, presentes en las neuronas. En las preparaciones teñidas, estas zonas aparecen más oscuras, lo que indica la presencia y localización de los núcleos. En la **Figura 8**, es posible apreciar la posición del SCN en relación con otras regiones cerebrales del ratón.

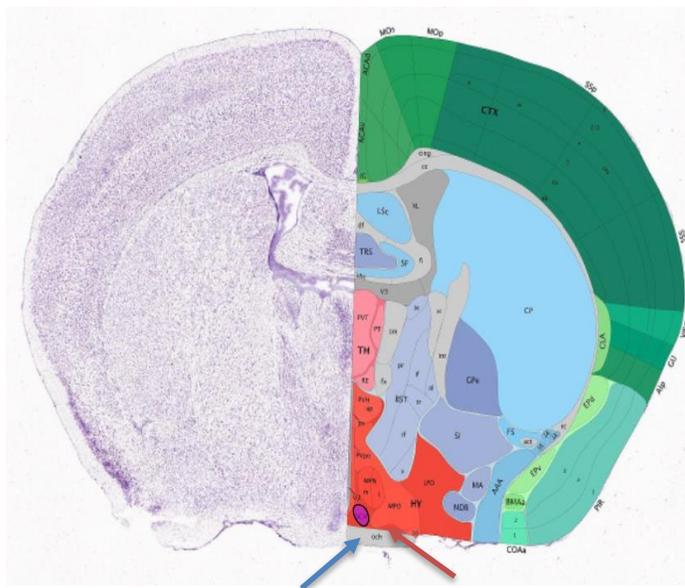


Figura 8. Tinción de Nissl donde se observa el SCN. El núcleo supraquiasmático (SCN), resaltado en color resaltado en color lila (señalado con una flecha roja), se ubica por encima del quiasma óptico en color gris (señalado con una flecha azul) al realizar cortes coronales desde la parte anterior a la posterior del cerebro. La tinción de Nissl permite visualizar el SCN como una región más oscura. La longitud perpendicular del SCN en un corte coronal es de 390 micrómetros. Imágenes obtenidas de Allen Mouse Brain Atlas y Allen reference Atlas.

El núcleo ARC se encuentra alrededor de la misma región que el núcleo VMH en cortes coronales, el primero en la parte inferior, el segundo, regularmente, se ubica un poco más arriba casi de manera adyacente al ARC.

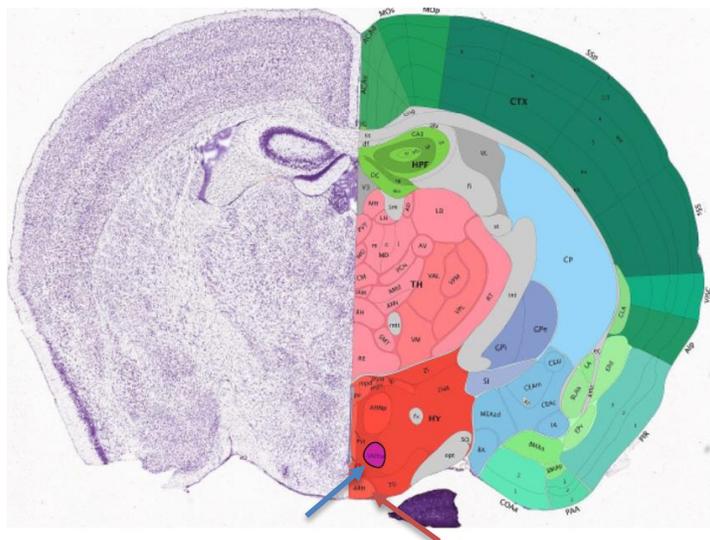


Figura 9. Tinción de Nissl donde se observan a los núcleos ARC y VMH. Se observa la ubicación del núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH), resaltado en color lila (señalado con flecha azul), y el área hipotalámica del núcleo arqueado (ARC) que se encuentra en la parte inferior, por debajo del VMH (señalado con flecha roja). Una vez que se identifican estos núcleos, se encuentran presentes en un grosor de 650 micrómetros. Imágenes obtenidas de Allen Mouse Brain Atlas y Allen reference Atlas.

Utilizando el atlas y las laminillas con cortes de 30 μm , se tomaron fotografías en el microscopio. Estas sirvieron como guías para realizar las disecciones de los cortes de 100 μm utilizando puntas de agujas estándares de 10 mL de calibre 21. Las agujas de calibre 21 tienen un diámetro externo de aproximadamente 0.82 mm y un diámetro interno de 0.51 mm. Las disecciones se llevaron a cabo en el microscopio estereoscópico Kruss. Durante el procedimiento, las muestras se mantuvieron congeladas con la ayuda de hielo seco colocado al lado de la laminilla en el microscopio. Las disecciones de los núcleos se depositaron en tubos de 0.5 mL con 0.1 mL de Trizol (TRIzol™ Reagent, Invitrogen, cat. No. 15596018). Posteriormente, las muestras se almacenaron a -80°C ."

7.5 Extracción de RNA a partir de los tejidos de los núcleos hipotalámicos

Las muestras en Trizol se descongelaron a temperatura ambiente. Se utilizó una jeringa para lisar la muestra y se recuperó todo el volumen utilizando una micropipeta. Se añadieron 20 μ L de cloroformo a cada tubo. Las muestras se agitaron por 15 segundos volteando los tubos sostenidos entre dos gradillas. Estas se incubaron a temperatura ambiente por 3 minutos. Transcurrido este tiempo, la muestra fue centrifugada durante 15 minutos a 12000 g a 4°C. Una vez finalizado el tiempo de centrifugación, la muestra se separó en tres fases: una fase inferior color rosa, una interfase blanca y una fase superior incolora que constituye aproximadamente el 50% del volumen total; la cual fue extraída por medio de una micropipeta inclinando el tubo. Se agregaron 50 μ L de propanol y 1 μ L de glucógeno y las muestras se incubaron por 10 minutos para después centrifugar durante 10 minutos a 12000 g a 4°C. El sobrenadante fue desechado con una pipeta teniendo extremo cuidado de no retirar el pellet. Se colocaron 100 μ L de EtOH al 75% y se procedió a centrifugar por 10 minutos a 7,500 g a 4°C. El lavado con etanol se hizo dos veces. Se resuspendió el pellet en 12 μ L de agua grado biología molecular (Corning® 46-000). Finalmente, 1 μ L de la muestra fue utilizada para cuantificar su concentración en el NanoDrop (Thermo Scientific). Los tubos fueron almacenados a -80°C.

7.6 Síntesis de cDNA

Se utilizó el kit de síntesis de cDNA IScript™ (Bio-Rad, cat. No.1708890). Se mezclaron 150 ng de RNA de núcleos hipotalámicos con 2 μ l de 5x IScript Reaction Mix con 0.5 μ l la enzima IScript Reverse Transcriptase y se agregó agua grado biología molecular hasta un volumen de 10 μ l. El termociclador (Axygen MaxyGene™ II) realizó una alineación durante 5 minutos a 25°C, una transcripción inversa durante 40 minutos a 46°C y por último una fase de inactivación de 1 minuto a 95°C. Las reacciones se enfriaron y se almacenaron a -20°C.

7.7 Cuantificación de transcritos por qPCR.

Las reacciones se realizaron en un volumen final de 10 μ l. Se añadieron 5 μ l del reactivo Maxima SYBR Green (Thermofisher, cat. #K0221). Se agregaron 1 μ l (500 μ L) de primer

forward y 1µl (500µL) (Tabla S1) reverse con aproximadamente 6.25ng de cDNA por reacción. El termociclador (Bio-Rad, CFX96 Touch Real-Time PCR Detection Sistema) se configuró así: 10 minutos a 95°C seguido de 50 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos a 72°C. Los valores se normalizaron con respecto a beta actina.

7.8 Estudios de comportamiento circadiana

Esta sección del proyecto fue lleva a cabo en colaboración con el alumno de maestría Roman Sitten Olea. Si bien, los datos crudos fueron compartidos, todo el análisis de comportamiento para determinar los posibles cambios inducidos por el tratamiento de NAD⁺ fueron hechos por separado e inclusive analizados con distintas herramientas bioinformáticas.

La metodología del análisis por separado de los datos permitió a ambos aplicar distintas técnicas y enfoques en la evaluación de los datos de comportamiento circadiano. La realización del análisis de manera independiente enriqueció la interpretación de los resultados.

7.8.1 Ratones y dietas

Además de investigar la reorganización de la maquinaria molecular del reloj circadiano en el SCN, también se estudiaron los posibles cambios en el comportamiento de los individuos como consecuencia del tratamiento con NAD⁺. Se utilizó una cohorte de 22 ratones de 5 semanas de edad de la cepa C57BL/6J alojados en la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM en un ambiente con temperatura controlada a 24°C y humedad del 44% con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas, con la excepción de la semana 5 en adelante, en la que se les mantuvo en oscuridad completa.

Durante todo el tiempo experimental, los ratones fueron alimentados *ad libitum* con una dieta alta en grasas (**Apéndice C**). Cabe destacar que para este experimento se utilizaron únicamente ratones obesos. Las calorías de esta dieta están organizadas de

la siguiente manera: 15% proveniente de proteína, 38% de carbohidratos, y 53% proveniente de grasas. El alto contenido en grasas de esta dieta conduce a un aumento excesivo de peso en los animales. Se determinó la ingesta de alimentos por semana midiendo el cambio en el peso la comida los lunes a las 10:30 a.m. El peso de los ratones se determinó también una vez por semana los lunes a las 11:00 a.m.

7.8.2 Tratamiento con NAD⁺

Durante las primeras cinco semanas del experimento, se mantuvo a los ratones bajo condiciones LD (12 horas con luz y 12 horas con oscuridad). En la cuarta semana experimental, se administró al grupo HFN11 una inyección peritoneal de NAD⁺ (50 mg/kg) al ZT11, mientras que al grupo HFN23 se le suministró la misma inyección al ZT23 esto durante 4 semanas. A partir de la quinta semana, las condiciones cambiaron a DD (oscuridad completa) hasta el final del experimento. Durante este período de oscuridad completa, los animales estuvieron en total oscuridad, excepto durante los momentos de inyección, donde se utilizó una luz roja tenue para administrar las inyecciones. Debido a la ausencia de señales de luz externa durante este periodo, es más apropiado referirse a los tiempos en términos de Tiempo Circadiano (CT) en lugar de *Zeitgeber Time* (ZT). Se incluyeron controles que recibieron inyecciones de solución salina ya sea al CT11 o al CT23. La **Figura 10** muestra el diagrama experimental utilizado.

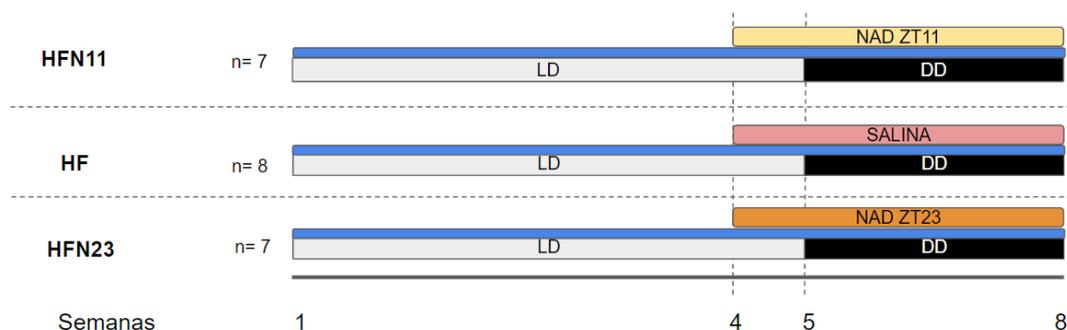


Figura 10. Diagrama para experimento de comportamiento de ratones con tratamiento de NAD⁺ al CT11 y CT23 en condiciones LD y DD. En la cuarta semana experimental, se comenzó la administración de una inyección peritoneal de

NAD⁺ (50 mg/kg) a dos grupos de ratones: HFN11 (al CT11) y HFN23 (al CT23). Se incluyeron controles que recibieron inyecciones al CT11 y controles para CT23.

7.8.3 Determinación de perfiles de actividad motriz y conducta alimentaria

En este estudio se determinaron los perfiles de actividad motriz de los ratones. Se utilizó un sistema de registro modelo OA-Spad10-12 que consiste en un gabinete equipado con 12 cajas con 3 sensores de infrarrojos cada una. Los sensores por infrarrojo emiten un rayo de luz que agrupa en conjuntos de 6 minutos el número de instantes que el ratón pasa por debajo del láser. Los datos fueron recabados con el programa OASPAD20 y fueron analizados con RhythmicAlly (Abhilash & Sheeba, 2019). RhythmicAlly es un programa de código abierto que utiliza R y permite el análisis de datos de naturaleza circadiana. RhythmicAlly tiene integrado métodos estadísticos tales como el método de Chi-square el cual determina la significancia de la periodicidad al presentarle una serie de datos temporales. Además, se utilizó COSINOR, un programa que está basado en la utilización de funciones trigonométricas que se ajusta a las variaciones observadas en una serie temporal biológica (Cornelissen, 2014)

7.8.4 Análisis de poder

El diseño experimental y el tamaño muestral se basaron en estudios previos y en análisis de poder. Según Gómez, L. (2020), en una situación ideal, el análisis de poder para el experimento realizado sugiere que se requieren 58 individuos por punto de medición, lo que resulta en un total de 880 individuos para obtener resultados estadísticamente significativos. Sin embargo, es esencial mencionar que, independientemente de lo que indica este análisis de poder, los protocolos éticos aprobados para este proyecto no permiten un aumento en el tamaño muestral. Esta decisión se basa en el principio de las 3R (Reemplazo, Reducción y Refinamiento) para garantizar la ética en la investigación con modelos biológicos.

El número final de muestras para este experimento fue determinado y aprobado por el comité de ética de la unidad de modelos biológicos del Instituto de Investigaciones

Biomédicas. Esta evaluación garantiza que el estudio se llevó a cabo siguiendo las directrices éticas y considerando el bienestar y la minimización del sufrimiento de los individuos involucrados en la investigación.

8. RESULTADOS

8.1 La tinción de cortes de 30 μ M de grosor permite la identificación de núcleos hipotalámicos.

Utilizando el método Nissl, se logró una tinción exitosa de los cortes coronales de 30 μ M, revelando la localización de los tres núcleos de interés. La identificación del núcleo supraquiasmático (SCN) puede ser relativamente directa (**Figura 8**), utilizando los ventrículos laterales como referencia. Sin embargo, la obtención de cortes coronales perfectos no es constante, por lo que las referencias superiores pueden no ser totalmente fiables, aunque ofrecen una aproximación.

La identificación de los núcleos VMH y ARC fue más desafiante en comparación con el SCN. Ambos núcleos se localizan en la misma región en cortes coronales, con el ARC situado por debajo del VMH (**Figura 9**). Típicamente, el ARC y VMH se visualizan en aproximadamente tres cortes delgados y tres cortes gruesos después del último corte donde se detectó el SCN. Ambos núcleos son visibles en cerca de cinco cortes de cada tipo. No obstante, en ciertas ocasiones, se encontró que un núcleo puede manifestarse solo en un hemisferio.

Posterior a la identificación de los núcleos, se procedió a la disección bajo microscopio. Se tomaron imágenes de referencia previamente para guiar la disección de regiones y cortes específicos. Durante todo el proceso, las muestras se mantuvieron congeladas y los fragmentos obtenidos se almacenaron en tubos con Trizol.

8.2 Estandarización del protocolo para qPCR.

Para estandarizar el protocolo se empleó un cerebro de ratón de prueba para el análisis. Se extrajo el RNA de los núcleos SCN, ARC y VMH por separado. Se utilizaron dos concentraciones diferentes de cDNA: 1.25ng/ μ l (muestras nombradas como 50 ng) y

3.75ng/μl (muestras nombradas como 150 ng). Se realizó un análisis por duplicado del gen de actina en los tres núcleos. Se observó que la concentración de 3.75ng/μl proporcionó una mejor resolución en los resultados de qPCR (**Figura S1**). Por ejemplo, en el caso del SCN, hubo una diferencia de aproximadamente 6 ciclos entre ambas concentraciones. Se observaron diferencias significativas en las muestras con distintas concentraciones para SCN y ARC. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en las diferentes concentraciones utilizadas en el VMH. Es posible que la falta de diferencias significativas en el VMH se deba a un error técnico, ya que estas muestras presentaban una concentración más abundante de RNA comparado con los otros núcleos, lo que dificultó el pipeteo preciso de cantidades pequeñas.

8.3 La expresión de los genes *Six6* y *Vip* es mayor en el SCN en comparación a los núcleos ARC y VMH.

Con el objetivo de comprobar la fidelidad de las muestras utilizadas, se llevó a cabo un experimento. Se sabe que *Vip* y *Six6* son genes que abundan en una proporción mayor en el SCN del cerebro (Hamnett et al., 2019). Se determinó el uso de *B2m* como gen de referencia debido a que mostró patrones de expresión consistentes en varias pruebas en comparación con beta actina, mediante RT-qPCR para evaluar la expresión de *Vip* y *Six6* en el SCN en comparación con los núcleos ARC y VMH. Con el fin de minimizar posibles variaciones atribuibles a ritmos circadianos o a la dieta, se tomaron muestras de cinco cerebros de ratones alimentados con una dieta normal, los cuales fueron sacrificados específicamente al ZT12.

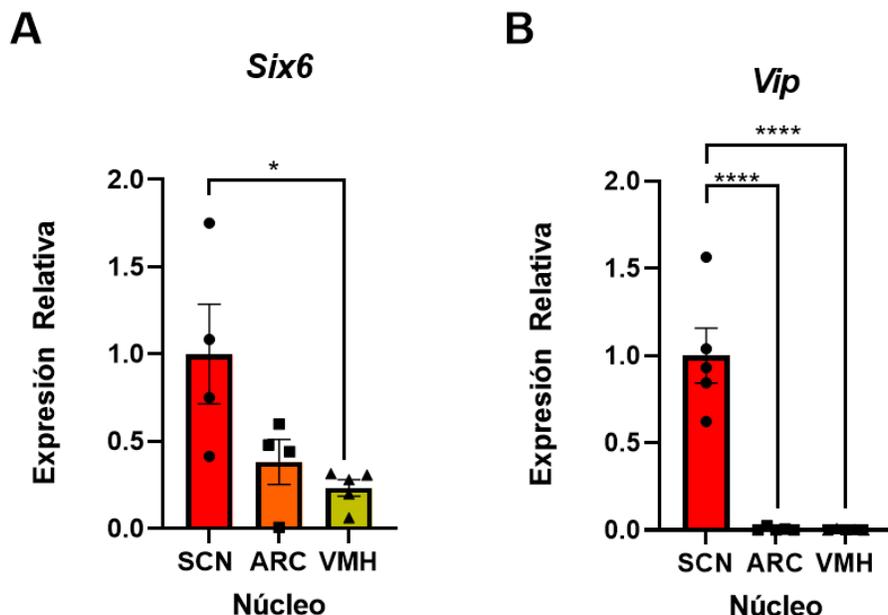


Figura 11. Expresión de los genes *Vip* y *Six6* en el SCN, el ARC y el VMH del hipotálamo en ratones bajo dieta normal (n=5). La expresión relativa de los genes de *Vip* y *Six6* se midió mediante PCR en tiempo real en muestras de cerebros de ratones sacrificados al ZT12. Los datos fueron sometidos a análisis estadístico mediante ANOVA de una sola vía. Las muestras del SCN exhibieron una expresión significativamente mayor de *Vip* en comparación con las muestras de ARC y VMH (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

La expresión de *Vip* fue significativamente mayor en las muestras del SCN en comparación con ARC y VMH (**Figura 11**). Este resultado sugiere que el método para la disección de tejido hipotalámico logró efectivamente aislar el SCN. Por otro lado, la expresión de *Six6* en el SCN fue significativamente mayor en comparación con VMH, pero no hubo diferencias significativas en comparación con el ARC.

8.4 La expresión de los genes *Pomc* y *Agrp* es mayor en el ARC en comparación a los núcleos SCN y VMH.

Además, se analizaron los genes de *Pomc* y *Agrp*, que están involucrados en la regulación del apetito y que se expresan en el ARC (Huisman et al.; Rapps et al., 2023). Para este experimento, se utilizó el mismo protocolo que en el experimento anterior, utilizando a *B2m* como gen de referencia (*housekeeping*). Mediante RTqPCR se evaluó

la expresión de *Pomc* y *Agrp* en el SCN, el ARC y el VMH del hipotálamo de cinco ratones que consumieron una dieta normal y fueron sacrificados al ZT12.

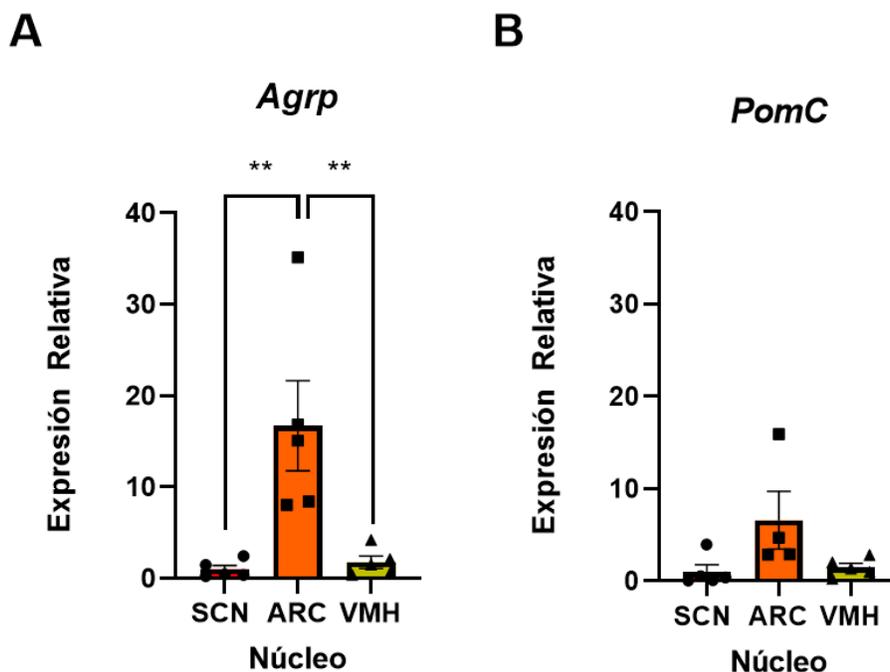


Figura 12. Expresión de los genes *Agrp* y *Six6* en el SCN, el ARC y el VMH del hipotálamo en ratones bajo dieta normal (n=5). La expresión relativa de los genes de *Agrp* y *Pomc* se midió mediante PCR en tiempo real en muestras de cerebros de ratones sacrificados al ZT12. Los datos fueron sometidos a análisis estadístico mediante una ANOVA de una sola vía. Las muestras del ARC exhibieron una expresión significativamente mayor de *Agrp* en comparación con las muestras de SCN y VMH (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

Los resultados mostraron que la expresión de *Agrp* fue significativamente mayor en el ARC en comparación con el SCN y el VMH (**Figura 12A**). Estos resultados sugieren que el método utilizado logra diseccionar al ARC. Sin embargo, la expresión de *PomC* no mostró diferencias significativas en su expresión.

8.5 La expresión de los genes *Sf1* es mayor en el VMH en comparación a los núcleos SCN y ARC.

Para evaluar la expresión del factor de transcripción de SF1 se realizó un tercer experimento utilizando el mismo protocolo que en los experimentos anteriores con B2m

como gen de referencia en cinco cerebros de ratones que consumieron una dieta normal y fueron sacrificados al ZT12. *Sf1*, como se ha descrito anteriormente, es un factor de transcripción específico del VMH (Kinyua et al., 2016). Se observó que la expresión de *Sf1* en el VMH fue significativamente mayor en comparación con el SCN y el ARC (**Figura 13**). Esto sugiere que el método de disección logra diseccionar efectivamente al núcleo VMH.

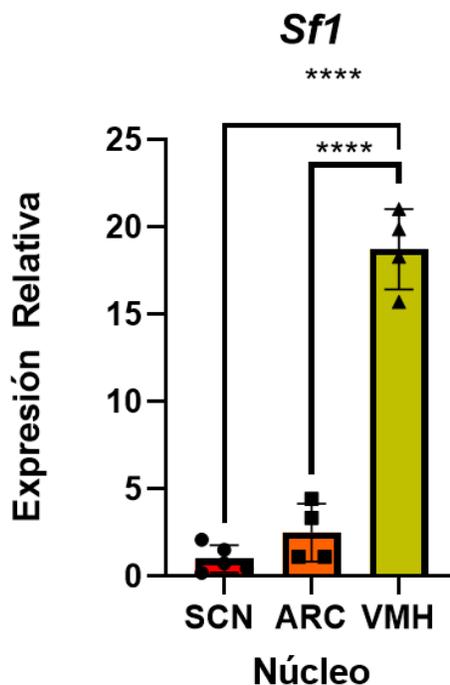


Figura 13. Expresión del gen de *Sf1* en el SCN, el ARC y el VMH del hipotálamo en ratones bajo dieta normal (n=5). La expresión relativa de los genes de *Sf1* se midió mediante RT-qPCR en muestras de cerebros de ratones sacrificados al ZT12. Los datos fueron sometidos a análisis estadístico mediante ANOVA de una sola vía. Las muestras del VMH exhibieron una expresión significativamente mayor de *Agrp* en comparación con las muestras de SCN y VMH (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

8.6 El tratamiento de NAD⁺ determina la fase en la que se transcriben los genes principales del reloj circadiano.

En el laboratorio Aguilar-Arnal, al comparar ratones con dieta normocalórica e inyección salina (CD), ratones con dieta alta en grasas e inyección salina (HF), y ratones obesos con inyección de NAD⁺ al ZT11 (HFN11), se encontró que los ratones obesos tratados

con NAD⁺ al ZT23 (HFN23) tenían cambios significativos en la fase de expresión de los genes del reloj en el hígado (Escalante-Covarrubias et al., 2023). Es importante destacar que el método de administración utilizado fue una inyección peritoneal, lo que permite la entrega directa de la sustancia al torrente sanguíneo y, por lo tanto, la rápida llegada de la sustancia a sistemas y órganos, incluyendo el SCN (Al Shoyaib et al., 2019). Los cambios en la fase de expresión de genes del reloj en hígado podrían estar siendo modulados por la actividad en el SCN. En este estudio, se analizaron los transcritos de la maquinaria del reloj en el SCN para determinar el efecto que tuvo el tratamiento de NAD⁺ al ZT23.

El análisis de los transcritos de la maquinaria del reloj en el SCN reveló una inversión en la fase de expresión de varios genes clave, incluyendo *Bmal1*, *Cry1*, *Per1*, *Per2* y *Nr1d1* (*Rev-erba*) debido a la disponibilidad biológica del NAD⁺ al ZT23 (**Figura 19**). Para determinar el cambio de fase se utilizó CircWave, un programa que hace un análisis de regresión armónica lineal que ajusta el perfil de onda para un período de 24 horas. Con CircWave se determinó que la transcripción génica de *Bmal1* tuvo un retraso en un promedio de 6 horas, mientras que la expresión génica para *Per1-2* tuvo un retraso de aproximadamente 11 horas. También, la fase de expresión de *Cry1* se ha retrasado en un promedio de 8 horas y la fase de expresión de *Nr1d1* tuvo un ajuste de aproximadamente 12 horas (equivalente a la mitad de un día). Los resultados sugieren que la reorganización observada en términos de transcripción, fisiología y funciones en el hígado por Escalante-Covarrubias (2023) podría ser consecuencia de la reorganización transcripcional en el SCN.

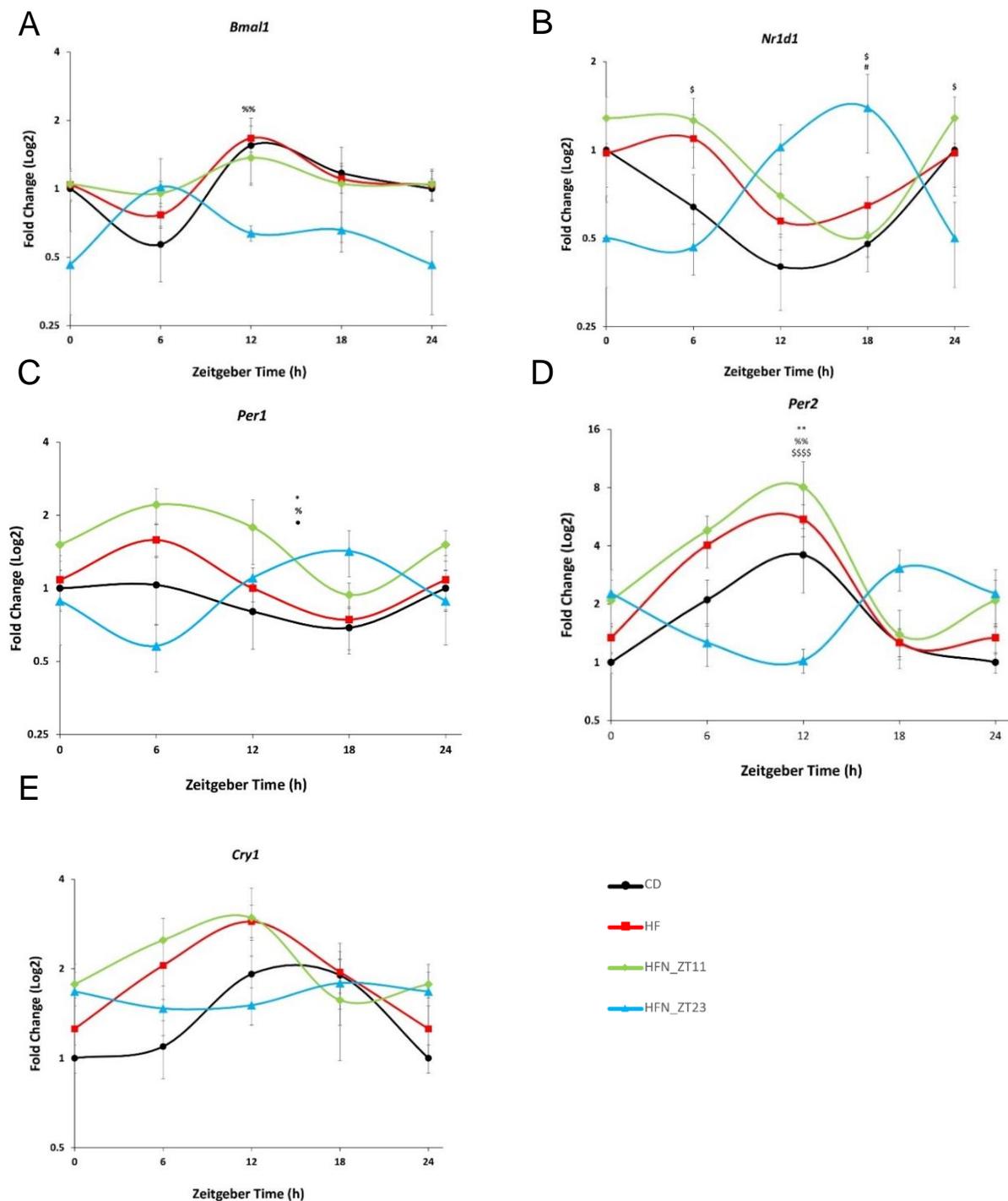


Figura 14 RT-qPCR de los genes del reloj y genes controlados por el reloj en el SCN. Se puede observar un cambio de fase en la expresión de los genes del reloj en el grupo HFN23 (NAD⁺ al ZT23) con cambios significativos en distintos puntos. El análisis estadístico se hizo por una ANOVA de dos vías con post hoc test de Turkey para comparaciones múltiples ($\alpha=0.05$), * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. *diferencia estadística entre CD y HFN11, •diferencia estadística entre HF y HFN11, # diferencia estadística entre CD y HFN23, \$ diferencia estadística entre CD vs HF, \$diferencia estadística entre HFN11 vs HFN23, %diferencia estadística entre HF y HFN23.

El corrimiento de fase causado por la biodisponibilidad de NAD⁺ posiblemente ha tenido un impacto en la fase de transcripción de los genes regulados por el reloj biológico. Por lo tanto, resulta beneficioso examinar de cerca los genes estrechamente vinculados al SCN.

8.7 El NAD⁺ cambia la fase de expresión de los genes péptido intestinal vasoactivo (Vip) y su receptor (Vipr2).

La expresión del gen de VIP y su receptor, VIPR2, en el SCN, presentan fluctuaciones durante el día y la noche. La pérdida de la señalización de VIP y VIPAC2 (codificado por el gen *Vipr2*) tiene como efecto una disminución en la ritmicidad lo que conlleva a también a una disminución en la robustez de las fluctuaciones fisiológicas (Harmar et al., 2002; Maywood et al., 2006). VIP se analizó ya que además de tener una oscilación bastante robusta, es mayoritariamente controlado por el reloj (Bedont et al., 2017).

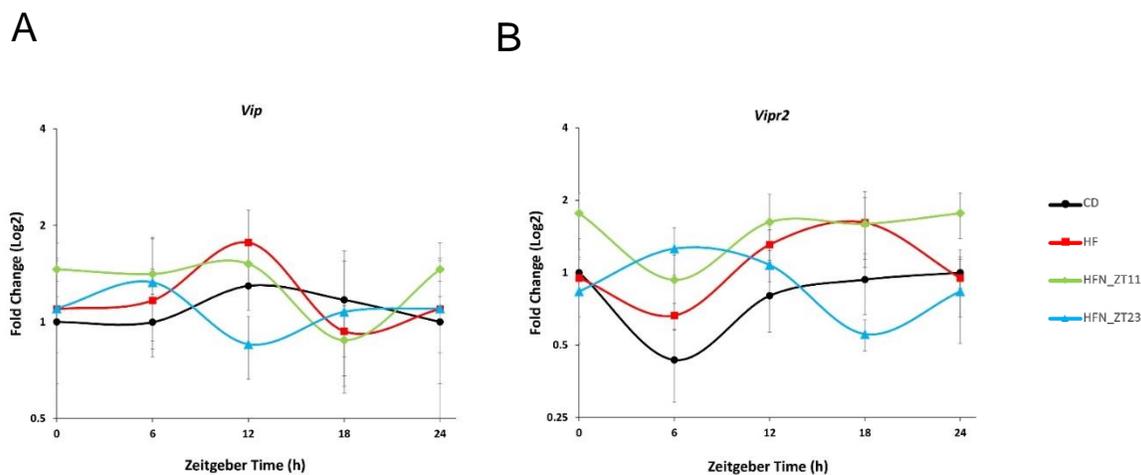


Figura 15 RT-qPCR de los genes de *Vip* y *Vipr2*. Se puede observar un cambio de fase en la expresión de los genes *Vip* y *Vipr2* en el grupo HFN23 (NAD⁺ al ZT23). No se encontraron diferencias significativas tras el análisis estadístico el cual se hizo por una ANOVA de dos vías con post hoc test de Turkey para comparaciones múltiples ($\alpha=0.05$), * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. *diferencia estadística entre CD y HFN11, ●diferencia estadística entre HF y HFN11, # diferencia estadística entre CD y HFN23, ▪ diferencia estadística entre CD vs HF, \$diferencia estadística entre HFN11 vs HFN23, %diferencia estadística entre HF y HFN23.

Se encontró que la fase de expresión de *Vipr2* y *Vip* en el grupo HFN23 tiene su acrofase 6 horas antes que la acrofase del resto de los grupos. Sin embargo, no se encontró ninguna diferencia significativa en alguno de los puntos de los distintos grupos (**Figura 15**).

8.8 El NAD⁺ promueve un cambio de fase de los genes prokineticina 2 y su receptor.

Las prokinectinas son una clase de quimiocinas con un rol importante en el sistema inmune, enfermedades inflamatorias, y con una potencial participación en la patogénesis de desórdenes neurológicos (Zhou, 2006). La prokineticina 2 (PK2) es un péptido secretorio que se expresa en el intestino delgado y en diferentes regiones del cerebro. Su transcrito de mRNA es de aproximadamente 1.6 kilobases (kb). Particularmente, se encontró la expresión de mRNA de PK2 en el SCN y en otras áreas del hipotálamo y en el caparazón del núcleo accumbens (Cheng et al., 2002).

La PK2 es una proteína importante que se encarga de la regulación de varias funciones fisiológicas tales como metabolismo, angiogénesis, neurogénesis, respuestas inmunes, reproducción e incluso la percepción del dolor. El transcrito de *Prok2* oscila de manera circadiana en el SCN, alcanzando su pico máximo durante la fase inactiva de los ratones (el día subjetivo), Particularmente para las primeras horas de exposición solar (ZT1-ZT7) (Prosser et al., 2007). Por otra parte, durante la fase oscura (ZT13-ZT22) los niveles de *Prok2* son bastante bajos, con una diferencia de magnitud de 50 veces (Cheng et al., 2002). El alto grado de robustez circadiano de este transcrito es un fuerte indicador de su rol como regulador de los ritmos circadianos en el SCN.

Al introducir una forma recombinante de *Prok2* en el cerebro de rata, se encontró una supresión en la actividad locomotora durante la fase activa. Por lo tanto, *Prok2*, se propone como un inhibidor del núcleo supraquiasmático (Prosser et al., 2007). El receptor de *Prok2* (*Prokr2*) también participa en la función circadiana. *Prokr2* es un receptor acoplado a proteínas G que se activa por medio de la proteína PROKR2. Este receptor se encuentra en varias áreas del cerebro, incluyendo el SCN y el tálamo (Prosser et al., 2007). Su expresión en estas regiones sugiere un rol importante en la regulación el sueño y la vigilia. Recientemente se encontró que la red *Prok2/Prokr2* tiene un papel clave en la codificación y la transmisión de sensaciones del tacto agradables hacia el cordón espinal (Liu et al., 2022).

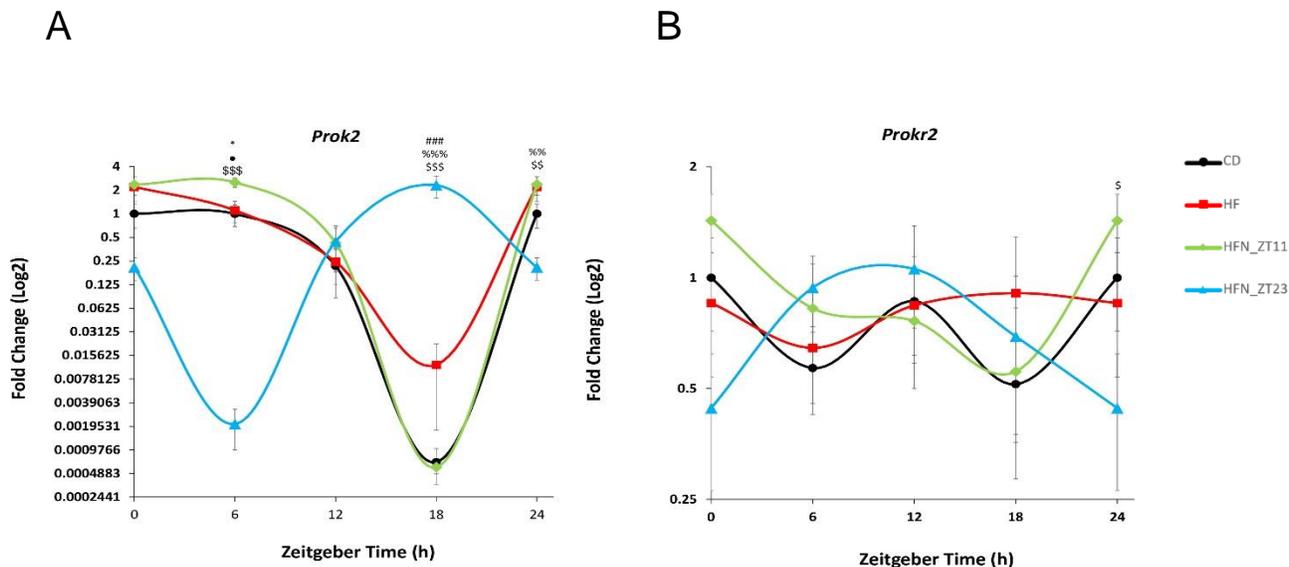


Figura 16 RT-qPCR de los genes de *Prok2* y *Prokr2*. (A) Resultados de qPCR para *Prok2*, se encontraron diferencias significativas bastante marcadas para este gen. (B) Resultados de qPCR para *Prokr2*; no se encontraron diferencias significativas para este gen. El análisis estadístico se hizo por una ANOVA de dos vías con post hoc test de Turkey para comparaciones múltiples ($\alpha=0.05$), * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. *diferencia estadística entre CD y HFN11, •diferencia estadística entre HF y HFN11, # diferencia estadística entre CD y HFN23, • diferencia estadística entre CD vs HF, \$diferencia estadística entre HFN11 vs HFN23, %diferencia estadística entre HF y HFN23.

Se encontró que la fase de expresión de *Prok2* y *Prokr2* en el grupo HFN23 tiene su acrofase 12 horas antes que la acrofase del resto de los grupos. Se encontraron diferencias significativas al ZT6 y ZT18 donde se observa un cambio bastante elevado con respecto a la expresión de *Prok2*. En el caso de *Prokr2*, se encontró un cambio significativo entre los grupos HFN11 y HFN23 lo cual indica que en este punto el tratamiento podría estar actuando de manera opuesta en los patrones de expresión de este receptor. Debido a que *Prok2* ha sido propuesto como un supresor de la actividad locomotora es posible que estos cambios de expresión se vean reflejados en los patrones de comportamiento.

8.9 El NAD⁺ promueve un cambio de fase para el gen *Rasd1*.

DEXRAS1 (también conocida como RASD1) es una pequeña proteína de la familia de las proteínas Ras. Su descubrimiento se dio gracias a que su expresión incrementa significativamente cuando hay una exposición al glucocorticoide sintético dexametasona (Kemppainen & Behrend, 1998). La dexametasona es una hormona

esteroidal sintética que posee propiedades antiinflamatorias y efectos inmunosupresión. DEXRAS1, particularmente, es la única proteína de la familia ras que puede ser inducida por dexametasona. Está involucrada en varias vías de señalización las cuales son importantes en la función neuronal, el metabolismo, la inflamación, y el cáncer (Bouchard-Cannon et al., 2018; Cha et al., 2013; Seok et al., 2020).

En el SCN, se ha demostrado que DEXRAS1 se expresa de manera rítmica, con su pico de máxima expresión cuando el efecto de la luz es mayor, al inicio de la noche subjetiva (Panda et al., 2002; H. Takahashi et al., 2003; Ueda et al., 2002). Más a detalle, DEXRAS1 es un modulador crítico de la respuesta del reloj central en señales fóticas y señales no fóticas. En los resultados se encontró que la fase de transcripción de *Rasd1* se invierte en el grupo HFN23 como consecuencia del tratamiento con NAD⁺, este resultado es particularmente evidente al ZT12.

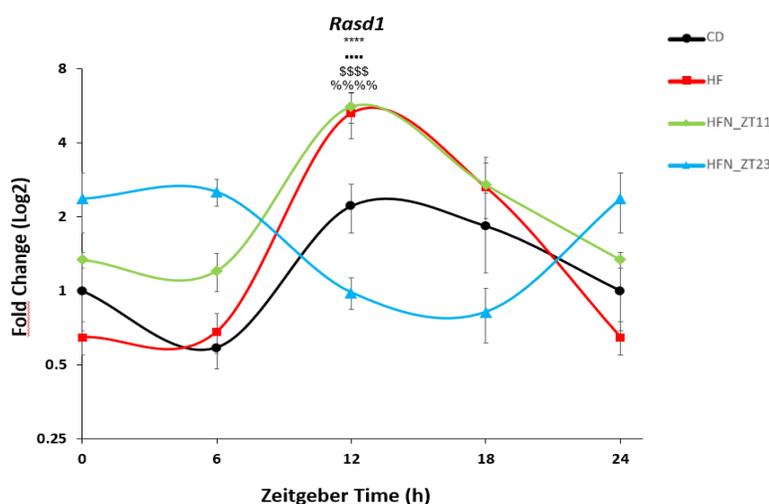


Figura 17 RT-qPCR del gen *Rasd1*. (A) El análisis estadístico se hizo por una ANOVA de dos vías con post hoc test de Turkey para comparaciones múltiples ($\alpha=0.05$), * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. #diferencia estadística entre CD y HFN11, •diferencia estadística entre HF y HFN11, \$ diferencia estadística entre CD y HFN23, % diferencia estadística entre CD vs HF, %diferencia estadística entre HF y HFN23, %%%diferencia estadística entre HF y HFN23.

En la **Figura 17** se pueden observar los cambios en la expresión de DEXRAS1. Es interesante notar que, se encontraron diferencias significativas entre la mayoría de los grupos al ZT12. Es necesario señalar que, en este caso, el efecto del tratamiento al ZT11

es comparable al efecto de la dieta alta en grasas. Los cambios en los patrones de expresión de *DEXRAS1* sugieren que el NAD^+ podría regular al SCN de tal manera que cambie su sensibilidad a la luz.

8.10 El NAD^+ no cambió de manera significativa los patrones de expresión del gen zinc finger homeobox 3.

El zinc finger homeobox 3 (ZFHX3, también conocido como ATBF1) es una proteína que actúa como factor de transcripción (Zhao et al., 2016). *Zfhx3* está implicado en diversos procesos biológicos tales como el desarrollo de las glándulas mamarias, la supresión del cáncer de próstata, diferenciación neuronal, y ritmos circadianos (Minamiya et al., 2012; Wilcox et al., 2017; Zhao et al., 2016).

Numerosos estudios han identificado una asociación sustancial entre el gen *Zfhx3* y los ritmos circadianos. Una mutación dominante sin sentido en *Zfhx3* se ha relacionado con la aceleración de los ritmos locomotores circadianos en ratones y con la alteración de la actividad transcripcional de neuropéptidos esenciales para la señalización intercelular en el núcleo supraquiasmático (SCN) (Balzani et al.; Parsons et al., 2015). Hughes demostró además que ZFHX3 se expresa en muchos tipos de células de la retina, incluidas las células ganglionares de la retina intrínsecamente fotosensibles (ipRGC), y descubrió que los mutantes *Zfhx3*^{Sci/+} tienen una menor capacidad de respuesta a la luz en la actividad locomotora y el arrastre circadiano (Hughes et al., 2021).

Además, Wilcox llevó a cabo una investigación que implicaba la eliminación inducible de *Zfhx3* en animales adultos, revelando un período acortado de funcionamiento de la rueda en oscuridad constante y un reentrenamiento inmediato a los avances de fase de 6 horas en el ciclo luz-oscuridad (Wilcox et al., 2017). Estos hallazgos colectivos sugieren firmemente que ZFHX3 desempeña un papel fundamental en el establecimiento del ritmo y la amplitud del reloj circadiano adulto, potencialmente a través de un eje impulsado por motivos AT. No se encontraron cambios significativos con respecto a los patrones de expresión de este gen (**Figura 18**)

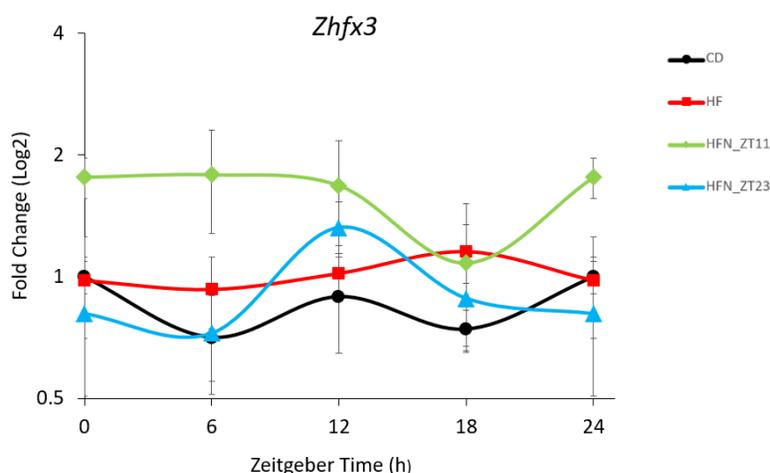


Figura 18. RT-qPCR del gen de Zhfx3. El análisis estadístico se hizo por una ANOVA de dos vías con post hoc test de Turkey para comparaciones múltiples ($\alpha=0.05$), * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. *diferencia estadística entre CD y HFN11, ●diferencia estadística entre HF y HFN11, # diferencia estadística entre CD y HFN23, ■ diferencia estadística entre CD vs HF, \$diferencia estadística entre HFN11 vs HFN23, %diferencia estadística entre HF y HFN23.

8.11 La administración del NAD⁺ protege de la ganancia de peso en condiciones de oscuridad constante

Los experimentos que se relatan a continuación en ratones vivos se realizaron en colaboración con el estudiante de maestría Román Sitten Olea, con el objetivo poder manejar el modelo experimental con mayor precisión, y atender a los animales con el debido cuidado durante las inyecciones, que debían realizarse rápidamente por el límite de tiempo asignado a cada grupo. Por estas razones, los datos crudos de estos experimentos se compartieron para ambas tesis de maestría, habiendo sido analizados de manera independiente y con herramientas distintas, y obteniendo resultados comparables, que se detallan a continuación.

El pesaje semanal de los ratones permitió determinar el efecto de los tratamientos de NAD⁺ al CT11 y CT23. Los resultados obtenidos son similares a estudios anteriores en el laboratorio en donde se ha observado una disminución del peso en animales tratados con NAD⁺.

Durante el tratamiento con NAD⁺ hubo cambios significativos en el peso corporal de los ratones que consumieron la dieta hipercalórica y recibieron el vehículo con los ratones que recibieron el NAD⁺ al CT11 y CT23 (**Figura 19B**). Además, el día 21 del tratamiento se encontró una diferencia significativa en el peso del grupo HFN23 en comparación con el tratado al CT11. Este resultado sugiere que el NAD⁺ al CT23 contrarresta la ganancia de peso debida a la dieta obesogénica en ausencia de luz; Sin embargo, la oscuridad completa podría estar afectando la manera en que actúa la cronoterapia con el NAD⁺ sobre el peso corporal. No obstante, al trabajar con una n limitada de sólo 6 animales, y considerando que los 3 grupos no tenían el mismo peso al inicio del experimento de cronoterapia, se considera que estos resultados deben ser reforzados aumentando el número de animales.

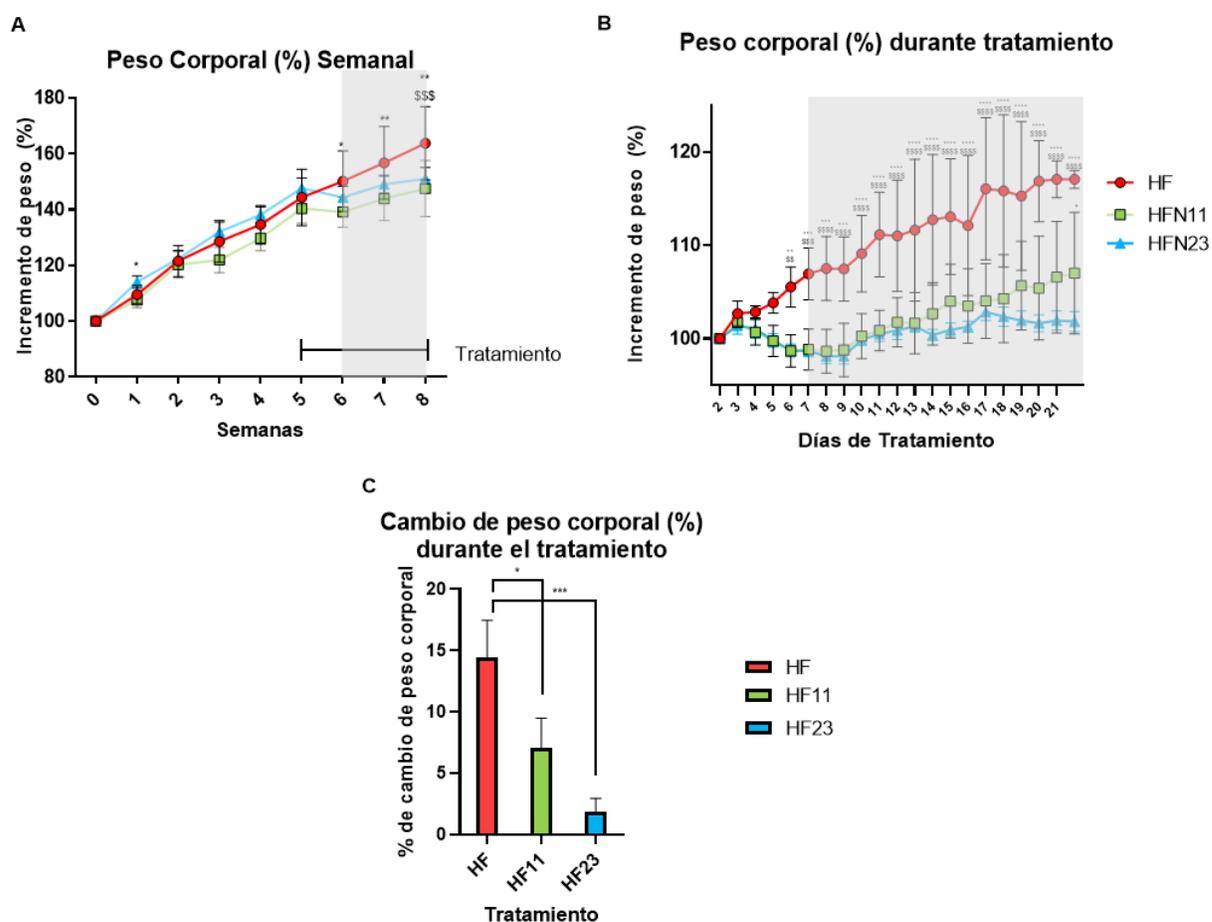


Figura 19. Efecto del tratamiento con NAD⁺ a los CT11 y CT23 en el peso corporal de ratones con dieta hipercalórica. Está figura evalúa el impacto del NAD⁺ administrado diariamente por inyección intraperitoneal

en ratones sometidos a una dieta hipercalórica. Los ratones estuvieron expuestos a un ciclo LD (12 horas de luz, 12 horas oscuridad) durante las primeras 6 semanas. A partir de la semana 6, las luces se apagaron, sumergiendo a los ratones en condiciones de oscuridad constante (con sombra gris). El tratamiento con NAD⁺ comenzó en la semana 4 y continuó hasta la semana 8. (A) Cambio de peso porcentual semanal de los ratones desde el inicio del experimento. (B) Pesaje semanal de los ratones en gramos. (C) Cambio en el peso corporal porcentual desde el inicio del tratamiento. (D) Cambio porcentual total de peso corporal durante el tratamiento. *El análisis estadístico se hizo por una ANOVA de dos vías con post hoc test de Turkey haciendo comparaciones múltiples ($\alpha=0.05$), * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. *diferencia estadística entre HF y HFN11, \$diferencia estadística entre HF y HFN23, +diferencia estadística entre HFN11 y HFN23. $n=6$ animales por grupo.*

8.12 La administración del NAD⁺ no cambia el consumo de alimentos.

En este estudio, se evaluó el efecto de la cronoterapia con NAD⁺ en la ganancia de peso y el consumo de alimentos de ratones con dieta hipercalórica bajo diferentes condiciones de luz y oscuridad. En el análisis de consumo alimenticio en relación con el peso corporal (**Figura 20A**), no se encontraron diferencias significativas entre los grupos en las tres etapas del experimento. Se observó un patrón interesante en el consumo alimenticio de los ratones HFN11, los cuales disminuyeron su consumo significativamente durante la primera semana del inicio del tratamiento y de ahí, aumentaron su consumo durante la primera semana de oscuridad completa. Al hacer comparaciones una semana antes y una semana después de comenzar la oscuridad completa (**Figura 20C**) se encontró una diferencia significativa en el consumo/peso de los ratones HFN11.

Esto sugiere un efecto de la cronoterapia con NAD⁺ en la conducta alimentaria, que no se observó en los otros grupos. Sin embargo, al comparar el consumo de alimentos tres semanas antes y tres semanas después del inicio del tratamiento, no se encontraron diferencias significativas dentro de los mismos grupos. Estos resultados sugieren que el tratamiento con NAD⁺ puede influir en la ganancia de peso de los ratones con dieta hipercalórica, pero no directamente a través del consumo de alimentos.

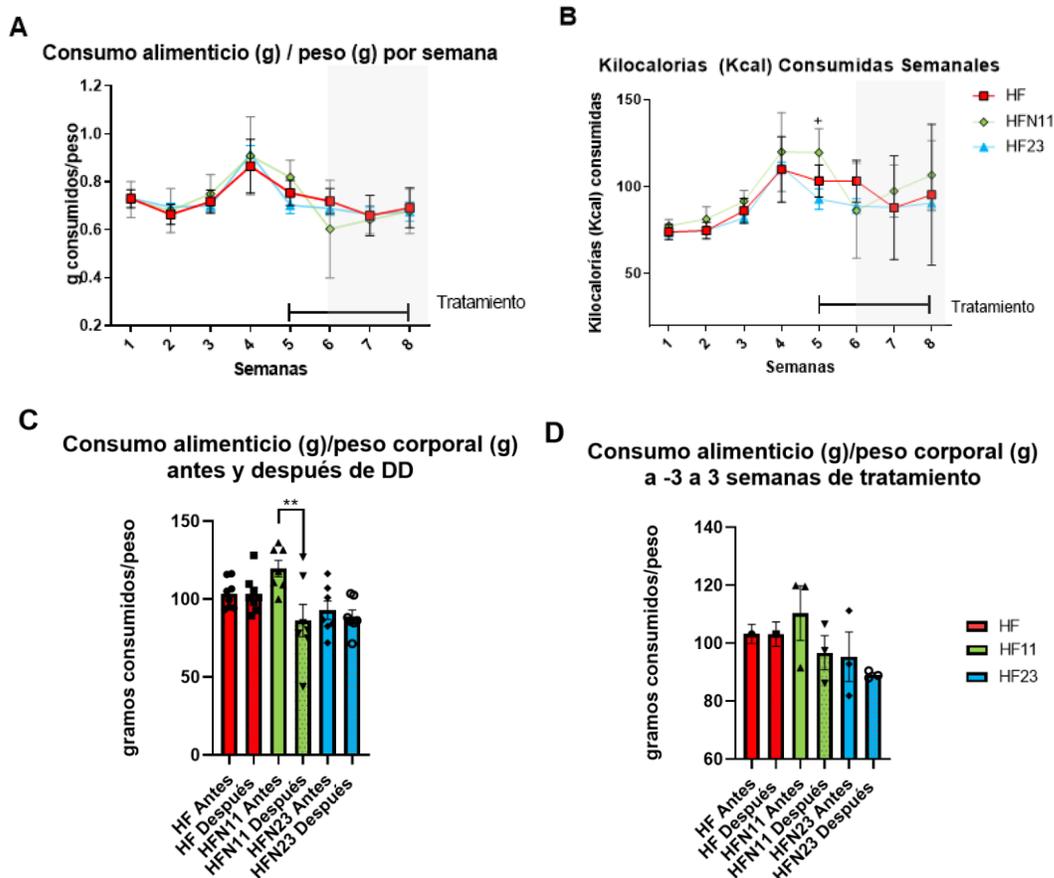


Figura 20. Efecto de la cronoterapia con NAD⁺ en la ingesta de alimento de ratones con dieta hipercalórica. Se muestra la comparación del consumo semanal de alimento entre el grupo HF, y los grupos tratados con NAD⁺ al CT11 y CT23 (HFN11 y HFN23, respectivamente). (A) Consumo de alimentos en gramos por gramo de peso corporal medido por semana. (B) Kilocalorías consumidas durante las semanas experimentales. (C) Consumo de alimento promedio una semana antes de comenzar con la etapa de oscuridad completa comparado con una semana después de hacer el cambio a oscuridad completa. (D) Consumo de alimento por gramo de peso corporal 3 semanas antes del tratamiento y 3 semanas posteriores al inicio del tratamiento. *El análisis estadístico se hizo por una ANOVA de dos vías con post hoc test de Turkey para comparaciones múltiples ($\alpha=0.05$), * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. *diferencia estadística entre HF y HFN11, \$diferencia estadística entre HF y HFN23, + diferencia estadística entre HFN11 y HFN23.*

8.13 El tratamiento con NAD⁺ al CT11 suprime la actividad inicial de los ratones tratados con NAD⁺ al CT11.

Debido a que el NAD⁺ provocó cambios en la fase de expresión de la maquinaria del reloj en el SCN se procedió a evaluar los perfiles de actividad motriz en los grupos HF, HFN11 y HFN23. No se observaron diferencias significativas en la conducta motriz. Sin embargo, se observan varios patrones interesantes en los distintos grupos. Los

actogramas del grupo HF presentan patrones de movimiento más establecidos que los patrones de los otros grupos (**Figura 21A-H**). En estos actogramas, se puede observar una actividad de tipo crepuscular, lo cual significa que los animales tienen períodos mayores de actividad durante el inicio y el final del día subjetivo.

Por otra parte, los ratones del grupo HFN11, mostraron una supresión de la actividad al comienzo de la fase activa (**Figura 22; Figura 24B**). Esto significa que experimentaron una disminución en su actividad motriz al inicio del período en el que normalmente son más activos. Esta supresión de la actividad no se vio afectada ni al inicio, ni al final de la actividad de los ratones del grupo HFN23. En la cuantificación de la actividad motriz, se observaron algunos cambios significativos en relación con la influencia del período de DD. En el grupo HF, se observaron cambios significativos en la actividad motriz durante la oscuridad completa. Particularmente, se observó que en el grupo HFN23 los ratones mostraron un aumento en la actividad durante la fase inactividad agrupando los datos de cada 30 minutos y de cada hora (**Figura 23A y 25C**).

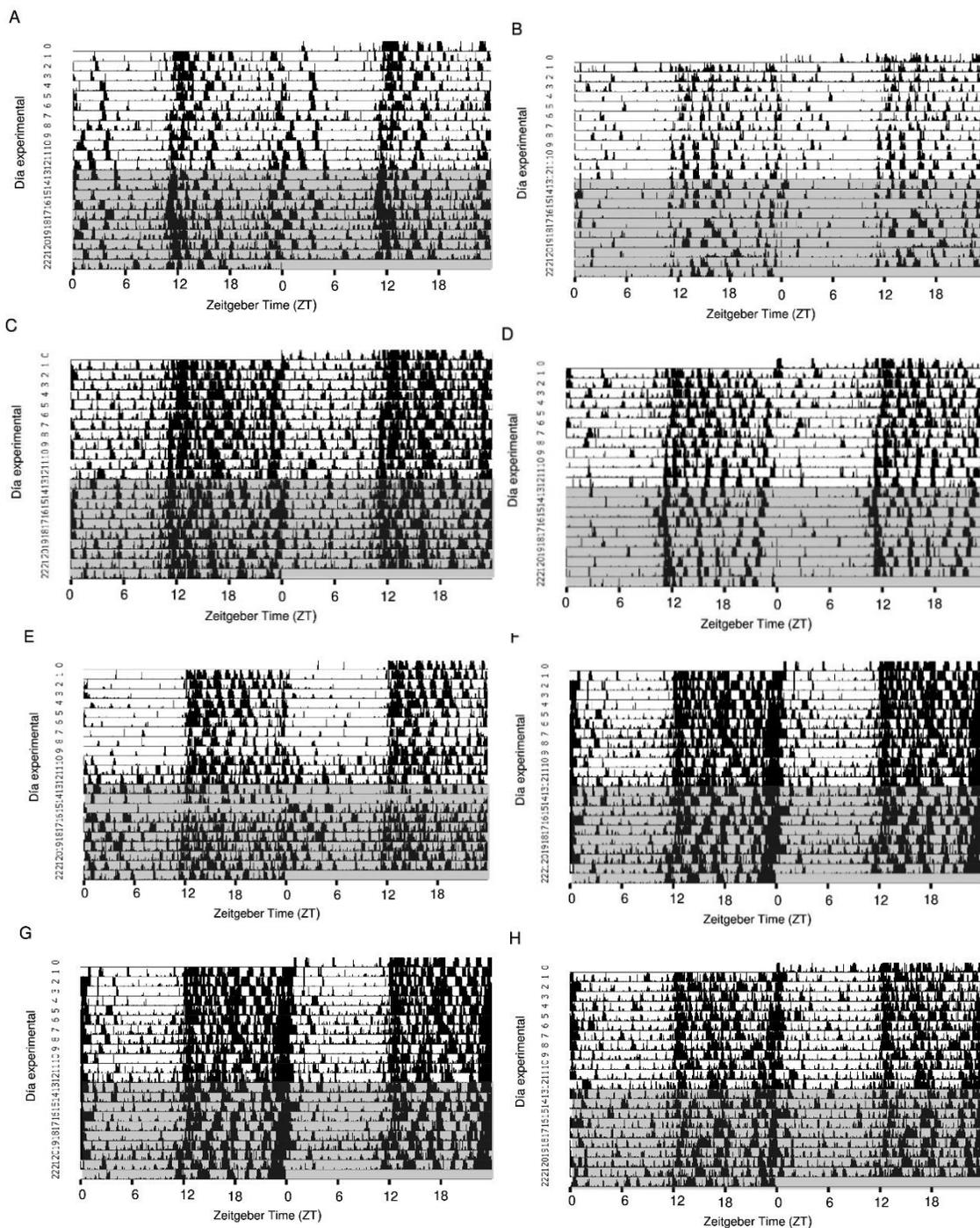


Figura 21. Actogramas de monitoreo de actividad individual a través de interrupciones de fotobeam a cada 6 minutos para el grupo de ratones HF. Estos actogramas reflejan la actividad de los ratones que consumieron una dieta rica en grasas y en lugar de recibir tratamiento con NAD⁺ recibieron una inyección salina. La sección oscura de la imagen refleja los días en los cuales los ratones estuvieron en oscuridad completa.

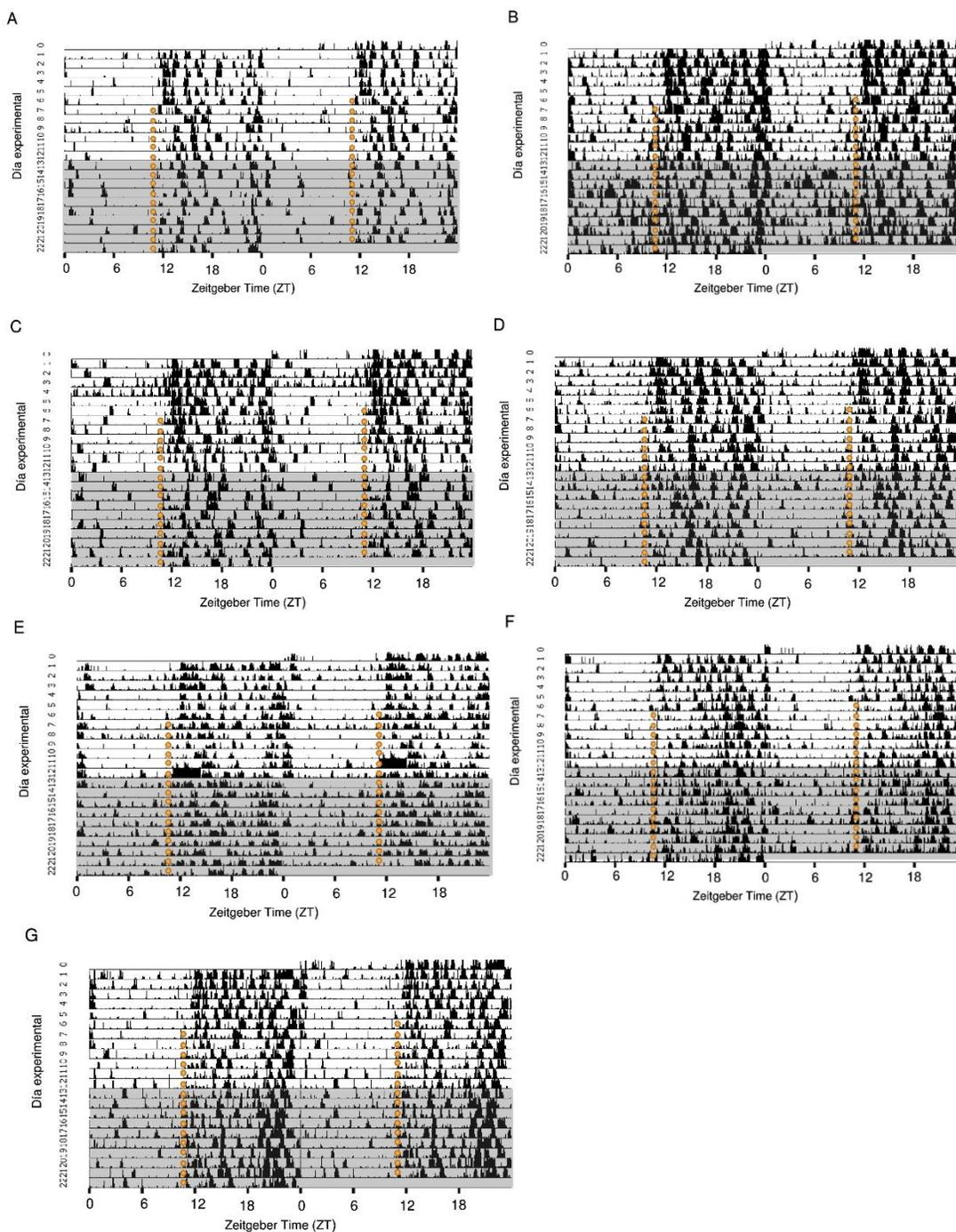


Figura 22 Actogramas de monitoreo de actividad individual a través de interrupciones de fotobeam cada 6 minutos en el grupo de ratones HFN11. Estos actogramas reflejan la actividad de los ratones que consumieron una dieta rica y recibieron tratamiento de NAD⁺ al CT11. Los puntos naranjas indican la hora de la inyección. La sección oscura de la imagen refleja los días en los cuales los ratones estuvieron en oscuridad completa

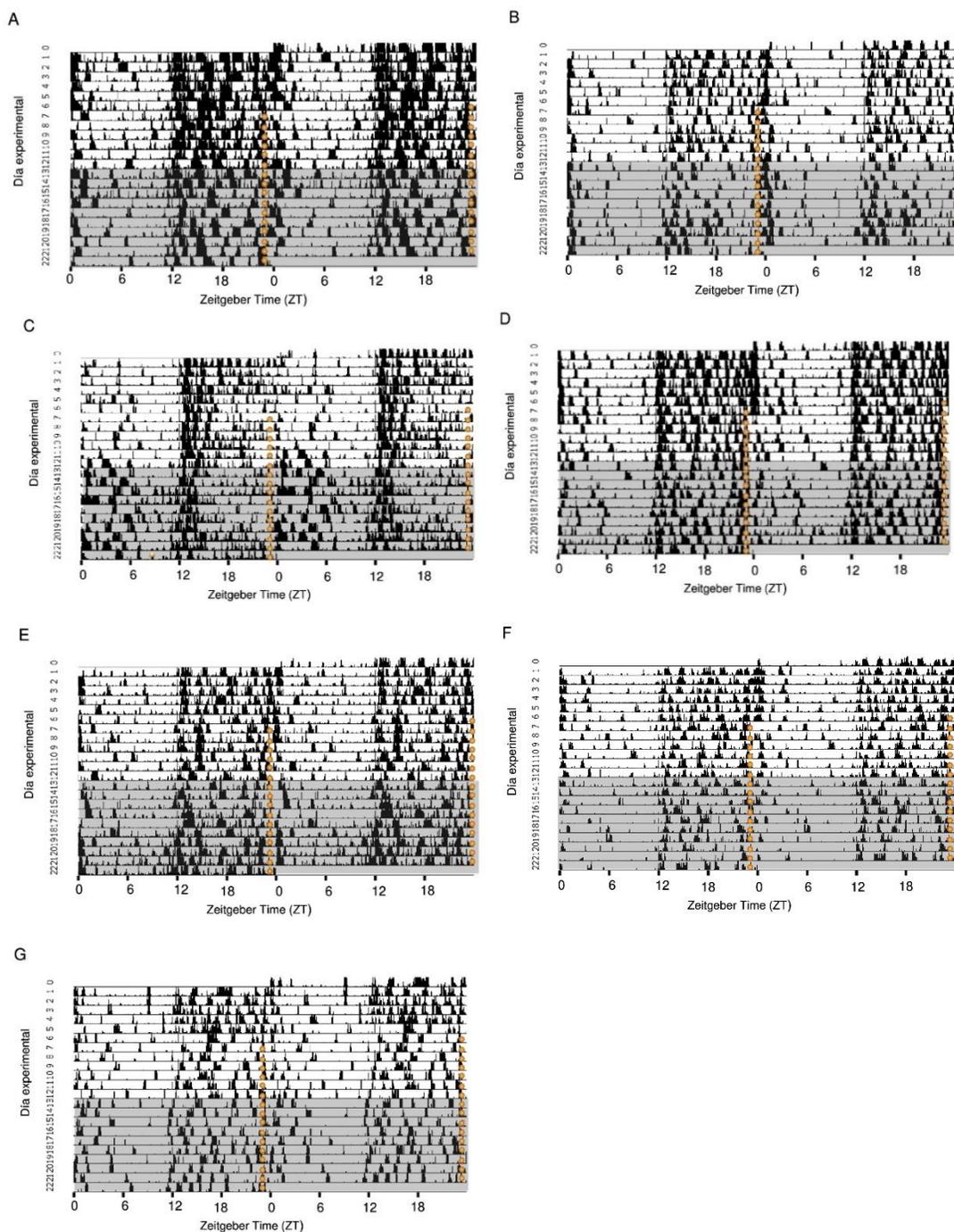


Figura 23 Actogramas de monitoreo de actividad individual a través de interrupciones de fotobeam cada 6 minutos para el grupo de ratones HFN23. Estos actogramas reflejan la actividad de los ratones que consumieron una dieta rica y recibieron tratamiento de NAD⁺ al ZT23. Los puntos naranjas indican la hora de la inyección. La sección oscura de la imagen refleja los días en los cuales los ratones estuvieron en oscuridad completa

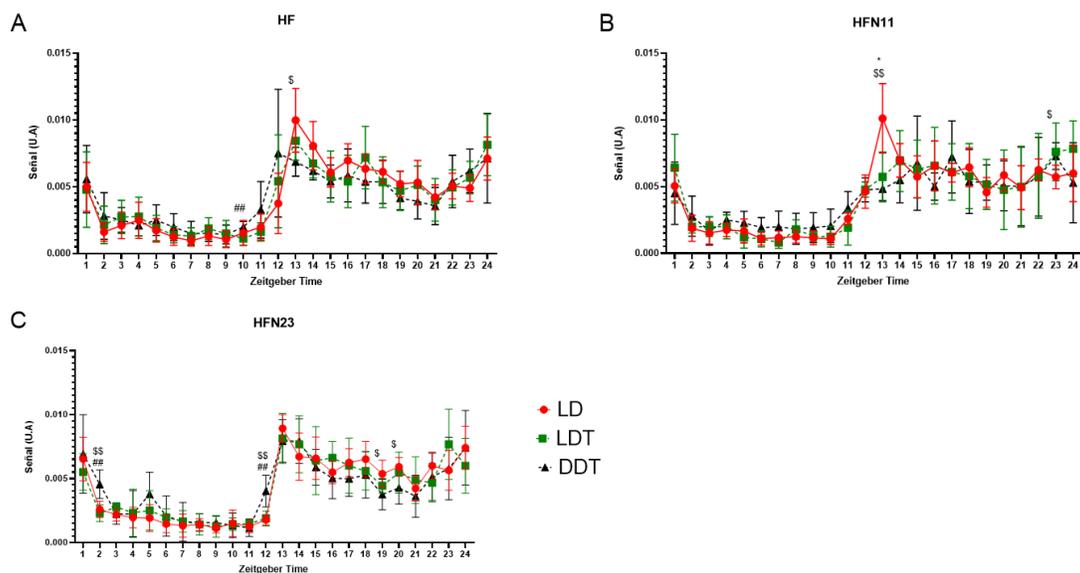


Figura 24. Cuantificación de la actividad motriz por hora de los grupos HF, HFN11, y HFN23. Esta información fue obtenida mediante el programa OASPAD20 y se analizaron utilizando RhythmicAlly. Las distintas condiciones experimentales corresponden a LD (Luz 12 horas, oscuridad 12 horas) LDT (Luz 12 horas, oscuridad 12 horas más tratamiento con NAD⁺) y DDT (Oscuridad completa más tratamiento con NAD⁺ o solución salina) La señal, representada en el eje Y, se mide en unidades arbitrarias (valores/bin). Las líneas punteadas en la gráfica señalan las variaciones de un tratamiento con inyecciones de solución salina o NAD⁺. El grupo HFN11, a diferencia de los otros grupos, tiene un inicio de actividad inhibida como resultado del tratamiento con NAD⁺. *El análisis estadístico corresponde a una ANOVA de dos vías con post hoc test de Tukey ($\alpha=0.05$), * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. *diferencia estadística entre LD y LDT, \$ Diferencia estadística entre LD y DDT, # diferencia estadística entre LDT y DDT.*

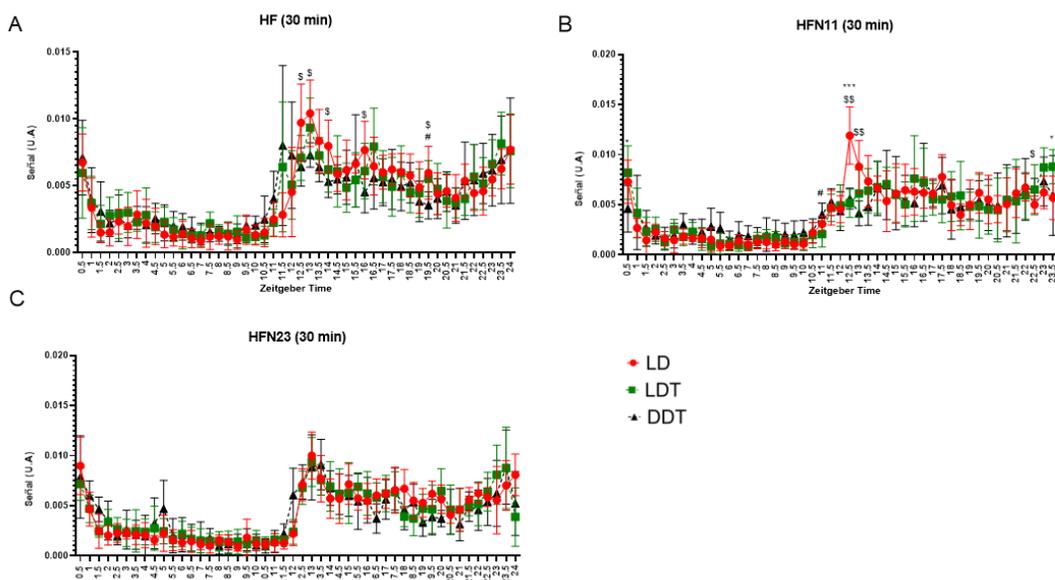


Figura 25 Cuantificación de la actividad motriz cada 30 minutos de los grupos HF, HFN11, y HFN23. Esta información fue obtenida mediante el programa OASPAD20 y se analizaron utilizando RhythmicAlly. Las distintas condiciones experimentales corresponden a LD (Luz 12 horas, oscuridad 12 horas) LDT (Luz 12 horas, oscuridad 12 horas más tratamiento con NAD⁺) y DDT (Oscuridad completa más tratamiento con NAD⁺ o solución salina). La señal, representada en el eje Y, se mide en unidades arbitrarias (valores/bin). Las líneas punteadas en la gráfica señalan las variaciones en el comportamiento de un tratamiento con inyecciones de solución salina o NAD⁺. El grupo HFN11, a diferencia de los otros grupos, tiene un inicio de actividad inhibida como resultado del tratamiento con NAD⁺. El análisis estadístico corresponde a una ANOVA de dos vías con post hoc test de Tukey ($\alpha=0.05$), * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. \$diferencia estadística entre LD y LDT, # Diferencia estadística entre LD y DDT, # diferencia estadística entre LDT y DDT.

8.14 El tratamiento con NAD⁺ resulta en un cambio significativo del período y de la amplitud del ciclo de actividad.

Se encontraron cambios significativos en el período (determinado con RhythmicAlly; sección 6.8), del ciclo de actividad los ratones como resultado del tratamiento con NAD. Esto indica que la administración de NAD⁺ tuvo un impacto en la duración del ciclo circadiano de los animales (**Figura 24A**). Sin embargo, no se encontraron cambios significativos en la potencia de la amplitud (determinada con RhythmicAlly), lo que sugiere que los resultados obtenidos en relación con los períodos tienen una confiabilidad similar. Esto significa que la precisión y la consistencia de los datos sobre los períodos se mantienen a pesar del tratamiento con NAD⁺.

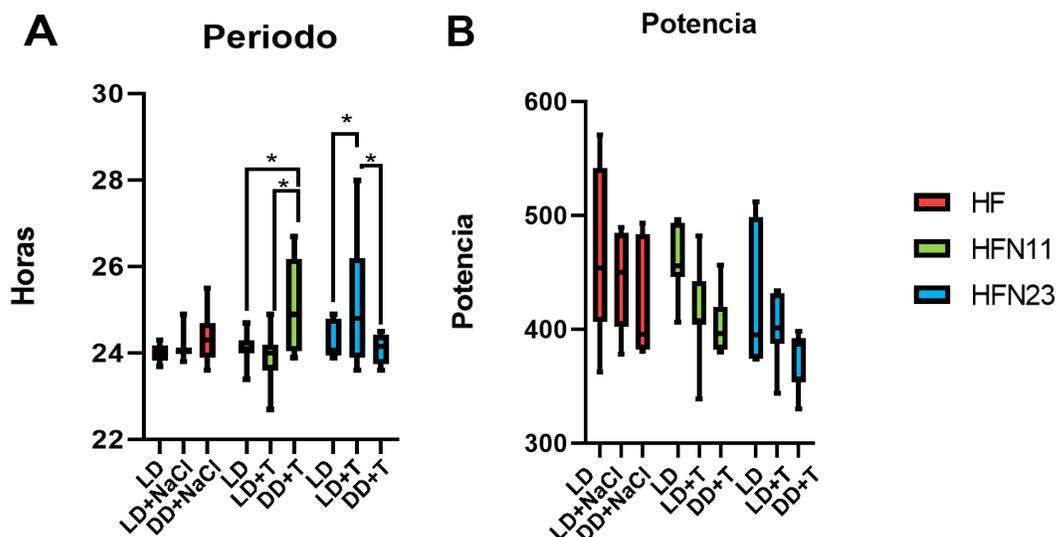


Figura 26 Análisis de los periodos a partir de los datos de movimiento. (A) El período más probable por el método de periodograma de Chi-square. (B) La potencia la certeza con la cual se ha calculado el período. El análisis estadístico se hizo por una ANOVA de dos vías con post hoc test de Turkey para comparaciones múltiples ($\alpha=0.05$), * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$;

Por otro lado, el análisis con COSINOR indicó cambios en la amplitud de los periodos y la robustez del ritmo tras el tratamiento con NAD^+ . En ambos grupos, HFN11 y HFN23, se observaron disminuciones significativas en la amplitud. Esta disminución en amplitud corrobora la reducción encontrada con respecto a la robustez de los ritmos circadianos en estos grupos. Estos resultados sugieren que el tratamiento con NAD^+ puede afectar tanto a la duración del período circadiano como a la robustez de los ritmos circadianos en ratones. La disminución en la amplitud y la robustez del período podría indicar posibles disturbios en la actividad nocturna.

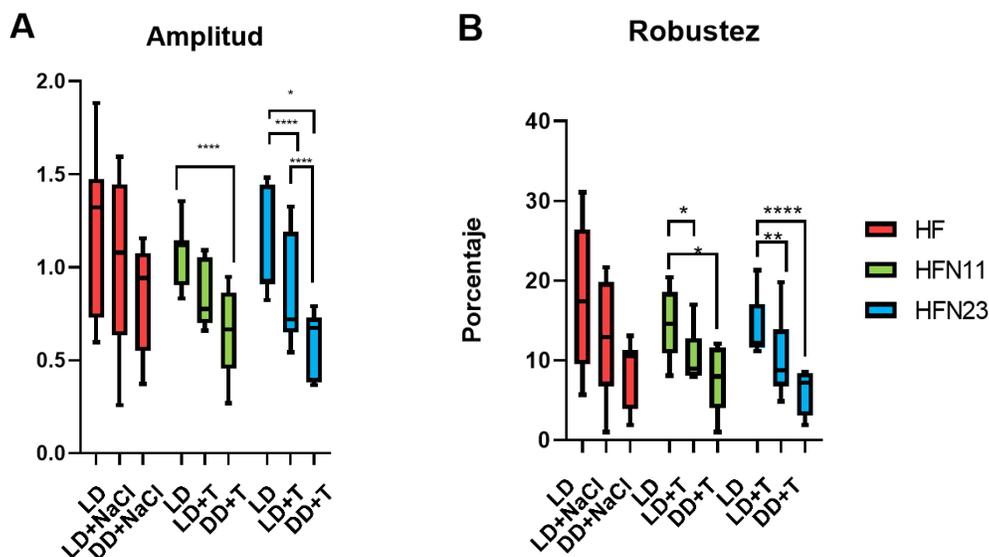


Figura 27 Evaluación de la amplitud y robustez de los ritmos circadianos en los grupos HF, HFN11 y HFN23 bajo diferentes condiciones de luz y tratamiento. (A) Representa la gráfica de la amplitud de los ritmos circadianos, calculada utilizando el software COSINOR, donde la amplitud indica la magnitud o rango de variación del ritmo biológico. (B) Representación gráfica de la robustez del ritmo circadiano, también determinada por COSINOR. Se observó una disminución significativa en la robustez para los grupos HFN11 y HFN23, sugiriendo una menor confiabilidad en la información de los ritmos para estos grupos. *El análisis estadístico se hizo por una ANOVA de dos vías con post hoc test de Turkey para comparaciones múltiples ($\alpha=0.05$), * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$;*

8.15 El tratamiento con NAD⁺ disminuye la actividad motora

Debido a que se encontraron cambios en la amplitud de la actividad al inicio de la fase de actividad se cuantificó el movimiento por análisis de área bajo la curva de la cuantificación de la actividad motriz. Es interesante notar que, solo se encontraron diferencias significativas en el grupo HFN23 (Figura 31) en donde se encontró que el tratamiento con NAD⁺ al ZT23 produce una disminución en la actividad motriz cuando este se administra en condiciones de luz oscuridad.

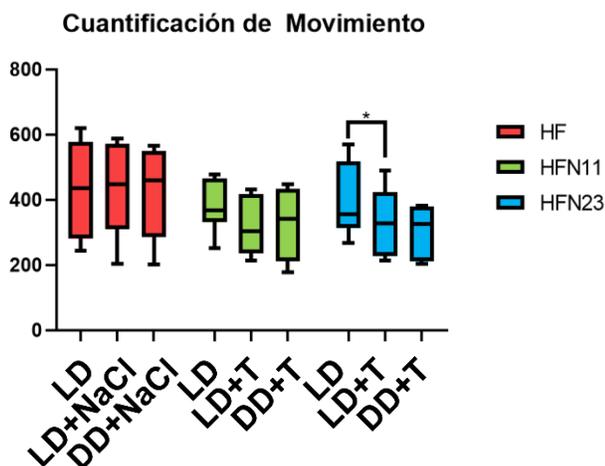


Figura 28. Cuantificación de movimiento de ratones. La cuantificación se calculó a partir del área bajo la curva recabados con el sistema OASPAD. Se encuentran diferencias significativas en el grupo HFN23 comparando a condiciones de LD con tratamiento versus LD sin tratamiento. *El análisis estadístico se hizo por una ANOVA de dos vías con post hoc test de Turkey para comparaciones múltiples ($\alpha=0.05$), * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$;*

9. DISCUSION

La técnica de tinción de Nissl es ampliamente utilizada para la identificación de estructuras neuronales en cortes de tejido cerebral (Bolon et al., 2013). En este estudio, esta técnica se demostró efectiva para la identificación de los núcleos hipotalámicos.

La estandarización del protocolo para qPCR utilizando un cerebro de ratón de prueba y RNA extraído por separado de los núcleos SCN, ARC y VMH fue clave para poder evaluar una cantidad considerable de genes. Una de las dificultades de este experimento fue la limitante de material dadas las pequeñas muestras de tejido obtenidas. La concentración de cDNA 3.75ng/μl permitió evaluar una buena cantidad de genes y al mismo tiempo no tener un sacrificio significativo en la resolución de los resultados de qPCR.

Las pruebas a genes que presentan una mayor expresión en SCN, ARC y VMH fueron un punto importante para evaluar si las muestras obtenidas correspondían a los núcleos de interés. Primero, se utilizó el gen de *Vip*, para verificar si el SCN se había diseccionado correctamente ya que las neuronas de VIP se encuentran enriquecidas en el SCN (Kalamatianos et al., 2004; Kawamoto et al., 2003; Wen et al., 2020). Los resultados del análisis estadístico sugieren que la disección del SCN fue exitosa, ya que se encontró de manera significativa una mayor expresión del gen de *Vip* en este núcleo en comparación con los otros núcleos de interés. Consecuentemente, una mayor expresión relativa significa que las muestras serán más fiables.

Es importante señalar que se utilizó también *Six6* para corroborar los hallazgos encontrados con *Vip*. Sin embargo, el uso de este gen como marcador tiene varias limitaciones. Se sabe que la expresión de *Six6* tiene una expresión alta en el SCN (Wen et al., 2020). Sin embargo, también se ha reportado que este gen también se expresa en otras regiones hipotalámicas además de que está involucrado en el desarrollo.

Particularmente, se ha encontrado que *Six6*, el cual es requerido durante el desarrollo, segrega progresivamente a otras áreas hipotalámicas (Conte et al., 2005). Esto sugiere que su expresión podría cambiar a medida que los ratones crecen.

También se hizo la evaluación de genes importantes para el ARC: *Pomc* y *Agrp*. Estos genes están involucrados en la regulación de la ingesta de alimentos, donde la melanocortina, producto del procesamiento de POMC actúa como señalizador de la saciedad y AgRP como regulador del impulso de comer (Kwon & Jo, 2020). La evaluación de *Pomc* y *Agrp* fue clave por dos razones: en primer lugar, para aumentar la fidelidad de las muestras de SCN y, en segundo lugar, para corroborar que la disección del ARC fue efectiva.

Los resultados mostraron que los niveles de expresión de *Pomc* y *Agrp* fueron mayores en las muestras del ARC en comparación con las obtenidas del SCN y VMH. *Agrp* es un gen que abunda prominentemente en el ARC (Arai et al., 2010; Nilsson et al., 2005). Esto sugiere que las muestras de ARC fueron efectivamente diseccionadas. Sin embargo, después del análisis estadístico se encontró que solo la expresión de *Agrp* en ARC fue significativamente diferente de la en SCN y VMH, más no la de *Pomc*. Una posible explicación es que la expresión de *Pomc* en el ARC puede ser más variable que la de *Agrp*, lo cual pudo haber contribuido a una falta de diferencia significativa en los niveles de expresión de *Pomc* entre las muestras de los distintos grupos. Cabe destacar que la expresión de *Pomc* y *Agrp* varía a lo largo del día (Albert et al., 2015; Jamali & Tramu, 1997). Al evaluar la pureza de las muestras utilizando solamente un punto temporal (ZT12), es probable que los resultados hayan sido más favorables para *Pomc* que para *Agrp*. Esto se debe a que la expresión de estos genes cambia durante el día (Stütz et al., 2007). Un estudio interesante sería evaluar los niveles de expresión de *Pomc* y *Agrp* a lo largo del ciclo de 24 horas, lo cual permitiría determinar con mayor precisión como estos genes contribuyen a regulación del apetito y la ingesta de alimentos en el tratamiento de NAD⁺.

Se encontró que la administración del NAD⁺ al ZT23 puede tener un efecto significativo en la regulación de genes del reloj en el SCN, por lo tanto, en el reloj circadiano. El análisis de los transcritos de la maquinaria del reloj en el SCN arrojó que el NAD⁺ provocó cambios considerables en la fase en la que se expresan *Bmal1*, *Nr1d1*, *Cry1*, *Per1* y *Per2* o, incluso, que se invirtieron como consecuencia del NAD⁺ al ZT23. Anteriormente se ha demostrado que una dieta alta en grasas causa una disrupción en los ritmos circadianos además de que una gran cantidad de genes, inesperadamente, adquieren comportamiento oscilatorio circadiano (Guo et al., 2021). Particularmente, en los núcleos hipotalámicos, se ha encontrado que una dieta alta en grasas puede provocar alteraciones en la expresión del reloj molecular (Oosterman et al., 2015). Varias investigaciones sugieren que un cambio en la expresión de fase de *Bmal1* puede resultar en cambios en los ritmos circadianos y en procesos metabólicos (Ikeda, 2014; Woon et al., 2007). Es posible que el cambio de fase observado en *Bmal1* en el grupo HFN23 genere cambios que no permitan que el NAD⁺ actúe con sus propiedades protectoras hacia la ganancia de peso tan eficientemente como sucede en el grupo HFN11. Por otra parte, *Nr1d1*, gen que codifica para REV-ERB, tiene una relación estrecha con la expresión de BMAL1/CLOCK. Al ser REV-ERB un represor de la transcripción de *Bmal1* encontramos una relación inversa en la expresión de estos (Guillaumond et al., 2005).

El análisis de los genes del reloj también muestra cambios para *Per1*, *Per2* que son consistentes con la literatura y que podrían afectar el funcionamiento del SCN. *Per1* y *Per2* muestran oscilaciones circadianas las cuales llegan a su punto máximo durante la noche y bajan durante el día (Yan et al., 1999). (Riddle et al., 2017). La expresión de *Per1* y *Per2* varía en el SCN lo que sugiere que su distribución está relacionada a la codificación y comunicación de información temporal (Riddle et al., 2017). Se ha encontrado que *Per2* es importante para la determinación del período en el SCN (Pendergast et al., 2010). Mientras que *Per1* es requerido para la ruta de remodelación de lípidos a través de las proteínas ancladas por GPI. En este estudio, la expresión de *Per1* y *Per2* tuvieron patrones de expresión similares en los diferentes grupos. Esto es coherente con previos análisis en la expresión de estos genes (Matsui et al., 2005). El

cambio de fase observado en el grupo HFN23, podría tener efectos sobre el periodo circadiano. Por último, la expresión de *Cry1* se observa de manera opuesta a *Per1* y *Per2*.

Las proteínas CRY1 y CRY2 desempeñan papeles esenciales en el mantenimiento de los ritmos circadianos. Se ha encontrado que la ausencia de ambas proteínas conduce a la pérdida de la ritmicidad circadiana (van der Horst et al., 1999). En este estudio hay un cambio de fase en *Cry1* con una disminución en la robustez circadiana. El retraso de fase observado en la expresión de CRY1 podría alterar potencialmente el equilibrio regulador dentro del reloj circadiano. El retraso de fase observado en la expresión de CRY1 podría ser parte del mecanismo por el cual actúa el NAD⁺ ya que CRY1 y CRY2 pueden actuar como inhibidores de CLOCK-BMAL1 independientemente de la presencia de luz (Griffin et al., 1999). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de CRY1 en los distintos grupos. Un análisis interesante podría estudiar también la expresión de CRY2 y hacer una comparación en CRY1.

En resumen, la alteración del programa circadiano en el SCN podría comprometer la eficiencia del sueño y el rendimiento cognitivo. Se ha encontrado que varias enfermedades psiquiátricas, neurológicas y metabólicas están relacionados con mantenimiento de los ritmos circadianos (Roh et al., 2012; Xie et al., 2013). El SCN tiene proyecciones que van desde el hipotálamo hasta el área subcortical y del tronco encefálico (Colwell, 2011; Gizowski et al., 2016). El área subcortical está involucrada en la regulación de emociones mientras que el tronco encefálico es el centro por el cual se controlan funciones involuntarias como el movimiento de los músculos del estómago que son necesarios para la digestión de los alimentos. Los cambios observados en el SCN al ZT23 podrían comprometer la calidad de los procesos involuntarios. Uno de los puntos a resaltar en este estudio es que los cambios en la expresión de la maquinaria del reloj en el hígado podrían ser regulados a través del SCN. Ahora, considerando que el SCN se encuentra en la cima jerárquica de la regulación de los ritmos circadianos es posible que haya también cambios de fase en otros órganos o regiones cerebrales. Más

estudios son necesarios para determinar el grado de alcance sobre el reloj biológico que tiene el NAD⁺. Sin embargo, los cambios de fase, producto del tratamiento de NAD⁺ observados en este estudio, podrían utilizarse como suplemento para combatir los efectos negativos de los viajes entre zonas con distintos horarios.

Además, se seleccionaron ciertos genes que están involucrados con la sincronización circadiana y que muestran comportamiento oscilatorio circadiano. El primero de estos fue el gen de *Vip* y su receptor *Vip2r*. Ambos juegan un papel en la regulación de factores que interpretan señales de luz en el SCN. Por ejemplo, el VIP regula la capacidad de respuesta de las células del SCN a los efectos de la luz (Dragich et al., 2010). También se han reportado cambios en la expresión de *Vip* con la edad. Específicamente, se encontró que envejecer modifica el patrón de expresión del mRNA del VIP en el SCN (Krajnak et al., 1998). Se ha encontrado una correlación entre los niveles de NAD⁺ y el envejecimiento en los cuales podrían también estar actuando los niveles de *Vip* (Covarrubias et al., 2021). Por último, los cambios transcripcionales que ocurren en los niveles de *Vip*, incluso en condiciones de luz y oscuridad, sugiere que las rutas de sincronización por luz están siendo afectadas. Sin embargo, en este estudio no se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos tanto para *Vip* como su receptor *Vip2r*. Se sugiere investigar los efectos del tratamiento con NAD⁺ en la expresión de *Vip* en el SCN en condiciones de oscuridad completa.

Por otra parte, se ha encontrado que el gen de *Vip* varía entre diferentes especies bajo distintas condiciones. Aunque *Vip* participa en la ruta que provoca el cambio de fase en el reloj molecular, es posible que este cambio no se manifieste de la misma manera en humanos. En ratas, por ejemplo, los niveles de mRNA de VIP incrementan durante la noche y disminuyen durante el día (Takahashi et al., 1989). Es interesante notar que, cuando el experimento se da en condiciones de oscuridad completa (DD), la expresión de VIP, así como de su mRNA, no es rítmica (Shinohara et al., 1999). Para los ratones, el caso es distinto: VIP y su mRNA muestran oscilaciones tanto en ciclos de luz y oscuridad como en oscuridad constante (Dardente et al., 2004).

Se evaluó también la expresión de *Prok2* y *Prokr2*, estos genes son importantes para varios procesos fisiológicos. En estos genes se encontraron las diferencias más marcadas y significativas en los cambios de fase provocados por el tratamiento de ZT23. Magnan descubrió que PROK2 está implicada en el control del metabolismo energético y la ingesta de alimentos (2021). Es posible que, los cambios que provoca el tratamiento del NAD⁺ estén asociados a este gen debido a su relación con el metabolismo.

Asimismo, se hizo la evaluación de *Rasd1*. Existe información limitada sobre la expresión y el metabolismo de *Rasd1* en el SCN. Takahashi (Hirokazu Takahashi et al., 2003) descubrió que el gen *Rasd1*, se expresa de forma rítmica circadiana en el SCN de ratones. Esto es consistente con nuestros resultados. Sin embargo, este trabajo no aborda directamente la expresión o el metabolismo de *Rasd1*. Garvey encontró que Rad, una GTPasa, está positivamente correlacionada con el IMC y el porcentaje de grasa corporal, y negativamente correlacionada con la tasa metabólica en reposo, pero no aborda *Rasd1* o el SCN (Garvey et al., 1997). En general, la información sobre la expresión y el metabolismo de *Rasd1* en el SCN es limitada en los artículos recopilados, es necesaria más información. Dada la relación entre *Rasd1*, Rad y el índice de masa corporal, es posible que esta proteína esté involucrada en la regulación del peso corporal en ratón.

También, se estudió el gen de *Zfhx3*, el cual es importante en metabolismo y diferenciación neuronal con una estrecha relación a ritmos circadianos. Parsons 2015 descubrió que una mutación sin sentido en ZFHX3 acelera los ritmos circadianos en ratones, y que ZFHX3 regula la transcripción a través de la interacción directa con motivos AT predichos en genes diana. Se descubrió que una mutación sin sentido en ZFHX3 altera el metabolismo y la expresión génica hipotalámica en ratones, probablemente alterando la expresión de neuropéptidos clave en el núcleo arqueado. Sería interesante evaluar el efecto de los neuropéptidos del núcleo arqueado considerando que pueden ser afectados por ZHF3 (Patrick et al., 2022). Se encontró que ZFHX3 es crítico para mantener la ritmicidad en el sistema circadiano de mamíferos

adultos (Wilcox et al., 2017). Curiosamente, se encontró que para este gen no hubo un cambio de fase para el grupo HFN23. Sin embargo, con el tratamiento a HFN11 si se encontró un cambio de fase. Esto sugiere que HFN23 está generando un cambio de fase solo sobre algunos genes cíclicos.

El presente estudio investigó el efecto de los tratamientos de NAD⁺ administrados a diferentes tiempos circadianos, CT11 y CT23, en relación con el peso corporal de ratones que consumieron una dieta hipercalórica en condiciones de oscuridad completa para evaluar si el NAD⁺ tiene propiedades de ser un *zeitgeber*. Los resultados obtenidos revelaron que el NAD⁺ tuvo una disminución significativa en el peso corporal de los ratones en comparación con los ratones control que recibieron una inyección salina. Sin embargo, es importante señalar que la disminución de peso corporal fue mayor para el grupo que recibió NAD⁺ al CT23 lo cual es opuesto a lo observado por (Escalante-Covarrubias et al., 2023). Esto sugiere que la luz participa en conjunto con el tratamiento en la reducción de peso corporal, aunque los mecanismos subyacentes de este mecanismo no son claros.

En concordancia con investigaciones anteriores realizadas en nuestro laboratorio, se observó una disminución en el peso en los animales tratados con NAD⁺. Estos hallazgos respaldan la noción de que el NAD⁺ tiene propiedades beneficiosas en la regulación del peso corporal. En primer lugar, al analizar el consumo alimenticio en relación con el peso corporal, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos en las tres etapas del experimento. Esto sugiere que, en general, el tratamiento con NAD⁺ no tuvo un efecto directo en el consumo de alimentos de los ratones en comparación con los grupos de control.

Sin embargo, se observó un patrón particular en el consumo alimenticio de los ratones pertenecientes al grupo HFN11. Estos ratones disminuyeron significativamente su consumo durante la primera semana del inicio del tratamiento y curiosamente, cuando se les eliminó la luz, comenzaron a aumentar su consumo durante esta primera semana de oscuridad completa. Esto es posible que se deba a los cambios observados al inicio

de la fase activa en el grupo HFN11. Al realizar comparaciones entre una semana antes y una semana después de comenzar la oscuridad completa, se encontró una diferencia significativa en el consumo de alimentos en relación con el peso de los ratones HFN11 (**Figura 13C**). Estos hallazgos indican que la cronoterapia con NAD⁺ puede influir en la conducta alimentaria de estos ratones dependiendo del *zeitgeber* de luz.

Sin embargo, al comparar el consumo de alimentos tres semanas antes y tres semanas después del inicio del tratamiento, no se encontraron diferencias significativas dentro de los mismos grupos. Esto sugiere que, si bien el tratamiento con NAD⁺ puede tener un efecto en la ganancia de peso de los ratones con dieta hipercalórica, este efecto no se debe directamente al consumo total de alimentos, al menos en el período de tiempo evaluado, aunque los patrones de ingesta pudieran estar alterados en ausencia de luz.

Estos resultados plantean interrogantes sobre los mecanismos subyacentes a la relación entre la cronoterapia con NAD⁺ y la conducta alimentaria en ratones. Se requiere una mayor investigación para comprender completamente los efectos del NAD⁺ en la regulación del consumo de alimentos y la ganancia de peso, así como para determinar si estos hallazgos pueden extrapolarse a otros modelos animales o incluso a humanos.

Es interesante notar que, a pesar de los cambios significativos de expresión de genes del reloj observados en el SCN, estos cambios no se reflejaron en un cambio de fase significativo tras el seguimiento del comportamiento de los ratones con infrarrojo. Es importante hacer notar que los animales fueron sacrificados en condiciones DD. A raíz de esto, la luz ya no actúa como un sincronizador. Aparentemente, el NAD⁺, podría actuar como un agente sincronizador de la actividad y posiblemente otros factores. Se observaron patrones interesantes que proporcionan información relevante sobre los efectos del NAD⁺ en el ritmo circadiano y actividad motriz de los ratones. En cuanto al tratamiento con NAD⁺, se observó que los ratones del grupo HFN11 experimentaron una supresión de la actividad al comienzo de la fase activa, mientras que esta supresión no se vio en el grupo HFN23 o grupo control, HF. Además, se encontraron cambios significativos durante la oscuridad completa en el grupo HFN23 que indican un patrón

de sueño distinto. Sin embargo, más datos son necesarios para corroborar el efecto del tratamiento con NAD⁺ al CT23 en los patrones de sueño.

El papel sincronizador del NAD⁺ podría esclarecerse al mejorar la resolución de los patrones de comportamiento incrementando el tiempo experimental. Un punto clave sería el incluir a ratones con una dieta normocalórica en el estudio. A pesar de que algunos ratones redujeron notablemente su peso, no mostraron cambios en las dinámicas de inicio o final de fase; estas se mantuvieron constantes. Es viable que la dieta alta en grasas cause cambios en el periodo que no son evidentes justo después de la pérdida de peso. Es crucial considerar estos factores al evaluar los efectos del NAD⁺ y las dietas en el comportamiento de los ratones.

10. CONCLUSIONES

1. La técnica de tinción de Nissl es efectiva para la identificación de núcleos hipotalámicos en cortes de tejido cerebral.
2. La expresión de genes específicos del SCN fue útil para verificar la correcta disección de los núcleos de interés.
3. El aumento de la concentración de NAD⁺ en un momento específico del día, funciona como un señalizador de tiempo y capaz de reprogramar el reloj circadiano del SCN.
4. Los cambios en la expresión de los genes del reloj (*Bmal1*, *Nr1d1*, *Cry1*, *Per1*, *Per2*) tienen un efecto en el comportamiento circadiano de ratones obesos.
5. El tratamiento con NAD⁺ resulta en una supresión en la amplitud de la actividad inicial.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abhilash, L., & Sheeba, V. (2019). RhythmicAlly: Your R and Shiny-Based Open-Source Ally for the Analysis of Biological Rhythms. *J Biol Rhythms*, 34(5), 551-561. <https://doi.org/10.1177/0748730419862474>
- Abrahamson, E. E., & Moore, R. Y. (2001). Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res*, 916(1-2), 172-191. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(01\)02890-6](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(01)02890-6)
- Al Shoyaib, A., Archie, S. R., & Karamyan, V. T. (2019). Intraperitoneal Route of Drug Administration: Should it Be Used in Experimental Animal Studies? *Pharm Res*, 37(1), 12. <https://doi.org/10.1007/s11095-019-2745-x>
- Albert, D. J., Storlien, L. H., Albert, J. G., & Mah, C. J. (1971). Obesity following disturbance of the ventromedial hypothalamus: a comparison of lesions, lateral cuts, and anterior cuts. *Physiol Behav*, 7(2), 135-141. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(71\)90273-3](https://doi.org/10.1016/0031-9384(71)90273-3)
- Albert, V., Cornu, M., & Hall, M. N. (2015). mTORC1 signaling in Agrp neurons mediates circadian expression of Agrp and NPY but is dispensable for regulation of feeding behavior. *Biochem Biophys Res Commun*, 464(2), 480-486. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.06.161>
- Arai, Y., Gradwohl, G., & Kameda, Y. (2010). Expression of neuropeptide Y and agouti-related peptide in the hypothalamic arcuate nucleus of newborn neurogenin3 null mutant mice. *Cell and Tissue Research*, 340(1), 137-145. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0925-4>
- Arendt, J., & Deacon, S. (1997). Treatment of circadian rhythm disorders--melatonin. *Chronobiol Int*, 14(2), 185-204. <https://doi.org/10.3109/07420529709001155>
- Aschoff, J. (1954). Zeitgeber der tierischen Tagesperiodik. *Naturwissenschaften*, 41(3), 49-56. <https://doi.org/10.1007/BF00634164>
- Aton, S. J., Colwell, C. S., Harmar, A. J., Waschek, J., & Herzog, E. D. (2005). Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nat Neurosci*, 8(4), 476-483. <https://doi.org/10.1038/nn1419>
- Auerbach, B. J., FitzGerald, G. A., & Li, M. (2022). Tempo: an unsupervised Bayesian algorithm for circadian phase inference in single-cell transcriptomics. *Nature Communications*, 13(1), 6580. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34185-w>
- Ayyar, V. S., & Sukumaran, S. (2021). Circadian rhythms: influence on physiology, pharmacology, and therapeutic interventions. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 48(3), 321-338. <https://doi.org/10.1007/s10928-021-09751-2>
- Balzani, E., Lassi, G., Maggi, S., Sethi, S., Parsons, Michael J., Simon, M., . . . Tucci, V. Beaver, L. M., Gvakharia, B. O., Vollintine, T. S., Hege, D. M., Stanewsky, R., & Giebultowicz, J. M. (2002). Loss of circadian clock function decreases reproductive fitness in males of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(4), 2134-2139. <https://doi.org/10.1073/pnas.032426699>
- Belenky, P., Bogan, K. L., & Brenner, C. (2007). NAD⁺ metabolism in health and disease. *Trends Biochem Sci*, 32(1), 12-19. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.11.006>
- Belgardt, B. F., Okamura, T., & Brüning, J. C. (2009). Hormone and glucose signalling in POMC and AgRP neurons. *J Physiol*, 587(Pt 22), 5305-5314. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.179192>
- Benlucif, S., & Dubocovich, M. L. (1996). Melatonin and light induce phase shifts of circadian activity rhythms in the C3H/HeN mouse. *J Biol Rhythms*, 11(2), 113-125. <https://doi.org/10.1177/074873049601100204>

- Blume, C., Garbazza, C., & Spitschan, M. (2019). Effects of light on human circadian rhythms, sleep and mood. *Somnologie (Berl)*, 23(3), 147-156. <https://doi.org/10.1007/s11818-019-00215-x>
- Bolon, B., Butt, M. T., Garman, R. H., & Dorman, D. C. (2013). Chapter 52 - Nervous System. In W. M. Haschek, C. G. Rousseaux, & M. A. Wallig (Eds.), *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology (Third Edition)* (pp. 2005-2093). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415759-0.00052-2>
- Bouchard-Cannon, P., Lowden, C., Trinh, D., & Cheng, H. M. (2018). Dexras1 is a homeostatic regulator of exercise-dependent proliferation and cell survival in the hippocampal neurogenic niche. *Sci Rep*, 8(1), 5294. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23673-z>
- Boulos, Z., & Morin, L. P. (1985). Entrainment of split circadian activity rhythms in hamsters. *J Biol Rhythms*, 1(1), 1-15. <https://doi.org/10.1177/074873048600100103>
- Breitenbach, T., Helfrich-Förster, C., & Dandekar, T. (2021). An effective model of endogenous clocks and external stimuli determining circadian rhythms. *Sci Rep*, 11(1), 16165. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95391-y>
- Broetto-Biazon, A. C., Bracht, A., Ishii-Iwamoto, E. L., de Moraes Silva, V., & Kelmer-Bracht, A. M. (2004). The action of extracellular NAD⁺ on Ca²⁺ efflux, hemodynamics and some metabolic parameters in the isolated perfused rat liver. *Eur J Pharmacol*, 484(2-3), 291-301. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2003.11.024>
- Buhr, E. D., Yoo, S. H., & Takahashi, J. S. (2010). Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. *Science*, 330(6002), 379-385. <https://doi.org/10.1126/science.1195262>
- Cajochen, C., Kräuchi, K., & Wirz-Justice, A. (2003). Role of melatonin in the regulation of human circadian rhythms and sleep. *J Neuroendocrinol*, 15(4), 432-437. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2003.00989.x>
- Campos, T. F., Silva, S. B., Fernandes, M. G., Araujo, J. F., & Menezes, A. A. L. (2001). Diurnal Variation in a Visual-Motor Coordination Test in Healthy Humans. *Biological Rhythm Research*, 32(2), 255-262. <https://doi.org/10.1076/brhm.32.2.255.1349>
- Carpenter, G. A. (1986). A massively parallel architecture for a self-organizing neural pattern recognition machine. In S. Grossberg (Ed.), (Vol. 36): Computer Vision, Graphics, and Image Processing.
- Carrier, J., Semba, K., Deurveilher, S., Drogos, L., Cyr-Cronier, J., Lord, C., & Sekerovick, Z. (2017). Sex differences in age-related changes in the sleep-wake cycle. *Front Neuroendocrinol*, 47, 66-85. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2017.07.004>
- Cha, J. Y., Kim, H. J., Yu, J. H., Xu, J., Kim, D., Paul, B. D., . . . Kim, J. W. (2013). Dexras1 mediates glucocorticoid-associated adipogenesis and diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(51), 20575-20580. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320454110>
- Chan, S., & Debono, M. (2010). Replication of cortisol circadian rhythm: new advances in hydrocortisone replacement therapy. *Ther Adv Endocrinol Metab*, 1(3), 129-138. <https://doi.org/10.1177/2042018810380214>
- Chang, A. M., Scheer, F. A., & Czeisler, C. A. (2011). The human circadian system adapts to prior photic history. *J Physiol*, 589(Pt 5), 1095-1102. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.201194>
- Cheng, M. Y., Bullock, C. M., Li, C., Lee, A. G., Bermak, J. C., Belluzzi, J., . . . Zhou, Q. Y. (2002). Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature*, 417(6887), 405-410. <https://doi.org/10.1038/417405a>
- Claustrat, B., Brun, J., & Chazot, G. (2005). The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev*, 9(1), 11-24. <https://doi.org/10.1016/j.smrv.2004.08.001>
- Colwell, C. S. (2011). Linking neural activity and molecular oscillations in the SCN. *Nat Rev Neurosci*, 12(10), 553-569. <https://doi.org/10.1038/nrn3086>

- Conte, I., Morcillo, J., & Bovolenta, P. (2005). Comparative analysis of Six3 and Six6 distribution in the developing and adult mouse brain. *Developmental Dynamics*, 234(3), 718-725. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/dvdy.20463>
- Cornelissen, G. (2014). Cosinor-based rhythmometry. *Theor Biol Med Model*, 11, 16. <https://doi.org/10.1186/1742-4682-11-16>
- Cortes-Campos, C., Elizondo, R., Carril, C., Martínez, F., Boric, K., Nualart, F., & Garcia-Robles, M. A. (2013). MCT2 expression and lactate influx in anorexigenic and orexigenic neurons of the arcuate nucleus. *PLoS One*, 8(4), e62532. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062532>
- Covarrubias, A. J., Perrone, R., Grozio, A., & Verdin, E. (2021). NAD(+) metabolism and its roles in cellular processes during ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 22(2), 119-141. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00313-x>
- Crunkhorn, S. (2020). Shortening jet-lag recovery. In *Nat Rev Drug Discov* (Vol. 19, pp. 388). <https://doi.org/10.1038/d41573-020-00085-1>
- Czeisler, C. A. (2015). Duration, timing and quality of sleep are each vital for health, performance and safety. *Sleep Health*, 1(1), 5-8. <https://doi.org/10.1016/j.sleh.2014.12.008>
- Dardente, H., Menet, J. S., Challet, E., Tournier, B. B., Pévet, P., & Masson-Pévet, M. (2004). Daily and circadian expression of neuropeptides in the suprachiasmatic nuclei of nocturnal and diurnal rodents. *Brain Res Mol Brain Res*, 124(2), 143-151. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.01.010>
- Dattilo, M., Antunes, H. K., Medeiros, A., Mônico Neto, M., Souza, H. S., Tufik, S., & de Mello, M. T. (2011). Sleep and muscle recovery: endocrinological and molecular basis for a new and promising hypothesis. *Med Hypotheses*, 77(2), 220-222. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2011.04.017>
- de Guia, R. M., Agerholm, M., Nielsen, T. S., Consitt, L. A., Sogaard, D., Helge, J. W., . . . Trebak, J. T. (2019). Aerobic and resistance exercise training reverses age-dependent decline in NAD(+) salvage capacity in human skeletal muscle. *Physiol Rep*, 7(12), e14139. <https://doi.org/10.14814/phy2.14139>
- De Nys, L., Anderson, K., Ofosu, E. F., Ryde, G. C., Connelly, J., & Whittaker, A. C. (2022). The effects of physical activity on cortisol and sleep: A systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*, 143, 105843. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2022.105843>
- De Souza, C. T., Araujo, E. P., Bordin, S., Ashimine, R., Zollner, R. L., Boschero, A. C., . . . Velloso, L. A. (2005). Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology*, 146(10), 4192-4199. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1520>
- Di Milia, L., & Folkard, S. (2021). More Than Morningness: The Effect of Circadian Rhythm Amplitude and Stability on Resilience, Coping, and Sleep Duration [Original Research]. *Frontiers in Psychology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2021.782349>
- Dolezal, B. A., Neufeld, E. V., Boland, D. M., Martin, J. L., & Cooper, C. B. (2017). Interrelationship between Sleep and Exercise: A Systematic Review. *Adv Prev Med*, 2017, 1364387. <https://doi.org/10.1155/2017/1364387>
- Dragich, J. M., Loh, D. H., Wang, L. M., Vosko, A. M., Kudo, T., Nakamura, T. J., . . . Colwell, C. S. (2010). The role of the neuropeptides PACAP and VIP in the photic regulation of gene expression in the suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci*, 31(5), 864-875. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07119.x>
- Drucker-Colín, R., Aguilar-Roblero, R., García-Hernández, F., Fernández-Cancino, F., & Bermudez Rattoni, F. (1984). Fetal suprachiasmatic nucleus transplants: diurnal rhythm recovery of lesioned rats. *Brain Res*, 311(2), 353-357. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)90099-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(84)90099-4)

- Eckel-Mahan, K. L., Patel, V. R., de Mateo, S., Orozco-Solis, R., Ceglia, N. J., Sahar, S., . . . Sassone-Corsi, P. (2013). Reprogramming of the circadian clock by nutritional challenge. *Cell*, 155(7), 1464-1478. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.034>
- Elderink-Chen, Z., Bosman, J., Sartor, F., Dodd, A. N., Kovács Á, T., & Merrow, M. (2021). A circadian clock in a nonphotosynthetic prokaryote. *Sci Adv*, 7(2). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abe2086>
- Ehlers, C. L., Frank, E., & Kupfer, D. J. (1988). Social zeitgebers and biological rhythms. A unified approach to understanding the etiology of depression. *Arch Gen Psychiatry*, 45(10), 948-952. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1988.01800340076012>
- Emens, J. (2020). Non-24-Hour Sleep-Wake Rhythm Disorder. In R. R. Auger (Ed.), *Circadian Rhythm Sleep-Wake Disorders: An Evidence-Based Guide for Clinicians and Investigators* (pp. 123-136). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-43803-6_9
- Escalante-Covarrubias, Q., Mendoza-Viveros, L., González-Suárez, M., Sitten-Olea, R., Velázquez-Villegas, L. A., Becerril-Pérez, F., . . . Aguilar-Arnal, L. (2023). Time-of-day defines NAD+ efficacy to treat diet-induced metabolic disease by synchronizing the hepatic clock in mice. *Nature Communications*, 14(1), 1685. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37286-2>
- Esposito, K., Chiodini, P., Colao, A., Lenzi, A., & Giugliano, D. (2012). Metabolic Syndrome and Risk of Cancer : A systematic review and meta-analysis. In (pp. 2402–2411): *Diabetes Care*.
- Fonken, L. K., & Nelson, R. J. (2014). The Effects of Light at Night on Circadian Clocks and Metabolism. *Endocrine Reviews*, 35(4), 648-670. <https://doi.org/10.1210/er.2013-1051>
- Fukuwatari, T., Shibata, K., Ishihara, K., Fushiki, T., & Sugimoto, E. (2001). Elevation of blood NAD level after moderate exercise in young women and mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 47(2), 177-179. <https://doi.org/10.3177/jnsv.47.177>
- Gabriel, B. M., & Zierath, J. R. (2019). Circadian rhythms and exercise - re-setting the clock in metabolic disease. *Nat Rev Endocrinol*, 15(4), 197-206. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0150-x>
- Garvey, W. T., Maianu, L., Kennedy, A., Wallace, P., Ganaway, E., Hamacher, L. L., . . . Burns, D. K. (1997). Muscle Rad expression and human metabolism: potential role of the novel Ras-related GTPase in energy expenditure and body composition. *Diabetes*, 46(3), 444-450. <https://doi.org/10.2337/diab.46.3.444>
- Gerhart-Hines, Z., & Lazar, M. A. (2015). Circadian metabolism in the light of evolution. *Endocr Rev*, 36(3), 289-304. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1007>
- Giesecke, A., Johnstone, P. S., Lamaze, A., Landskron, J., Atay, E., Chen, K.-F., . . . Stanewsky, R. (2023). A novel period mutation implicating nuclear export in temperature compensation of the *Drosophila* circadian clock. *Current Biology*, 33(2), 336-350.e335. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.12.011>
- Gizowski, C., Zaelzer, C., & Bourque, C. W. (2016). Clock-driven vasopressin neurotransmission mediates anticipatory thirst prior to sleep. *Nature*, 537(7622), 685-688. <https://doi.org/10.1038/nature19756>
- Griffin, E. A., Jr., Staknis, D., & Weitz, C. J. (1999). Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock. *Science*, 286(5440), 768-771. <https://doi.org/10.1126/science.286.5440.768>
- Guillaumond, F., Dardente, H., Giguère, V., & Cermakian, N. (2005). Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms*, 20(5), 391-403. <https://doi.org/10.1177/0748730405277232>
- Guo, X., Zheng, J., Zhang, S., Jiang, X., Chen, T., Yu, J., . . . Wu, C. (2021). Advances in Unhealthy Nutrition and Circadian Dysregulation in Pathophysiology of NAFLD. *Front Clin Diabetes Healthc*, 2, 691828. <https://doi.org/10.3389/fcdhc.2021.691828>

- Hamnett, R., Crosby, P., Chesham, J. E., & Hastings, M. H. (2019). Vasoactive intestinal peptide controls the suprachiasmatic circadian clock network via ERK1/2 and DUSP4 signalling. *Nat Commun*, *10*(1), 542. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08427-3>
- Hannibal, J. (2002). Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell Tissue Res*, *309*(1), 73-88. <https://doi.org/10.1007/s00441-002-0574-3>
- Harmar, A. J., Marston, H. M., Shen, S., Spratt, C., West, K. M., Sheward, W. J., . . . Hastings, M. H. (2002). The VPAC(2) receptor is essential for circadian function in the mouse suprachiasmatic nuclei. *Cell*, *109*(4), 497-508. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00736-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00736-5)
- Harrington, M. E. (1997). The ventral lateral geniculate nucleus and the intergeniculate leaflet: interrelated structures in the visual and circadian systems. *Neurosci Biobehav Rev*, *21*(5), 705-727. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(96\)00019-x](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(96)00019-x)
- Hashimoto, A., Fujiki, S., Nakamura, W., & Nakamura, T. J. Effects of testosterone on circadian rhythmicity in old mice.
- Hastings, M. H., Maywood, E. S., & Brancaccio, M. (2018). Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Nat Rev Neurosci*, *19*(8), 453-469. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0026-z>
- Hastings, M. H., Reddy, A. B., & Maywood, E. S. (2003). A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nat Rev Neurosci*, *4*(8), 649-661. <https://doi.org/10.1038/nrn1177>
- Haupt, S., Eckstein, M. L., Wolf, A., Zimmer, R. T., Wachsmuth, N. B., & Moser, O. (2021). Eat, Train, Sleep-Retreat? Hormonal Interactions of Intermittent Fasting, Exercise and Circadian Rhythm. *Biomolecules*, *11*(4). <https://doi.org/10.3390/biom11040516>
- Herzog, E. D., Hermanstyn, T., Smyllie, N. J., & Hastings, M. H. (2017). Regulating the Suprachiasmatic Nucleus (SCN) Circadian Clockwork: Interplay between Cell-Autonomous and Circuit-Level Mechanisms. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *9*(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027706>
- Herzog, E. D., & Huckfeldt, R. M. (2003). Circadian entrainment to temperature, but not light, in the isolated suprachiasmatic nucleus. *J Neurophysiol*, *90*(2), 763-770. <https://doi.org/10.1152/jn.00129.2003>
- Hirano, A., Fu, Y.-H., & Ptáček, L. J. (2016). The intricate dance of post-translational modifications in the rhythm of life. *Nature Structural & Molecular Biology*, *23*(12), 1053-1060. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3326>
- Hong, C. I., Conrad, E. D., & Tyson, J. J. (2007). A proposal for robust temperature compensation of circadian rhythms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(4), 1195-1200. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601378104>
- Hughes, S., Edwards, J. K., Wilcox, A. G., Potheary, C. A., Barnard, A. R., Joynson, R., . . . Nolan, P. M. (2021). Zfhx3 modulates retinal sensitivity and circadian responses to light. *The FASEB Journal*, *35*(9), e21802. <https://doi.org/https://doi.org/10.1096/fj.202100563R>
- Huisman, C., Cho, H., Brock, O., Lim, S. J., Youn, S. M., Park, Y., . . . Lee, J. W. Single cell transcriptome analysis of developing arcuate nucleus neurons uncovers their key developmental regulators.
- Ikeda, M. (2014). Bmal1 is an essential regulator for circadian cytosolic Ca²⁺ rhythms in suprachiasmatic nucleus neurons. *J Neurosci*, *34*(36), 12029-12038. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.5158-13.2014>
- Ishida, A., Mutoh, T., Ueyama, T., Bando, H., Masubuchi, S., Nakahara, D., . . . Okamura, H. (2005). Light activates the adrenal gland: timing of gene expression and glucocorticoid release. *Cell Metab*, *2*(5), 297-307. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.09.009>
- Jais, A., & Brüning, J. C. (2022). Arcuate Nucleus-Dependent Regulation of Metabolism-Pathways to Obesity and Diabetes Mellitus. *Endocr Rev*, *43*(2), 314-328. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnab025>

- Jamali, A. K., & Tramu, G. (1997). Daily cycle of fos expression within hypothalamic POMC neurons of the male rat. *Brain Res*, 771(1), 45-54. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(97\)00767-1](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(97)00767-1)
- Jin, X., Shearman, L. P., Weaver, D. R., Zylka, M. J., de Vries, G. J., & Reppert, S. M. (1999). A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell*, 96(1), 57-68. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80959-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80959-9)
- Johnston, J. D. (2014). Physiological links between circadian rhythms, metabolism and nutrition. *Exp Physiol*, 99(9), 1133-1137. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2014.078295>
- Kalamatianos, T., Kalló, I., Piggins, H. D., & Coen, C. W. (2004). Expression of VIP and/or PACAP receptor mRNA in peptide synthesizing cells within the suprachiasmatic nucleus of the rat and in its efferent target sites. *J Comp Neurol*, 475(1), 19-35. <https://doi.org/10.1002/cne.20168>
- Kalsbeek, A., Scheer, F. A., Perreau-Lenz, S., La Fleur, S. E., Yi, C. X., Fliers, E., & Buijs, R. M. (2011). Circadian disruption and SCN control of energy metabolism. *FEBS Lett*, 585(10), 1412-1426. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.03.021>
- Katsyuba, E., Romani, M., Hofer, D., & Auwerx, J. (2020). NAD. *Nat Metab*, 2(1), 9-31. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0161-5>
- Kawamoto, K., Nagano, M., Kanda, F., Chihara, K., Shigeyoshi, Y., & Okamura, H. (2003). Two types of VIP neuronal components in rat suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci Res*, 74(6), 852-857. <https://doi.org/10.1002/jnr.10751>
- Kempainen, R. J., & Behrend, E. N. (1998). Dexamethasone rapidly induces a novel ras superfamily member-related gene in AtT-20 cells. *J Biol Chem*, 273(6), 3129-3131. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.6.3129>
- Kervezee, L., Kosmadopoulos, A., & Boivin, D. B. (2020). Metabolic and cardiovascular consequences of shift work: The role of circadian disruption and sleep disturbances. *Eur J Neurosci*, 51(1), 396-412. <https://doi.org/10.1111/ejn.14216>
- Khan, A. H., & Tian, X.-L. (2019). Circadian Amplitude. In D. Gu & M. E. Dupre (Eds.), *Encyclopedia of Gerontology and Population Aging* (pp. 1-9). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-69892-2_1072-1
- Kinyua, A. W., Yang, D. J., Chang, I., & Kim, K. W. (2016). Steroidogenic Factor 1 in the Ventromedial Nucleus of the Hypothalamus Regulates Age-Dependent Obesity. *PLoS One*, 11(9), e0162352. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162352>
- Klein, D. C., & Weller, J. L. (1970). Indole Metabolism in the Pineal Gland: A Circadian Rhythm in *N*-Acetyltransferase. *Science*, 169(3950), 1093-1095. <https://doi.org/doi:10.1126/science.169.3950.1093>
- Klerman, E. B., Duffy, J. F., Dijk, D. J., & Czeisler, C. A. (2001). Circadian phase resetting in older people by ocular bright light exposure. *J Investig Med*, 49(1), 30-40. <https://doi.org/10.2310/6650.2001.34088>
- Koch, C. E., Leinweber, B., Drengberg, B. C., Blaum, C., & Oster, H. (2017). Interaction between circadian rhythms and stress. *Neurobiol Stress*, 6, 57-67. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2016.09.001>
- Koch-Nolte, F., Haag, F., Guse, A. H., Lund, F., & Ziegler, M. (2009). Emerging roles of NAD⁺ and its metabolites in cell signaling. *Sci Signal*, 2(57), mr1. <https://doi.org/10.1126/scisignal.257mr1>
- Korf, H. W., & Møller, M. (2021). Arcuate nucleus, median eminence, and hypophysial pars tuberalis. *Handb Clin Neurol*, 180, 227-251. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-820107-7.00015-x>
- Krajnak, K., Kashon, M. L., Rosewell, K. L., & Wise, P. M. (1998). Aging alters the rhythmic expression of vasoactive intestinal polypeptide mRNA but not arginine vasopressin mRNA in the suprachiasmatic nuclei of female rats. *J Neurosci*, 18(12), 4767-4774. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.18-12-04767.1998>

- Krieger, D. T. (1974). Food and water restriction shifts corticosterone, temperature, activity and brain amine periodicity. *Endocrinology*, 95(5), 1195-1201. <https://doi.org/10.1210/endo-95-5-1195>
- Kurosawa, G., & Iwasa, Y. (2002).
- Kwon, E., & Jo, Y. H. (2020). Activation of the ARC(POMC)→MeA Projection Reduces Food Intake. *Front Neural Circuits*, 14, 595783. <https://doi.org/10.3389/fncir.2020.595783>
- Lall, G. S., Atkinson, L. A., Corlett, S. A., Broadbridge, P. J., & Bonsall, D. R. (2012). Circadian entrainment and its role in depression: a mechanistic review. *J Neural Transm (Vienna)*, 119(10), 1085-1096. <https://doi.org/10.1007/s00702-012-0858-z>
- Lee, J. W., Hirota, T., Peters, E. C., Garcia, M., Gonzalez, R., Cho, C. Y., . . . Kay, S. A. (2011). A small molecule modulates circadian rhythms through phosphorylation of the period protein. *Angew Chem Int Ed Engl*, 50(45), 10608-10611. <https://doi.org/10.1002/anie.201103915>
- Levine, D. C., Hong, H., Weidemann, B. J., Ramsey, K. M., Affinati, A. H., Schmidt, M. S., . . . Bass, J. (2020). NAD(+) Controls Circadian Reprogramming through PER2 Nuclear Translocation to Counter Aging. *Mol Cell*, 78(5), 835-849.e837. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.04.010>
- Lewis, P., Korf, H. W., Kuffer, L., Groß, J. V., & Erren, T. C. (2018). Exercise time cues (zeitgebers) for human circadian systems can foster health and improve performance: a systematic review. *BMJ Open Sport Exerc Med*, 4(1), e000443. <https://doi.org/10.1136/bmjsem-2018-000443>
- Lewis, P., Oster, H., Korf, H. W., Foster, R. G., & Erren, T. C. (2020). Food as a circadian time cue - evidence from human studies. *Nat Rev Endocrinol*, 16(4), 213-223. <https://doi.org/10.1038/s41574-020-0318-z>
- Li, L., Zhang, M. Q., Sun, X., Liu, W. Y., Huang, Z. L., & Wang, Y. Q. (2022). Role of Dorsomedial Hypothalamus GABAergic Neurons in Sleep-Wake States in Response to Changes in Ambient Temperature in Mice. *Int J Mol Sci*, 23(3). <https://doi.org/10.3390/ijms23031270>
- Li, W., & Sauve, A. A. (2015). NAD⁺ content and its role in mitochondria. *Methods Mol Biol*, 1241, 39-48. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1875-1_4
- Liu, B., Qiao, L., Liu, K., Liu, J., Piccinni-Ash, T. J., & Chen, Z. F. (2022). Molecular and neural basis of pleasant touch sensation. *Science*, 376(6592), 483-491. <https://doi.org/10.1126/science.abn2479>
- Luna, A., McFadden, G. B., Aladjem, M. I., & Kohn, K. W. (2015). Predicted Role of NAD Utilization in the Control of Circadian Rhythms during DNA Damage Response. *PLoS Comput Biol*, 11(5), e1004144. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004144>
- Matsui, D., Takekida, S., & Okamura, H. (2005). Molecular oscillation of Per1 and Per2 genes in the rodent brain: an in situ hybridization and molecular biological study. *Kobe J Med Sci*, 51(5-6), 85-93.
- Maywood, E. S., Chesham, J. E., O'Brien, J. A., & Hastings, M. H. (2011). A diversity of paracrine signals sustains molecular circadian cycling in suprachiasmatic nucleus circuits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(34), 14306-14311. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101767108>
- Maywood, E. S., Reddy, A. B., Wong, G. K., O'Neill, J. S., O'Brien, J. A., McMahon, D. G., . . . Hastings, M. H. (2006). Synchronization and maintenance of timekeeping in suprachiasmatic circadian clock cells by neuropeptidergic signaling. *Curr Biol*, 16(6), 599-605. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.02.023>
- McClung, C. R. (2006). Plant circadian rhythms. *Plant Cell*, 18(4), 792-803. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.040980>
- McHill, A. W., Butler, M. P., & Shea, S. A. (2017). Free-Running Cycle. In *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior* (pp. 1-4). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47829-6_1942-1

- Mieda, M. (2019). The Network Mechanism of the Central Circadian Pacemaker of the SCN: Do AVP Neurons Play a More Critical Role Than Expected? *Front Neurosci*, 13, 139. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00139>
- Minamiya, Y., Saito, H., Ito, M., Imai, K., Konno, H., Takahashi, N., . . . Ogawa, J. (2012). Suppression of Zinc Finger Homeobox 3 expression in tumor cells decreases the survival rate among non-small cell lung cancer patients. *Cancer Biomark*, 11(4), 139-146. <https://doi.org/10.3233/cbm-2012-00272>
- Miranda-Anaya, M., Luna-Moreno, D., Carmona-Castro, A., & Díaz-Muñoz, M. (2017). Differences in Photic Entrainment of Circadian Locomotor Activity Between Lean and Obese Volcano Mice (*Neotomodon alstoni*). *J Circadian Rhythms*, 15, 1. <https://doi.org/10.5334/jcr.145>
- Mistlberger, R. E., & Skene, D. J. (2004). Social influences on mammalian circadian rhythms: animal and human studies. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 79(3), 533-556. <https://doi.org/10.1017/s1464793103006353>
- Mohawk, J. A., Green, C. B., & Takahashi, J. S. (2012). Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annu Rev Neurosci*, 35, 445-462. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-060909-153128>
- Moore, R. Y., & Card, J. P. (1994). Intergeniculate leaflet: an anatomically and functionally distinct subdivision of the lateral geniculate complex. *J Comp Neurol*, 344(3), 403-430. <https://doi.org/10.1002/cne.903440306>
- Morin, L. P. (1994). The circadian visual system. *Brain Res Brain Res Rev*, 19(1), 102-127. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(94\)90005-1](https://doi.org/10.1016/0165-0173(94)90005-1)
- Nakahata, Y., & Bessho, Y. (2016). The Circadian NAD(+) Metabolism: Impact on Chromatin Remodeling and Aging. *Biomed Res Int*, 2016, 3208429. <https://doi.org/10.1155/2016/3208429>
- Nakahata, Y., Sahar, S., Astarita, G., Kaluzova, M., & Sassone-Corsi, P. (2009). Circadian control of the NAD+ salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science*, 324(5927), 654-657. <https://doi.org/10.1126/science.1170803>
- Nassan, M., & Videnovic, A. (2022). Circadian rhythms in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol*, 18(1), 7-24. <https://doi.org/10.1038/s41582-021-00577-7>
- Nilsson, I., Johansen, J. E., Schalling, M., Hökfelt, T., & Fetissov, S. O. (2005). Maturation of the hypothalamic arcuate agouti-related protein system during postnatal development in the mouse. *Developmental Brain Research*, 155(2), 147-154. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.devbrainres.2005.01.009>
- Nir, I. (2003). Melatonin for the treatment of disorders in circadian rhythm and sleep: could it form a basis for medication? *Recept Channels*, 9(6), 379-385. <https://doi.org/10.3109/714041018>
- Okabe, K., Yaku, K., Tobe, K., & Nakagawa, T. (2019). Implications of altered NAD metabolism in metabolic disorders. *J Biomed Sci*, 26(1), 34. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0527-8>
- Ono, D., Honma, S., & Honma, K. (2016). Differential roles of AVP and VIP signaling in the postnatal changes of neural networks for coherent circadian rhythms in the SCN. *Sci Adv*, 2(9), e1600960. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600960>
- Oosterman, J. E., Kalsbeek, A., la Fleur, S. E., & Belsham, D. D. (2015). Impact of nutrients on circadian rhythmicity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 308(5), R337-350. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00322.2014>
- Orozco-Solis, R., Aguilar-Arnal, L., Murakami, M., Peruquetti, R., Ramadori, G., Coppari, R., & Sassone-Corsi, P. (2016). The Circadian Clock in the Ventromedial Hypothalamus Controls Cyclic Energy Expenditure. *Cell Metab*, 23(3), 467-478. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.02.003>

- Palagini, L., Manni, R., Aguglia, E., Amore, M., Brugnoli, R., Bioulac, S., . . . Geoffroy, P. A. (2021). International Expert Opinions and Recommendations on the Use of Melatonin in the Treatment of Insomnia and Circadian Sleep Disturbances in Adult Neuropsychiatric Disorders. *Front Psychiatry*, 12, 688890. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.688890>
- Panda, S. (2016). Circadian physiology of metabolism. *Science*, 354(6315), 1008-1015. <https://doi.org/10.1126/science.aah4967>
- Panda, S., Antoch, M. P., Miller, B. H., Su, A. I., Schook, A. B., Straume, M., . . . Hogenesch, J. B. (2002). Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell*, 109(3), 307-320. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00722-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00722-5)
- Panda, S., Provencio, I., Tu, D. C., Pires, S. S., Rollag, M. D., Castrucci, A. M., . . . Hogenesch, J. B. (2003). Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science*, 301(5632), 525-527. <https://doi.org/10.1126/science.1086179>
- Park, J. W., Roh, E., Kang, G. M., Gil, S. Y., Kim, H. K., Lee, C. H., . . . Kim, M. S. (2023). Circulating blood eNAMPT drives the circadian rhythms in locomotor activity and energy expenditure. *Nat Commun*, 14(1), 1994. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37517-6>
- Parsons, M. J., Brancaccio, M., Sethi, S., Maywood, E. S., Satija, R., Edwards, J. K., . . . Nolan, P. M. (2015). The Regulatory Factor ZFH3 Modifies Circadian Function in SCN via an AT Motif-Driven Axis. *Cell*, 162(3), 607-621. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.060>
- Patke, A., Young, M. W., & Axelrod, S. (2020). Molecular mechanisms and physiological importance of circadian rhythms. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 21(2), 67-84. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0179-2>
- Patrick, M. N., Gareth, B., Nora, B., Ashleigh, G. W., Liz, B., Lee, M., . . . Rebecca, D. (2022). A missense mutation in zinc finger homeobox-3 (ZFH3) impedes growth and alters metabolism and hypothalamic gene expression in mice. *bioRxiv*, 2022.2005.2025.493441. <https://doi.org/10.1101/2022.05.25.493441>
- Pendergast, J. S., Friday, R. C., & Yamazaki, S. (2010). Distinct functions of Period2 and Period3 in the mouse circadian system revealed by in vitro analysis. *PLoS One*, 5(1), e8552. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008552>
- Perreau-Lenz, S., Kalsbeek, A., Pévet, P., & Buijs, R. M. (2004). Glutamatergic clock output stimulates melatonin synthesis at night. *Eur J Neurosci*, 19(2), 318-324. <https://doi.org/10.1111/j.0953-816x.2003.03132.x>
- Perreau-Lenz, S., Kalsbeek, A., Van Der Vliet, J., Pévet, P., & Buijs, R. M. (2005). In vivo evidence for a controlled offset of melatonin synthesis at dawn by the suprachiasmatic nucleus in the rat. *Neuroscience*, 130(3), 797-803. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.10.014>
- Piggins, H. D., Antle, M. C., & Rusak, B. (1995). Neuropeptides phase shift the mammalian circadian pacemaker. *J Neurosci*, 15(8), 5612-5622. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.15-08-05612.1995>
- Prokkola, J. M., & Nikinmaa, M. (2018). Circadian rhythms and environmental disturbances - underexplored interactions. *J Exp Biol*, 221(Pt 16). <https://doi.org/10.1242/jeb.179267>
- Prosser, H. M., Bradley, A., Chesham, J. E., Ebling, F. J., Hastings, M. H., & Maywood, E. S. (2007). Prokineticin receptor 2 (Prokr2) is essential for the regulation of circadian behavior by the suprachiasmatic nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(2), 648-653. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606884104>
- Quante, M., Mariani, S., Weng, J., Marinac, C. R., Kaplan, E. R., Rueschman, M., . . . Redline, S. (2019). Zeitgebers and their association with rest-activity patterns. *Chronobiol Int*, 36(2), 203-213. <https://doi.org/10.1080/07420528.2018.1527347>
- Rajman, L., Chwalek, K., & Sinclair, D. A. (2018). Therapeutic Potential of NAD-Boosting Molecules: The In Vivo Evidence. *Cell Metab*, 27(3), 529-547. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.02.011>

- Rapps, K., Kisliouk, T., Marco, A., Weller, A., & Meiri, N. (2023). Dieting reverses histone methylation and hypothalamic AgRP regulation in obese rats. *Front Endocrinol (Lausanne)*, *14*, 1121829. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1121829>
- Refinetti, R. (2020). Circadian rhythmicity of body temperature and metabolism. *Temperature (Austin)*, *7*(4), 321-362. <https://doi.org/10.1080/23328940.2020.1743605>
- Rehan, L., Laszki-Szczańchor, K., Sobieszczkańska, M., & Polak-Jonkisz, D.
- Reilly, T. (1990). Human circadian rhythms and exercise. *Crit Rev Biomed Eng*, *18*(3), 165-180.
- Revel, F. G., Herwig, A., Garidou, M. L., Dardente, H., Menet, J. S., Masson-Pévet, M., . . . Pévet, P. (2007). The circadian clock stops ticking during deep hibernation in the European hamster. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(34), 13816-13820. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704699104>
- Ribeiro, R. F. N., Cavadas, C., & Silva, M. M. C. (2021). Small-molecule modulators of the circadian clock: Pharmacological potentials in circadian-related diseases. *Drug Discovery Today*, *26*(7), 1620-1641. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.03.015>
- Riddle, M., Mezas, E., Foley, D., LeSauter, J., & Silver, R. (2017). Differential localization of PER1 and PER2 in the brain master circadian clock. *Eur J Neurosci*, *45*(11), 1357-1367. <https://doi.org/10.1111/ejn.13441>
- Riede, S. J., van der Vinne, V., & Hut, R. A. (2017). The flexible clock: predictive and reactive homeostasis, energy balance and the circadian regulation of sleep-wake timing. *J Exp Biol*, *220*(Pt 5), 738-749. <https://doi.org/10.1242/jeb.130757>
- Roenneberg, T., Kantermann, T., Juda, M., Vetter, C., & Allebrandt, K. V. (2013). Light and the Human Circadian Clock.
- Rogina, B., & Helfand, S. L. (2004). Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(45), 15998-16003. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404184101>
- Roh, J. H., Huang, Y., Bero, A. W., Kasten, T., Stewart, F. R., Bateman, R. J., & Holtzman, D. M. (2012). Disruption of the sleep-wake cycle and diurnal fluctuation of β -amyloid in mice with Alzheimer's disease pathology. *Sci Transl Med*, *4*(150), 150ra122. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004291>
- Rojas-Martínez, R., Aguilar-Salinas, C. A., Romero-Martínez, M., Castro-Porras, L., Gómez-Velasco, D., & Mehta, R. (2021). Trends in the prevalence of metabolic syndrome and its components in Mexican adults, 2006-2018. *Salud Publica Mex*, *63*(6, Nov-Dic), 713-724. <https://doi.org/10.21149/12835>
- Ruby, N. F., Burns, D. E., & Heller, H. C. (1999). Circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus are temperature-compensated and phase-shifted by heat pulses in vitro. *J Neurosci*, *19*(19), 8630-8636. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-19-08630.1999>
- Rönnemaa, E., Zethelius, B., Sundelöf, J., Sundström, J., Degerman-Gunnarsson, M., Berne, C., . . . Kilander, L. (2008). Impaired insulin secretion increases the risk of Alzheimer disease. *Neurology*, *71*(14), 1065-1071. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000310646.32212.3a>
- Sack, R. L., & Lewy, A. J.
- Sahar, S., Nin, V., Barbosa, M. T., Chini, E. N., & Sassone-Corsi, P. (2011). Altered behavioral and metabolic circadian rhythms in mice with disrupted NAD⁺ oscillation. *Aging (Albany NY)*, *3*(8), 794-802. <https://doi.org/10.18632/aging.100368>
- Sandahl, H., Baandrup, L., Vindbjerg, E., Jennum, P., & Carlsson, J. (2021). Social zeitgebers and circadian dysrhythmia are associated with severity of symptoms of PTSD and depression in trauma-affected refugees. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, *271*(7), 1319-1329. <https://doi.org/10.1007/s00406-021-01266-8>
- Sangoram, A. M., Saez, L., Antoch, M. P., Gekakis, N., Staknis, D., Whiteley, A., . . . Takahashi, J. S. (1998). Mammalian Circadian Autoregulatory Loop: A Timeless Ortholog and mPer1 Interact and Negatively Regulate CLOCK-BMAL1-Induced Transcription. *Neuron*, *21*(5), 1101-1113. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80627-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80627-3)

- Sapra, A., & Bhandari, P. (2023). Diabetes. In *StatPearls*. StatPearls Publishing
Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC.
- Sarafidis, P. A., & Nilsson, P. M. (2006). The metabolic syndrome: a glance at its history. *J Hypertens*, 24(4), 621-626. <https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000217840.26971.b6>
- Sato, K., Meng, F., Francis, H., Wu, N., Chen, L., Kennedy, L., . . . Alpini, G. (2020). Melatonin and circadian rhythms in liver diseases: Functional roles and potential therapies. *J Pineal Res*, 68(3), e12639. <https://doi.org/10.1111/jpi.12639>
- Schibler, U. (2020). Senescence of Timing Reverted: NAD⁺ Rejuvenates the Circadian Clock. *Molecular Cell*, 78(5), 805-807. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.05.010>
- Schulz, P., & Steimer, T. (2009). Neurobiology of circadian systems. *CNS Drugs*, 23 Suppl 2, 3-13. <https://doi.org/10.2165/11318620-000000000-00000>
- Seok, J. W., Kim, D., Yoon, B. K., Lee, Y., Kim, H. J., Hwang, N., . . . Kim, J. W. (2020). Dexras1 plays a pivotal role in maintaining the equilibrium between adipogenesis and osteogenesis. *Metabolism*, 108, 154250. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154250>
- Serin, Y., & Acar Tek, N. (2019). Effect of Circadian Rhythm on Metabolic Processes and the Regulation of Energy Balance. *Ann Nutr Metab*, 74(4), 322-330. <https://doi.org/10.1159/000500071>
- Sharma, V. K. (2003). Adaptive significance of circadian clocks. *Chronobiol Int*, 20(6), 901-919. <https://doi.org/10.1081/cbi-120026099>
- Shinohara, K., Tominaga, K., & Inouye, S. T. (1999). Phase dependent response of vasoactive intestinal polypeptide to light and darkness in the suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Res*, 33(2), 105-110. [https://doi.org/10.1016/s0168-0102\(98\)00122-9](https://doi.org/10.1016/s0168-0102(98)00122-9)
- Sorek, M., & Levy, O. (2012). The effect of temperature compensation on the circadian rhythmicity of photosynthesis in *Symbiodinium*, coral-symbiotic alga. *Scientific Reports*, 2(1), 536. <https://doi.org/10.1038/srep00536>
- Stenvers, D. J., Scheer, F., Schrauwen, P., la Fleur, S. E., & Kalsbeek, A. (2019). Circadian clocks and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol*, 15(2), 75-89. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0122-1>
- Stephan, F. K. (2002). The "other" circadian system: food as a Zeitgeber. *J Biol Rhythms*, 17(4), 284-292. <https://doi.org/10.1177/074873040201700402>
- Stephan, F. K., Swann, J. M., & Sisk, C. L. (1979). Anticipation of 24-hr feeding schedules in rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus. *Behav Neural Biol*, 25(3), 346-363. [https://doi.org/10.1016/s0163-1047\(79\)90415-1](https://doi.org/10.1016/s0163-1047(79)90415-1)
- Stoynev, A. G., Ikonov, O. C., & Stoynev, N. A. (2022). Suprachiasmatic hypothalamic nuclei (SCN) in regulation of homeostasis: a role beyond circadian control? *Biological Rhythm Research*, 53(8), 1226-1243. <https://doi.org/10.1080/09291016.2021.1920125>
- Stütz, A. M., Staszkievicz, J., Ptitsyn, A., & Argyropoulos, G. (2007). Circadian expression of genes regulating food intake. *Obesity (Silver Spring)*, 15(3), 607-615. <https://doi.org/10.1038/oby.2007.564>
- Takahashi, H., Umeda, N., Tsutsumi, Y., Fukumura, R., Ohkaze, H., Sujino, M., . . . Abe, M. (2003). Mouse dexamethasone-induced RAS protein 1 gene is expressed in a circadian rhythmic manner in the suprachiasmatic nucleus. *Molecular Brain Research*, 110(1), 1-6. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(02\)00543-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-328X(02)00543-0)
- Takahashi, H., Umeda, N., Tsutsumi, Y., Fukumura, R., Ohkaze, H., Sujino, M., . . . Abe, M. (2003). Mouse dexamethasone-induced RAS protein 1 gene is expressed in a circadian rhythmic manner in the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Mol Brain Res*, 110(1), 1-6. [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(02\)00543-0](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(02)00543-0)
- Takahashi, J. S. (2017). Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nat Rev Genet*, 18(3), 164-179. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.150>

- Takahashi, Y., Okamura, H., Yanaihara, N., Hamada, S., Fujita, S., & Ibata, Y. (1989). Vasoactive intestinal peptide immunoreactive neurons in the rat suprachiasmatic nucleus demonstrate diurnal variation. *Brain Res*, 497(2), 374-377. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)90283-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)90283-7)
- Takeichi, M., & Noda, Y. (1974). Light and electron microscope studies on the ventromedial hypothalamic nucleus of the cat, with special reference to the fine structures of neurons and synapses. *Folia Psychiatr Neurol Jpn*, 28(1), 45-64. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1819.1974.tb02285.x>
- Teo, W., Newton, M. J., & McGuigan, M. R. (2011). Circadian rhythms in exercise performance: implications for hormonal and muscular adaptation. *J Sports Sci Med*, 10(4), 600-606.
- Todd, W. D., Venner, A., Anaclet, C., Broadhurst, R. Y., De Luca, R., Bandaru, S. S., . . . Fuller, P. M. (2020). Suprachiasmatic VIP neurons are required for normal circadian rhythmicity and comprised of molecularly distinct subpopulations. *Nature Communications*, 11(1), 4410. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17197-2>
- Tran, L. T., Park, S., Kim, S. K., Lee, J. S., Kim, K. W., & Kwon, O. (2022). Hypothalamic control of energy expenditure and thermogenesis. *Experimental & Molecular Medicine*, 54(4), 358-369. <https://doi.org/10.1038/s12276-022-00741-z>
- Ueda, H. R., Chen, W., Adachi, A., Wakamatsu, H., Hayashi, S., Takasugi, T., . . . Hashimoto, S. (2002). A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature*, 418(6897), 534-539. <https://doi.org/10.1038/nature00906>
- Valdez, P. (2019). Circadian Rhythms in Attention. *Yale J Biol Med*, 92(1), 81-92.
- van der Horst, G. T., Muijtjens, M., Kobayashi, K., Takano, R., Kanno, S., Takao, M., . . . Yasui, A. (1999). Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature*, 398(6728), 627-630. <https://doi.org/10.1038/19323>
- Vaze, K. M., & Sharma, V. K. (2013). On the adaptive significance of circadian clocks for their owners. *Chronobiol Int*, 30(4), 413-433. <https://doi.org/10.3109/07420528.2012.754457>
- Vaziri, N. D., Dicus, M., Ho, N. D., Boroujerdi-Rad, L., & Sindhu, R. K. (2003). Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. *Kidney Int*, 63(1), 179-185. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00702.x>
- Vitaterna, M. H., Takahashi, J. S., & Turek, F. W. (2001). Overview of circadian rhythms. *Alcohol Res Health*, 25(2), 85-93.
- Waly, N. E., & Hallworth, R. (2015). Circadian Pattern of Melatonin MT1 and MT2 Receptor Localization in the Rat Suprachiasmatic Nucleus. *J Circadian Rhythms*, 13, 1. <https://doi.org/10.5334/jcr.ab>
- Wen, S., Ma, D., Zhao, M., Xie, L., Wu, Q., Gou, L., . . . Yan, J. (2020). Spatiotemporal single-cell analysis of gene expression in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Nat Neurosci*, 23(3), 456-467. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0586-x>
- White, A. T., & Schenk, S. (2012). NAD(+)/NADH and skeletal muscle mitochondrial adaptations to exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 303(3), E308-321. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00054.2012>
- Wilcox, A. G., Vizer, L., Parsons, M. J., Banks, G., & Nolan, P. M. (2017). Inducible Knockout of Mouse Zfh3 Emphasizes Its Key Role in Setting the Pace and Amplitude of the Adult Circadian Clock. *J Biol Rhythms*, 32(5), 433-443. <https://doi.org/10.1177/0748730417722631>
- Woelfle, M. A., Ouyang, Y., Phanvijhitsiri, K., & Johnson, C. H. (2004). The adaptive value of circadian clocks: an experimental assessment in cyanobacteria. *Curr Biol*, 14(16), 1481-1486. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.08.023>
- Woon, P. Y., Kaisaki, P. J., Bragança, J., Bihoreau, M. T., Levy, J. C., Farrall, M., & Gauguier, D. (2007). Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (BMAL1) is associated with susceptibility to hypertension and type 2 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(36), 14412-14417. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703247104>

- Xie, L., Kang, H., Xu, Q., Chen, M. J., Liao, Y., Thiyagarajan, M., . . . Nedergaard, M. (2013). Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science*, 342(6156), 373-377. <https://doi.org/10.1126/science.1241224>
- Xie, Y., Tang, Q., Chen, G., Xie, M., Yu, S., Zhao, J., & Chen, L. (2019). New Insights Into the Circadian Rhythm and Its Related Diseases [Review]. *Frontiers in Physiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00682>
- Yan, L., Takekida, S., Shigeyoshi, Y., & Okamura, H. (1999). Per1 and Per2 gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus: circadian profile and the compartment-specific response to light. *Neuroscience*, 94(1), 141-150. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(99\)00223-7](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(99)00223-7)
- Yaribeygi, H., Farrokhi, F. R., Butler, A. E., & Sahebkar, A. (2019). Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms. *J Cell Physiol*, 234(6), 8152-8161. <https://doi.org/10.1002/jcp.27603>
- Ying, W. (2007). NAD+ and NADH in brain functions, brain diseases and brain aging. *Front Biosci*, 12, 1863-1888. <https://doi.org/10.2741/2194>
- Zhao, D., Ma, G., Zhang, X., He, Y., Li, M., Han, X., . . . Dong, J. T. (2016). Zinc Finger Homeodomain Factor Zfx3 Is Essential for Mammary Lactogenic Differentiation by Maintaining Prolactin Signaling Activity. *J Biol Chem*, 291(24), 12809-12820. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.719377>
- Zhao, Z. D., Yang, W. Z., Gao, C., Fu, X., Zhang, W., Zhou, Q., . . . Shen, W. L. (2017). A hypothalamic circuit that controls body temperature. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(8), 2042-2047. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616255114>
- Zheng, G., Li, K., Bu, W., & Wang, Y. (2019). The Effects of Indoor High Temperature on Circadian Rhythms of Human Work Efficiency. *Int J Environ Res Public Health*, 16(5). <https://doi.org/10.3390/ijerph16050759>
- Zhou, Q. Y. (2006). The prokineticins: a novel pair of regulatory peptides. *Mol Interv*, 6(6), 330-338. <https://doi.org/10.1124/mi.6.6.6>

11. ANEXOS

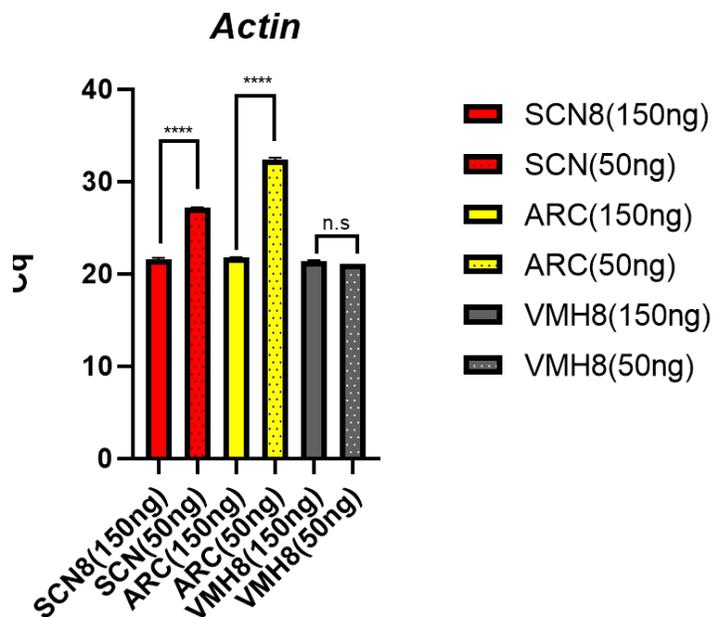


Figura S1. Resultados de qPCR para beta actina en las muestras del SCN, ARC y VMH. Los datos fueron sometidos a análisis estadístico mediante ANOVA de una sola vía. Las muestras del SCN y ARC exhibieron diferencias significativas en el valor de Cq mientras que para las muestras del VMH no se encontró un efecto significativo en la resolución al utilizar las dos distintas concentraciones. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

APÉNDICE A. Gelatinización de Laminillas

Preparación de la solución de gelatina:

- a. Se pesaron 1.25 g de gelatina (300 Bloom, tipo A) en un matraz o recipiente adecuado.
- b. Se añadieron 0.125 g de sulfato de potasio y cromo a la gelatina.

- c. Se agregaron 250 mL de agua destilada (ddH₂O) al recipiente con la gelatina y el sulfato de potasio y cromo.
- d. Se cubrió el recipiente con papel de aluminio para evitar la evaporación y contaminación.
- e. Se colocó el recipiente en un baño de agua con agitación y se calentó a 45°C mientras se agitaba suavemente hasta que la gelatina y el sulfato de potasio y cromo se disolvieron completamente.
- f. Una vez disuelta, se filtró la solución de gelatina para eliminar cualquier partícula o impureza presente.
- g. Se dejó enfriar la solución filtrada a temperatura ambiente.

Preparación de las laminillas:

- a. Se preparó una solución 1:1 de ácido acético glacial y etanol al 95% en un recipiente adecuado.
- b. Se sumergieron las laminillas de vidrio en la solución 1:1 de ácido acético glacial y etanol al 95% durante unos minutos para desengrasarlas y eliminar cualquier residuo.
- c. Se retiraron las laminillas de la solución desengrasante y se enjuagaron en dos baños de agua destilada, cambiando el agua frecuentemente para eliminar cualquier residuo químico o contaminante.

Gelatinización de las laminillas:

- a. Se sumergieron las laminillas en la solución de gelatina preparada durante 5 minutos, asegurándose de que estuvieran completamente cubiertas.
- b. Pasados los 5 minutos, se retiraron las laminillas de la solución de gelatina y se dejó que el exceso de líquido escurriera suavemente.
- c. Se colocaron las laminillas boca arriba en una superficie plana y se dejó que se secaran durante 24 horas a temperatura ambiente.

Nota: Durante el proceso de gelatinización de las laminillas, se manejaron con cuidado para evitar rayaduras o daños en la superficie. Además, se recomendó realizar este procedimiento en un ambiente limpio y libre de polvo para evitar contaminaciones indeseadas.

APÉNDICE B. Primers

Tabla S1. Secuencia de oligos utilizados para reacciones de qPCR.

Primer		Secuencia
<i>Agrp</i>	Rv	CAGAAGCTTTGGCGGAGGT
<i>Agrp</i>	Fw	AGGACTCGTGCAGCCTTACAC
<i>Avp</i>	Fw	GCTGCCAGGAGGAGAACTAC
<i>Avp</i>	Rv	AAAACCGTCGTGGCACTCG

B2m	Fw	GGTCTTTCTGGTGCTTGTCTCA
B2m	Rv	GTTCGGCTTCCCATTCTCC
Bactin	Fw	GGCTGTATTCCCCATCG
Bactin	Rv	CCAGTTGGTAACGCCATGT
Bmal1	Fw	CCAAGAAAGTATGGACACAGACAAA
Bmal1	Rv	GCATTCTTGATCCTTCCTTGGT
Cry1	Fw	CTGGCGTGGAAGTCATCGT
Cry1	Rv	CTGTCCGCCATTGAGTTCTATG
Cry2Fw	Rv	ACTGGTTCCGCAAAGGACTA
Cry2Rv	Fw	GGTCGAGGATGTAGACGCAG
DEXRAS1	Fw	CCACACAACCTGAGGACCTT
DEXRAS1	Rv	TTCACAGCAGGTGACTGTCC
Grpfor	Fw	GCCTCTCAGTCTCCAGCCTA
Grprev	Rv	GCAGTTCCTCCCTTTTCCTT
Nr1D1	Fw	GGGCACAAGCAACATTACCA
Nr1D1	Rv	CACGTCCCCACACACCTTAC
Per1	Fw	GTGCACAGCACCCAGTTCCC
Per1	Rv	ACCAGCGTGTCATGATGACATA
Per2	Fw	GGCTTCACCATGCCTGTTGT
Per2	Rv	GGAGTTATTTCCGAGGCAAGTGT
Pomc	Rv	CTGCTTCAGACCTCCATAGATGTG
Pomc	Fw	CAGCGAGAGGTCGAGTTTG
Prok2	Fw	CCCCCTGACTCGGAAAAGTC
Prok2	Rv	TCCTTAAACACGCCAAGCCT

<i>Prokr2</i>	Fw	GCAAGCCTCAACCAGAGCTA
<i>Rfx4For</i>	Fw	GGCATAGCGGTGAAGGAGAG
<i>Rfx4Rev</i>	Rv	AAAGTCTGGCAGCAATGTCC
<i>Sf1</i>	Fw	CTGTGCGTGCTGATCGAATG
<i>Sf1</i>	Rv	GGTCTCCAGCTTGAAGCCAT
<i>Six6For</i>	Fw	GTGGGCAACTGGTTCAAAAA
<i>Six6Rev</i>	Rv	AGATGTCGCACTCACTGTCTG
<i>Vip</i>	Fw	ACGAATCAGCAGCAGCATCT
<i>Vip</i>	Rv	CCCTCACTGCTCCTCTTTCC
<i>Vipr2</i>	Fw	GACGTTGGGGAAACTGTCAC
<i>Vipr2</i>	Rv	AGCCACACGCATCTATGAAA
<i>Zhfx3</i>	Fw	CCAATAGCCTGGAGAAGCTG
<i>Zhfx3</i>	Rv	AGTTGCACAGGACACAGTGG

APÉNDICE C. Dieta alta en grasas

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	Vitamins	
		Vitamin A, IU/g	5.2
Fat, %	34.9	Vitamin D-3 (added), IU/g	1.3
Cholesterol, ppm	301	Vitamin E, IU/kg	64.6
Linoleic Acid, %	4.70	Vitamin K (as menadione), ppm	0.65
Linolenic Acid, %	0.39	Thiamin Hydrochloride, ppm	7.8
Arachidonic Acid, %	0.06	Riboflavin, ppm	7.8
Omega-3 Fatty Acids, %	0.39	Niacin, ppm	39
Total Saturated Fatty Acids, %	13.68	Pantothenic Acid, ppm	19
Total Monounsaturated Fatty Acids, %	14.00	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.