



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**CONSECUENCIAS DE LA DESINCRONIZACIÓN
CIRCADIANA POR LUZ EN MAMÍFEROS: IMPACTOS EN
SISTEMAS METABÓLICOS**

TESINA

Que para obtener el título de
BIÓLOGA

PRESENTA

Elena Isabel Cantú Rivera

DIRECTOR DE TESINA

Dr. Manuel Miranda Anaya



Ciudad de México
2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Resumen

Los ritmos diarios en la luz y la temperatura son una variable inevitable que gobierna el ambiente en el que los seres vivos se desarrollan en la superficie del planeta. La fisiología de todos los seres vivos sobre la Tierra se ha alineado a los cambios rítmicos mediante la ayuda de un reloj biológico que ocurren a través de los ritmos circadianos, y el ser humano no es la excepción. Esta alineación ha servido como vía de adaptación a los cambios en el ambiente por su capacidad intrínseca fisiológica de anticipar los cambios esperados que son consecuencia del ciclo del día y la noche. Los ritmos circadianos en humanos se han visto afectados en las últimas décadas debido a los horarios irregulares que han sido favorecidos por avances tecnológicos y que rompen con los patrones naturales de la ritmicidad diarios de luz, temperatura, acceso al alimento y otros factores biológicos. Esta alteración en los horarios de actividad da lugar a un estado comprendido hoy día como desincronización circadiana, el cual se vincula con una mayor incidencia de enfermedades metabólicas; por lo que han sido de interés en la investigación biomédica básica en los últimos años. En este trabajo se resume y analiza la evidencia reciente que existe sobre el rol de los ritmos circadianos en el metabolismo y cómo este se ve afectado por patrones de desincronización circadiana. Finalmente, se propone un protocolo experimental para evaluar los efectos de la desincronización circadiana crónica en los tejidos periféricos y su posible afección metabólica.

Índice

Resumen	1
Índice	2
Tablas	4
PARTE I: GENERALIDADES DE LOS RITMOS CIRCADIANOS	9
Conceptos principales de los ritmos circadianos	9
Características principales de los ritmos circadianos	10
Ritmos circadianos en distintos grupos de seres vivos	16
Vía I	17
Vía II	18
Organización del sistema circadiano en mamíferos	20
El núcleo supraquiasmático (NSQ) es un marcapasos circadiano en mamíferos	21
Vía aferente del tracto retino hipotalámico	24
Proyecciones intrínsecas del NSQ	24
Proyecciones eferentes del NSQ	28
PARTE II: REGULACIÓN CIRCADIANA DEL METABOLISMO	29
Control circadiano a nivel celular	30
Control circadiano a nivel de tejidos y órganos	33
Ritmicidad sistémica metabólica	34
Ritmicidad circadiana de la glucosa	35
Control circadiano del control autonómico de la liberación de glucosa	38
Control circadiano de la homeostasis de la glucosa	40
Ritmicidad circadiana de los lípidos	42
Control celular de la homeostasis de los lípidos	42
Control hipotalámico de la síntesis de lípidos	43
Control circadiano de la homeostasis de los lípidos	44
Control circadiano de la termorregulación	48
PARTE III: DESINCRONIZACIÓN CIRCADIANA Y SUS EFECTOS EN EL METABOLISMO	49
Estudios experimentales de la desincronización circadiana	53

<u>Impacto del trabajo nocturno en la salud metabólica</u>	<u>54</u>
<u>Efecto de la intensidad de la luz durante la noche en la salud metabólica.....</u>	<u>55</u>
<u>Implicaciones en el metabolismo ocasionados por tiempos de comida irregulares.....</u>	<u>56</u>
<u>PROPUESTA DE PROTOCOLO EXPERIMENTAL EN LOS EFECTOS DE DESINCRONIZACIÓN CIRCADIANA</u>	<u>58</u>
<u>Conclusión.....</u>	<u>64</u>
<u>Referencias.....</u>	<u>65</u>

Figuras

[**Figura 1.** Ilustración de los parámetros de una oscilación ideal](#)

[**Figura 2.** Actograma de roedor](#)

[**Figura 3.** Curva de respuesta de fases \(PRC\)](#)

[**Figura 4.** Regla de Aschoff](#)

[**Figura 5.** Modelo de asa molecular de retroalimentación negativa en mamíferos](#)

[**Figura 6.** Modelo de asa molecular de retroalimentación positiva en mamíferos](#)

[**Figura 7.** A. Localización de NSQ en humanos. B. Generación de ritmos circadianos en osciladores periféricos en coordinación con el núcleo supraquiasmático](#)

[**Figura 8.** Redes del NSQ](#)

[**Figura 9.** Control circadiano de la mitocondria](#)

[**Figura 10.** Representación gráfica de las vías hipotálamicas que pueden estar involucradas en los efectos de retroalimentación hormonal en la captación sistémica de la glucosa](#)

[**Figura 11.** Representación de las vías eferentes simpáticas que conectan el cerebro de la rata con el hígado en el metabolismo de los lípidos](#)

[**Figura 12.** Efectos de la disrupción circadiana en el metabolismo en humanos](#)

[**Figura 13.** Metodología del protocolo de investigación de desincronización circadiana en *Neotomodon alstoni*](#)

Tablas

[**Tabla 1.** Resumen de las hormonas y gases sanguíneos que tienen una regulación circadiana junto con su función principal](#)

[**Tabla 2.** Efecto del sistema circadiano en el metabolismo en humanos](#)

Tabla de abreviaciones

MESOR	Estimador estadístico de la línea media del ritmo
NSQ	Núcleo supraquiasmático
TRH	tracto retino-hipotalámico
CT	Tiempo circadiano
ZT	Tiempo del zeitgeber
PRC	Curva de respuesta de fases
CCG	Genes controlados por reloj
CLOCK	Ciclos circadianos locomotores de salida kaput
BMAL	Receptor nuclear translocador de aril hidrocarburos en cerebro y músculo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
RRE	Elementos retinoicos de respuesta
DBP	Proteína de unión al sitio B
REV-ERB	Virus de eritroblastosis de reversa
ipCGR	Células ganglionares intrínsecamente fotosensibles en la retina
PACAP	Péptido pituitario neuroactivo adenilato-ciclasa
NPY	Neuropéptido Y
VIP	Polipéptido intestinal vasoactivo
CAR	Calretinina
GRP	Péptido liberador de gastrina

AVP	Péptido arginina vasopresina
GAD	Glutamato decarboxilasa
USF	Proteína histona lisina desmetilasa
ATP	Adenosín trifosfato
ROS	Especies reactivas de oxígeno
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
SIRT	Sirtulina
CPT	Carnitina palmitoil transferasa
FAO	Oxidación de ácidos grasos
NAMPT	Nicotinamida fosforibosil transferasa
PDT	Piruvato deshidrogenasa
CNS	Sistema nervioso central
AMPK	Proteína cinasa activadora de AMP
HIF	Factor inducible a hipoxia
GCK	Glucocinasa
GLUT	Glucotransportadores
GSK3	Glucógeno sintasa quinasa
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NRF	Factor nuclear eritroide
PKA	Proteína cinasa A
bZIP	Cierre básico de leucina

AMP	Adenosin monofosfato
PVN	Núcleo paraventral
ARC	Núcleo arqueado hipotalámico
POMC	Neuronas de proopiomelanocortina
GLU	Glutamato
SNS	Sistema nervioso simpático
3V	Tercer ventrículo
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
CoA	Coenzima A
ACLY	ATP citrato liasa
ACACA	Acetil CoA carboxilasa
ApoB	Apolipoproteína B
BAT	Tejido adiposo pardo
UCP	Proteína desacoplante
LH	Hipotálamo lateral
PPARs	Receptores activados por proliferador de peroxisomas
CK1α/ϵ	Caseína cinasa 1
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
USF1	Proteína histona lisina desmetilasa
SIRT	Sirtuina deacetilasa dependiente de NAD
GLUT	Receptor transportador de glucosa

NADPH Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NRF2 Factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide

PARTE I: GENERALIDADES DE LOS RITMOS CIRCADIANOS

Conceptos principales de los ritmos circadianos

Un ritmo es una forma de repetición constante en un determinado tiempo. La ritmicidad es una característica intrínseca en los fenómenos que ocurren en nuestro planeta que son consecuencia del movimiento de rotación donde se alternan periodos de luz y oscuridad y de temperatura por la incidencia de los rayos de luz solar sobre la superficie terrestre y que se repiten cada 24 horas. Las horas de luz respecto a las de oscuridad, y con ello la temperatura, se alternan con distinta duración según la localidad y época del año. Los ritmos circadianos son los cambios en la fisiología y conducta de un organismo en coordinación con los ritmos diarios del ambiente. Un ejemplo de un ritmo circadiano es el ciclo de sueño-vigilia que en humanos coincide con el periodo de luz-oscuridad, pero no depende de este completamente ya que en condiciones de completa oscuridad el ritmo circadiano sigue existiendo, por lo que tiene un mecanismo endógeno (Gumz, 2016).

La etimología de la palabra *circadiano* viene del latín *circa* (alrededor de) y *diem* (día), así que circadiano significa alrededor de un día. Una función biológica presenta ritmo circadiano cuando éste persiste independientemente del ritmo externo, pero se repite con una duración aproximada a un día. En el ejemplo anterior, la fase de sueño en animales se presenta aun cuando los sujetos se mantienen en completa oscuridad. En cronobiología esta condición de completa oscuridad permite ver el ritmo endógeno en libre curso (*free running*, en inglés) y nos muestra la duración de los ritmos circadianos regulada por el propio organismo; por ejemplo, el periodo del ritmo en libre curso del ciclo de actividad de un ratón dura cerca de 23.7 h, mientras que el de los humanos y ratas dura cerca de 24.2 h (Gumz, 2016), lo que significa que durante condiciones normales el ritmo circadiano de las funciones y actividades de los organismos vivos está sincronizado con estos fenómenos externos, y aunque existen procesos biológicos con ritmicidad variable (desde segundos hasta años), los ciclos circadianos son los de interés para este trabajo.

Antes de comenzar a ahondar en las características propias de los ritmos circadianos, es importante definir algunos conceptos:

La Figura 1 ilustra los parámetros de una oscilación en donde se representa una alternancia de fases de luz y oscuridad (representadas con barras blancas y negras respectivamente). Cada fase dura 12 horas y el periodo de oscilación dura 24 horas. También se ilustran otros parámetros necesarios como referencia para el estudio de los ritmos circadianos: el periodo es el parámetro que indica el tiempo que tarda en repetirse un ciclo. La acrofase es el punto más alto de la variable. La batifase es el punto más bajo. La amplitud del ritmo es el cambio en la intensidad de la variable osciladora desde su media a su cresta o desde su mesor a su acrofase en que sucede la mayor amplitud del ritmo cuando se trata de un ajuste matemático de la oscilación. El MESOR (Midline Estimating Statistic of Rhythm por sus siglas en inglés) es la tendencia media central de los valores del ritmo ajustados a la curva coseno (Garaulet et al., 2013). La amplitud también puede considerarse desde el punto más bajo hasta el punto más alto de la curva, en función de la magnitud original de la variable.

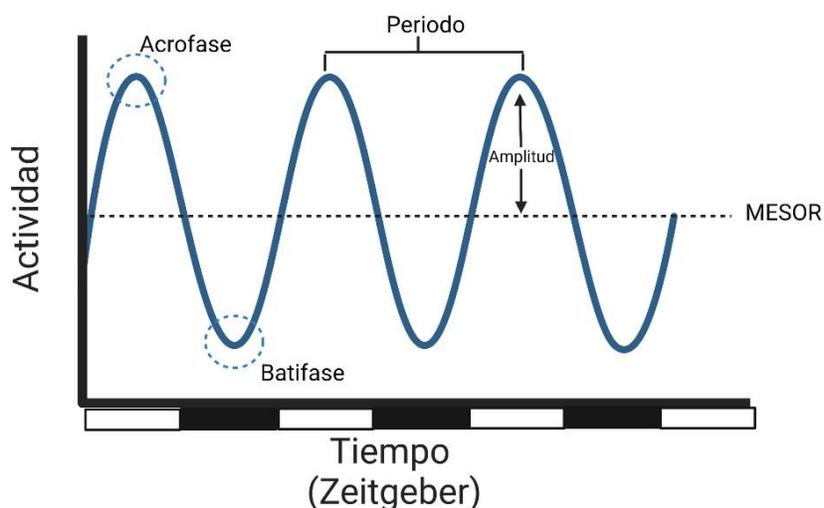


Figura 1. Ilustración de los parámetros de una oscilación modelo. Las barras indican un ciclo externo al cual está sincronizada la oscilación. Creado en Biorender.com

Características principales de los ritmos circadianos

Los ritmos biológicos son patrones que existen en múltiples procesos biológicos como la división celular, la excreción de electrolitos, los cambios en la frecuencia cardíaca y presión arterial, los cambios en los niveles de muchas hormonas. Esto implica que la homeostasis regulada por los ritmos circadianos sea predictiva además de reactiva, lo cual confiere una ventaja ante factores externos. La homeostasis circadiana sienta las bases de la regulación

para optimizar los procesos fisiológicos y de esta manera, se encarga de regular procesos diarios para guardar la energía necesaria para responder ante estímulos externos impredecibles (Gumz, 2016). Los ritmos circadianos se caracterizan por tres rasgos fundamentales: son endógenos, se sincronizan con el ambiente y compensan la temperatura.

Característica de endogeneidad

Los ritmos circadianos son independientes de la ritmicidad en los ciclos externos. Esto significa que si quitamos del ambiente el ritmo de luz-oscuridad, el ritmo circadiano de sueño-vigilia, por ejemplo, seguirá existiendo. Esta característica solo se puede observar en condiciones experimentales, pues por lo general no se pueden evitar los factores cíclicos ambientales como el ciclo de luz-oscuridad fuera de un laboratorio (a excepción de algunos ambientes extremos).

Los primeros descubrimientos de la endogeneidad de los ciclos circadianos vinieron a través de los experimentos realizados en 1729 por Jean-Jacques de Mairan con la planta *Mimosa pudica* que tiene la característica de cerrar sus hojas y pedúnculos aproximadamente a la misma hora todos los días, que en este caso coincidía con el atardecer (revisado en Migliori, 2012). Jean-Jacques de Mairan descubrió que el movimiento de las hojas no tenía que ver con la luz solar, pues al dejarlas en completa oscuridad por días se seguía observando estos movimientos. Fue así como se descubrió la evidencia de la endogeneidad de los ritmos circadianos. Posteriormente en el año de 1819 Augustine Pyramus de Candolle contribuyó al trabajo de Mairan con sus observaciones en el periodo de libre curso de *M. púdica*; de Candolle notó que durante el tiempo en el que la planta estaba expuesta a constante oscuridad, el periodo en el que abría y cerraba sus hojas era entre 22 y 23 horas, menos de lo que dura el periodo externo diario de 24 horas y concluyó que, aunque existe un “reloj interno” en la planta, este debe estar coordinado con los ciclos externos de luz-oscuridad que duran aproximadamente 24 horas ya que cuando no está expuesta a estas condiciones el periodo se ve acertado.

Para observar los ciclos circadianos sincronizados con los ciclos externos y el libre curso en condiciones constantes es común utilizar una representación gráfica conocida como actograma, la cual representa gráficamente las fases de actividad y descanso de un organismo a lo largo de un tiempo previamente definido (Sheredos et al., 2016). En la Figura, 2 se ilustra

el actograma del ritmo de actividad locomotriz de un roedor nocturno, en el cual se muestran periodos de actividad cuando las luces están apagadas y periodos de descanso cuando se encienden las luces (sombreado amarillo). Para evaluar el ritmo circadiano de sueño-vigilia del roedor, se le dejó en una condición de oscuridad constante (O:O). El ritmo circadiano de actividad y reposo se muestra independientemente de la falta de luz, pero el bloque de actividad empieza antes de lo esperado conforme va pasando el tiempo, debido a que este ritmo circadiano tiene una duración aproximada de, 23.7h (Gumz, 2016). Este recorrido hacia la izquierda de la actividad indica que está adelantando la fase de vigilia del organismo. Cuando los ciclos circadianos duran más de 24 horas el actograma mostrarían un recorrido hacia la derecha en condiciones constantes.

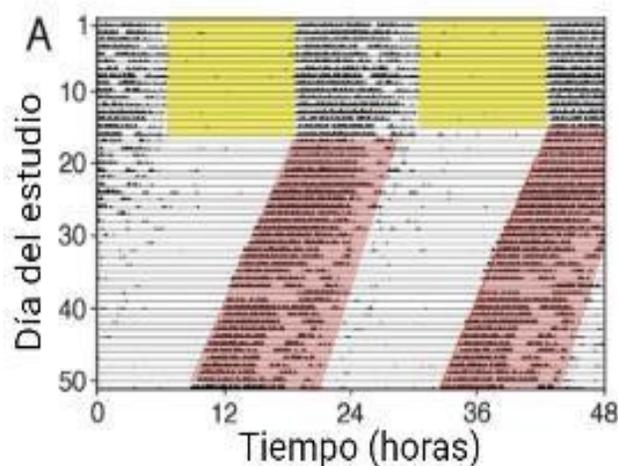


Figura 2. Actograma de roedor. Cada fila muestra 48 horas continuas y los días están apilados uno sobre otro. Las manchas negras muestran actividad y los espacios en blanco muestran descanso. El sombreado amarillo indica el tiempo en el que las luces estuvieron encendidas, es decir que estuvieron expuestos a 12h de luz y 12 horas de oscuridad (12L:12O h) por tres semanas y posterior mente se le dejó en oscuridad constante (O:O). La franja roja indica la fase activa que se genera endógenamente en el animal (modificado de Gumz, 2016).

Característica de sincronización

Los ritmos circadianos presentan una sincronización con los fenómenos diarios del ambiente. Esto quiere decir que los ritmos circadianos se alinean a ciclos del día y la noche como es el caso de la liberación circadiana de melatonina que coincide con el inicio de la fase de oscuridad, lo que induce el ciclo de sueño en muchos organismos diurnos (Zisapel, 2018). La sincronización con los ciclos externos permite también una sincronización interna de

procesos fisiológicos ante factores ambientales, lo que da lugar a la optimización de funciones, y la anticipación ante eventos que generan cambios temporales en la fisiología en respuesta a estos (Aguilar 2015; Gumz, 2016).

En mamíferos el centro encargado de coordinar los ritmos circadianos es el núcleo supraquiasmático (NSQ), la sincronización con los ciclos de luz y oscuridad se da a través de la interacción del tracto retino-hipotalámico (TRH) del nervio óptico con el NSQ, que se explicará más adelante. En la naturaleza, los ciclos circadianos coinciden con los ciclos externos. A los ciclos externos que actúan como sincronizadores de un ritmo circadiano se les denomina *Zeitgeber* (del vocablo alemán *Zeit*: tiempo, *Geber*: dador; Turek, 2013). Aunque el *Zeitgeber* más importante es el ciclo de luz-oscuridad, hay otros ciclos externos que actúan como sincronizadores secundarios como los horarios de comida, el ejercicio físico, el sueño y las interacciones sociales.

En condiciones de oscuridad constante un ritmo circadiano se manifiesta en libre curso y su periodo no se asocia a los ritmos de luz-oscuridad externos. Bajo estas condiciones las unidades de tiempo en un ciclo se representan como tiempo circadiano (CT) o tiempo interno del reloj biológico, por lo que el CT no será el mismo que el tiempo del *zeitgeber* (ZT) (Sehgal, 2004). Cuando se hacen experimentos en O:O, CT=0 corresponde al momento en el que comenzaría el día (día subjetivo) y CT=12 cuando comenzaría la noche (noche subjetiva). Debido a la estrecha relación entre el ciclo de luz-oscuridad y los procesos endógenos se considera la conducta asociada al inicio de la fase de luz como punto de referencia del inicio del tiempo circadiano (CT=0). En animales nocturnos se esperaría ver actividad durante la noche subjetiva (comenzando en CT=12) y descanso de actividad durante el día subjetivo (CT=0) (Koukkari y Sothorn, 2006).

Para entender la respuesta de un ritmo en libre curso ante un *zeitgeber* se han propuesto modelos que representan esta relación de estímulo-respuesta como el modelo de sincronización continua y el de sincronización discreta. El modelo de sincronización discreta se puede comprender mejor mediante la curva de respuesta de cambios de fase que usualmente representa los cambios en la fase de inicio de la actividad circadiana de organismos ante un estímulo lumínico (Aguilar, 2015). En la Figura 3 se muestra la gráfica de la curva de respuesta de fases con sus tres zonas características:

- Zona muerta (en verde): ocurre durante el día subjetivo y está caracterizada por la falta de respuesta a la luz, por lo que la fase de actividad observada después del pulso de luz ocurre en el momento esperado.
- Zona de retraso (en rojo): ocurre temprano en la noche subjetiva y está caracterizada por retrasos de fase, cuando la actividad después del pulso de luz ocurre después de lo esperado.
- Zona de avance (en azul): cuando la actividad después del pulso de luz ocurre antes de lo esperado.

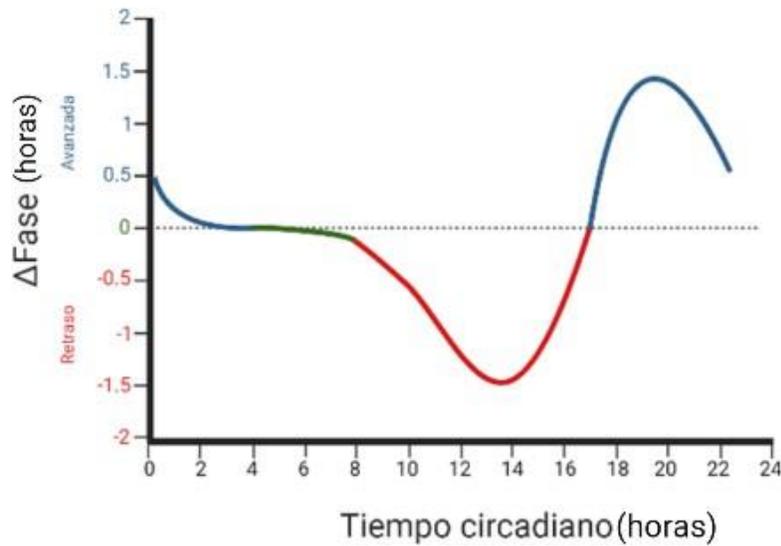


Figura 3. Curva de respuesta de fases (PRC), modificado de Aguilar, 2015.

La sincronización paramétrica implica una acción constante de la luz sobre la velocidad del periodo del ritmo y este efecto varía según su intensidad y la hora del día. Los estudios realizados por Jürgen Aschoff (1960) han mostrado evidencia de una relación lineal entre el periodo del ritmo circadiano y el logaritmo de la intensidad de luz: específicamente, el aumento de la intensidad de luz en condiciones de iluminación constante o L:L acorta el periodo circadiano de animales diurnos y alarga el periodo en los animales nocturnos. Aunque hay algunas excepciones, la mayoría de los animales siguen este fenómeno también considerado una de las reglas de Aschoff y que se ve representado en el valor del periodo graficado en la Figura 4.

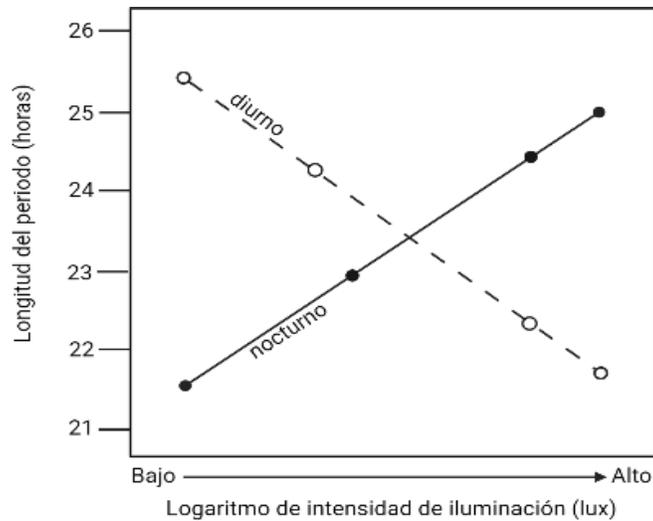


Figura 4. Regla de Aschoff,. Se observa un aumento en la longitud de periodo a medida que la intensidad de luz aumenta en animales nocturnos y una disminución de este en animales diurnos (modificado de Koukkari y Sothorn, 2006).

Característica de compensación de la temperatura

Finalmente, el periodo de los ritmos circadianos se afecta muy poco si se observa a distintas temperaturas constantes. Aunque toda actividad enzimática depende de la temperatura para acelerar o disminuir la velocidad de reacción, existen mecanismos regulatorios que evitan que los cambios en la temperatura afecten drásticamente los ciclos circadianos, lo que se considera una compensación de los efectos de la temperatura (Aguilar, 2015; Gumz, 2016).

Ritmos circadianos en distintos grupos de seres vivos

Los ciclos circadianos tienen un origen genético que difiere entre taxas. Existe una oscilación de expresión génica a nivel celular como resultado de asas de retroalimentación de transcripción y traducción, que permiten inhibir su propia transcripción generando ritmicidad alrededor de las 24 horas, junto con una cascada de eventos transcripcionales y postrcripcionales que involucran cientos de genes blanco o también llamados “genes controlados por reloj” (Turek, 2005; Partch, 2014).

Aunque inicialmente se creía que los ritmos circadianos solo existían en células eucariotas, desde 1990 se ha observado la existencia de ellos en cianobacterias. Debido a su peculiar característica de ser fijadoras de nitrógeno y organismos fotosintéticos, se ha demostrado que

estos procesos están separados temporalmente, por lo que hay una oscilación de enzimas fotosintéticas y fijadoras de nitrógeno en condiciones de total oscuridad (Sehgal, 2004).

Otros organismos más complejos también han sido estudiados para evaluar el componente molecular de los ciclos circadianos. La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* fue el primer organismo en el que se realizó análisis genético de los mecanismos de reloj circadiano y que fueron de gran importancia para entender los mecanismos en mamíferos, pues comparten homología en diversos genes de reloj. Los genes de reloj más estudiados en *D. melanogaster* son los genes *Per* y *Tim*, que producen ritmos en la actividad locomotora. El gen *Per*, llamado así por su importancia en el periodo del ritmo, el gen *Tim* lleva ese nombre por la palabra “atemporal” (en inglés Timeless) y expresa la proteína TIM, la cual trabaja de manera conjunta con PER para controlar su expresión y la acumulación y oscilación del heterodímero PER/TIM. Además, en *D. melanogaster* se han estudiado los genes *Cry*, denominados de esta manera por su homología con fotorreceptores criptocromos en plantas, que tiene función de fotorreceptor circadiano (revisado en Mullington, 2003).

Los genes más importantes que comparten los mamíferos con *D. melanogaster* son los genes *Per* (*Per1*, *Per2* y *Per3*), y dos genes *Cry* (*Cry1* y *Cry2*). Aunque no se ha mostrado la presencia de *Tim* en mamíferos, existen otros genes ortólogos, poner ejemplos, que tienen roles de reloj en este grupo de seres vivos (Mullington, 2003).

Los componentes principales que se han identificado en el reloj circadiano de los mamíferos se pueden dividir en dos asas moleculares principales:

Vía I

En esta vía, ilustrada en la figura 5, los factores de transcripción CLOCK (Circadian locomotor output cycles kaput) y BMAL1 (Brain and muscle ARNT-like protein 1) forman un dímero y se unen a una región de ADN llamada E-box para promover la expresión de los genes *Per*, *Cry* y *Ccg* (Clock controlled genes), que posteriormente se traducirán en proteínas PER, CRY y CCG. Los Ccg cumplen con funciones de salida las cuales están controladas por señalizaciones celulares del reloj dependientes de señales internas y externas. La regulación de los Ccg está sujeta a la regulación del reloj en todos los niveles: transcripcional, post transcripcional, traduccional y post traduccional y estos tienen funciones específicas

sobre el tejido en el que se encuentran. En el citoplasma, estas proteínas se unen en heterodímeros y posteriormente son fosforiladas por la enzima CK1 α/ϵ para poder volver a atravesar la membrana nuclear y cumplir su función como represor de la actividad de CLOCK y BMAL1. A este proceso de disminución de la actividad de sus propios genes se le conoce como asa de retroalimentación negativa (Turek, 2005).

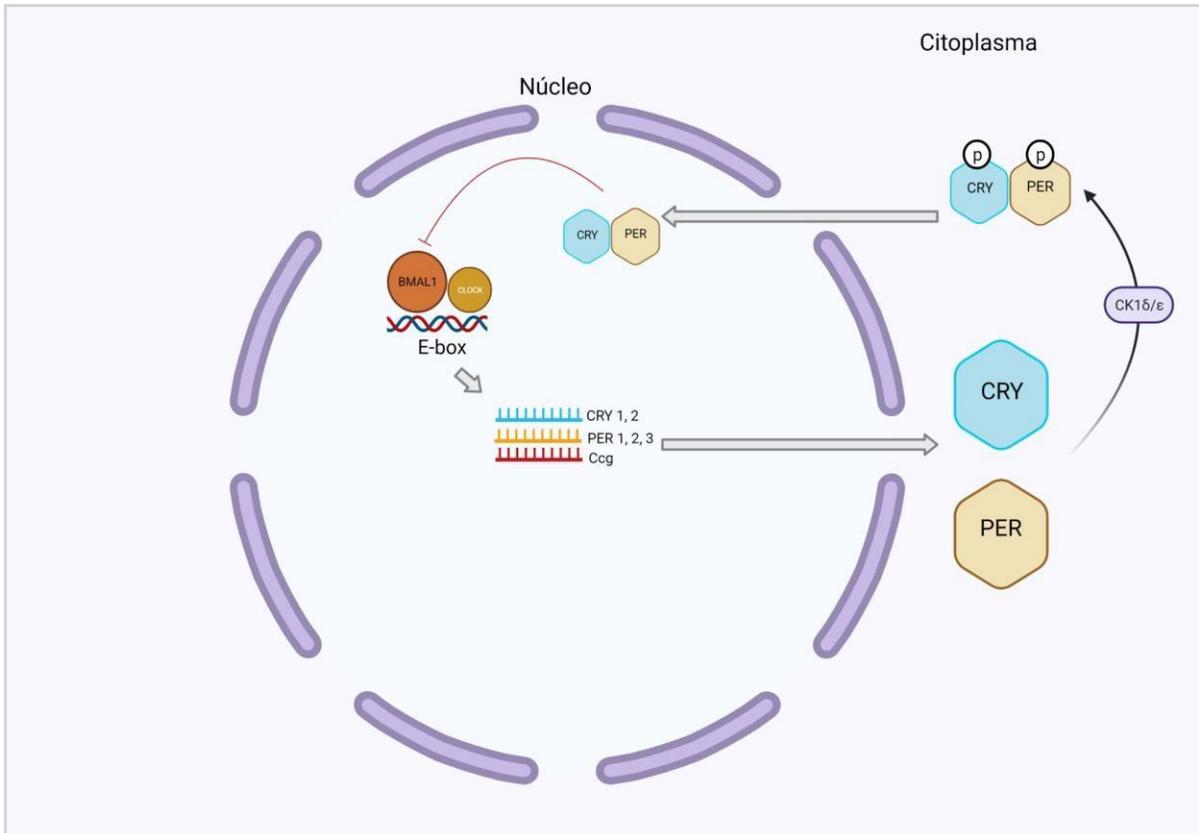


Figura 5. Modelo de asa molecular de retroalimentación negativa en mamíferos. Los factores de transcripción BMAL1 y CLOCK se unen a una región de ADN específica llamada E-box para la transcripción de las proteínas CRY, PER y CCG las cuales salen del núcleo celular. PER y CRY forman dímeros y vuelven a entrar al núcleo para controlar su propia expresión. Creado con Biorender.com

Vía II

En esta vía, ilustrada en la Figura 6, la regulación de la transcripción de BMAL1 se lleva a cabo desde que la unión de BMAL1 y CLOCK a la E-box, de los genes *Dbp* (D- site binding protein), *Rev-erb* α y β (Reverse erythroblastosis virus). La proteína REVERB funciona como inhibidor de la expresión de BMAL1, mientras que la proteína DBP actúa como factor

de transcripción uniéndose a otra región del ADN llamada D-box, la cual promueve la expresión del gen *Ror* α , β y γ (Retinoid-related orphan receptor). La proteína ROR se une a su vez a los elementos retinoicos de respuesta del ADN (RRE) y promueve la expresión del gen *Bmal1*, por lo que ROR es importante para reiniciar el asa de expresión rítmica de BMAL1. Finalmente, la unión de ROR con REVERB forma un complejo que se une a RRE para promover la expresión de *Nfil3* (Nuclear factor interleukin-3-regulated protein), la cual inhibe la expresión de ROR (Turek, 2005).

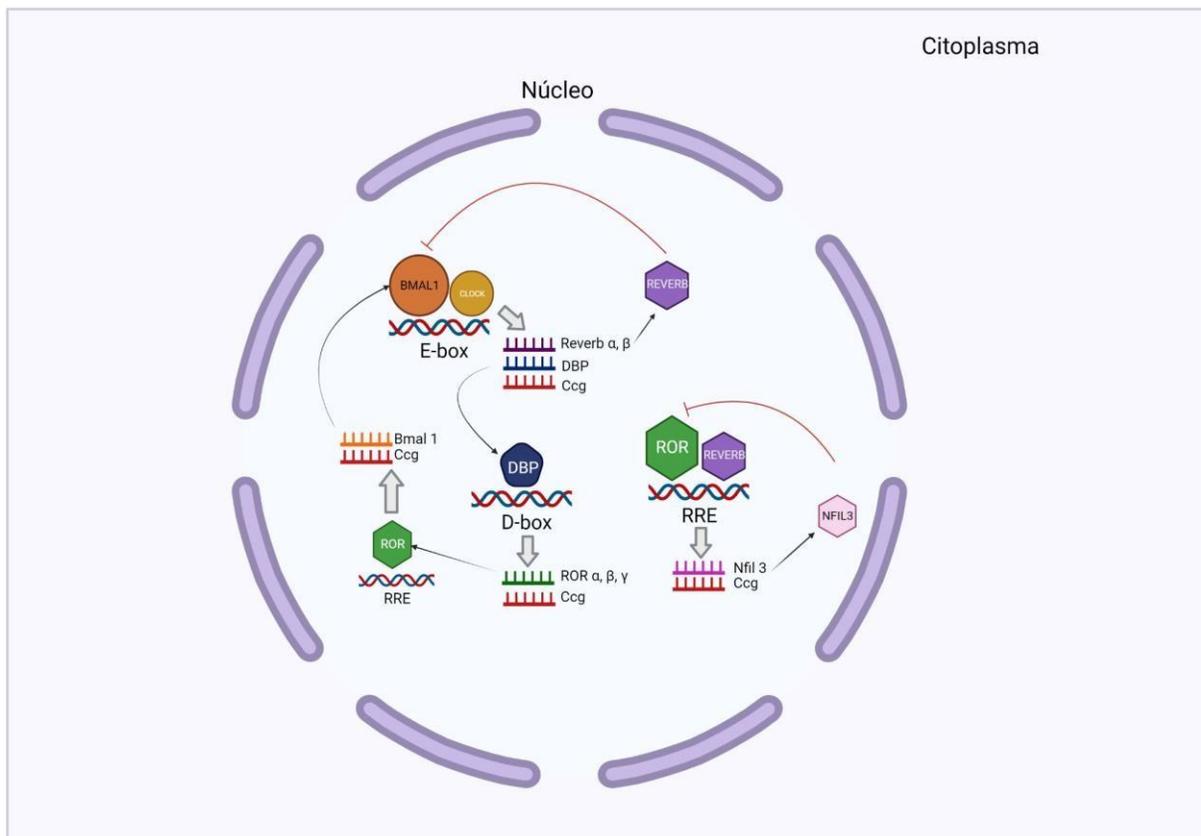


Figura 6. Modelo de asa molecular de retroalimentación positiva en mamíferos. Los factores de transcripción BMAL1 y CLOCK se unen a la E-box para transcripción de las proteínas REVERB, DBP y CCG. REVERB controla directamente la actividad de BMAL1, mientras que DBP se une a la región D-box para la transcripción de ROR y CCG. ROR se une a la región RRE para controlar la transcripción de BMAL1, pero también puede unirse REVERB y juntos controlan la transcripción de NFIL3, la cual controla directamente la expresión de ROR. Creado en Biorender.com.

Los ciclos circadianos se han estudiado en una gran variedad de organismos, desde cianobacterias hasta plantas, hongos y animales. Estos sistemas parecen haberse desarrollado de manera independiente en los diferentes *Phyla* de organismos y existen las semejanzas según la cercanía filogenética. Las presiones de la selección natural de los ciclos de día y de noche han dado lugar a que los mecanismos de ritmicidad entre distintos organismos consisten en asas de retroalimentación para la expresión génica, aunque los genes participantes pueden variar entre especies, la regulación molecular de los ciclos circadianos presenta una convergencia evolutiva entre grupos de seres vivos (Turek, 2005).

Organización del sistema circadiano en mamíferos

Un oscilador es una estructura capaz de crear cambios periódicos en un medio interno. Existen dos tipos de osciladores circadianos: el oscilador central, que rige los ritmos circadianos, y los osciladores periféricos, que se encuentran en distintos tejidos del organismo y que son sincronizados por la actividad del oscilador central, aunque en ambos cada célula individual actúa como oscilador circadiano autónomo (Turek, 2005).

El oscilador central (también llamado reloj central o marcapasos circadiano) es una estructura distinta en los diferentes grupos de seres vivos, pero en todos cumplen la característica de modular los procesos biológicos con cierta ritmicidad. Esta modulación es distinta entre diferentes animales, por ejemplo, en los nocturnos la ritmicidad de algunos procesos circadianos será en un tiempo circadiano que no coincide con los animales que son diurnos. En condiciones de oscuridad constante los animales nocturnos tienen periodos menores a 24 horas, mientras que los animales diurnos tienen periodos generalmente mayores a 24 horas, aunque existen excepciones. La estructura particular de los osciladores centrales varía de acuerdo con la especie. En vertebrados hay estructuras complejas que funcionan como reloj central como la glándula pineal en aves y reptiles y el NSQ en mamíferos, las rutas de información hacia el NSQ se entienden como vías aferentes y la ruta de información desde el NSQ hacia otras estructuras se entiende como vía eferente (Logan, 2019).

En mamíferos este reloj maestro, oscilador central o marcapasos circadiano (nombres utilizados indistintamente en la literatura científica) es el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo (Figura 7-A), y se conforma por dos grupos de neuronas en forma de núcleos pequeños localizados en el hipotálamo anterior a los lados del tercer ventrículo en posición dorsal al quiasma óptico, de donde reciben información de los ciclos externos de luz-oscuridad a través del tracto retino-hipotalámico (TRH) (Garaulet et al., 2013). En ratones, cada núcleo contiene aproximadamente 10,000 neuronas en dos subdivisiones anatómicas, la médula y la corteza. Los cuerpos neuronales en el NSQ son pequeños (aproximadamente 10 μm) y tienen proyecciones dendríticas simples. En la mayoría de las neuronas los neuropéptidos están co-localizados con el neurotransmisor ácido gamma-aminobutírico (GABA), aunque algunas células pueden ser glutamatérgicas. La anatomía del NSQ varía considerablemente entre especies y es mucho más compleja de lo sugerido con la división sencilla de médula y corteza (Welsh et al., 2010).

El núcleo supraquiasmático (NSQ) es un marcapasos circadiano en mamíferos

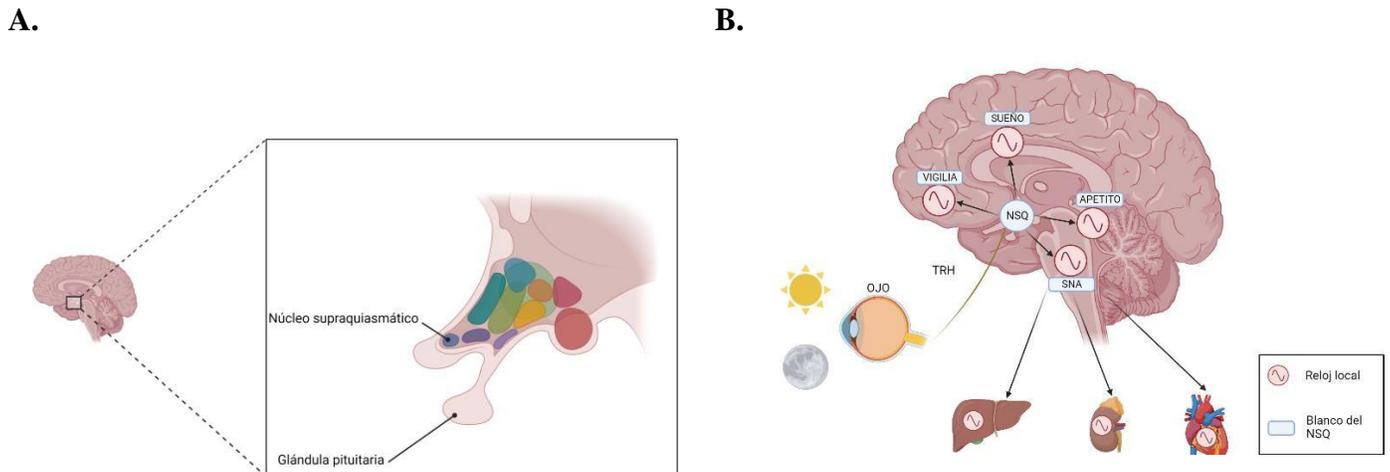


Figura 7. A. Localización de NSQ en humanos. B. Interacción de ritmos circadianos en osciladores periféricos en coordinación con el núcleo supraquiasmático (modificado de Hastings et al., 2018). Creado en Biorender.com

La señal del tiempo circadiano generada por el reloj molecular tiene que ser traducida a un tipo de señal que pueda ser de uso para el resto del organismo (Figura 7-B), en este caso esa señal se traduce como un patrón de disparos de espigas y liberación de neurotransmisores por parte de las neuronas del NSQ las cuales producen altas frecuencias de potenciales de acción y mayor resistencia a la entrada de moléculas durante el día subjetivo que durante la noche subjetiva (Aguilar, 2015). Las neuronas producen péptidos pequeños que son liberados de las terminales axónicas, pero estos no son liberados necesariamente en las hendiduras sinápticas. Esto genera que sus efectos dependan de la localización de sus receptores en los órganos diana. Por lo general, los péptidos y neurotransmisores son liberados simultáneamente de las terminales axónicas, interactúan con sus receptores, y los péptidos son metabolizados por peptidasas que tienen efectos postsinápticos similares a los neurotransmisores, pero con mecanismos más complejos y prolongados (Moore, 2013).

Aunque los tejidos en órganos de mamíferos muestran ritmos circadianos a través de la expresión cíclica de genes controlados por reloj (Balsalobre et al. 1998), estos ritmos pueden ser regulados por otros ritmos internos como la temperatura corporal, la actividad de hormonas (como corticoesteroides o melatonina), el consumo de alimentos o directamente de la inervación autonómica, que son señales a su vez reguladas por el NSQ vía el sistema nervioso periférico y el eje neuroendocrino del hipotálamo-hipófisis, modulando así a distintos ritmos fisiológicos y conductuales (Gumz, 2016).

El análisis de la organización del NSQ puede ser evaluada en tres contextos: (1) por localización; las proyecciones aferentes al NSQ tienen estrecha relación fótica con los axones del TRH y con aferencias no fóticas desde diversos núcleos hipotalámicos que regulan aspectos fisiológicos homeostáticos. (2) por su organización neuronal como una red interna que se da por sus proyecciones intrínsecas, entre una zona de corteza dorsal y una medular ventral en cada núcleo. (3) por un componente de una red funcional (sistema de tiempo circadiano) por sus proyecciones aferentes neuroendocrinas y por la retroalimentación de estas para su propia regulación (Moore, 2013).

Vía aferente del tracto retino hipotalámico

El TRH termina en el centro retino receptor en la parte ventral de NSQ (Hastings et al., 2018) y es la vía aferente más importante del NSQ. Está formado por los axones de una subpoblación de células ganglionares intrínsecamente fotosensibles en la retina (ipCGR) que contienen el fotorreceptor melanopsina, el cual no está presente en los fotorreceptores conos y bastones especializados para la visión. La melanopsina causa despolarización en respuesta a la luz y resulta en la liberación de glutamato y del péptido liberador del péptido pituitario neuroactivo adenilil-ciclasa (PACAP) en el NSQ. Debido a esto, el TRH no está involucrado en la formación consciente de imágenes y funciona independientemente de la visión, permitiendo que organismos ciegos se mantengan sincronizados con el ciclo ambiental de luz-oscuridad mientras haya fotosensibilidad en las ipCGR (Hastings et al., 2018).

Existen otras vías aferentes de señalización no fóticas asociadas con la excitación conductual mediadas principalmente por neuropéptido Y (NPY), dopamina y serotonina provenientes del tálamo, mesencéfalo y tallo cerebral respectivamente (Hastings et al., 2018).

Proyecciones intrínsecas del NSQ

Las neuronas del NSQ son predominantemente GABAérgicas, pero también expresan un gran rango de neuropéptidos y receptores que median la entrada de vías aferentes y eferentes internas. Estas propiedades neuropeptídicas de las neuronas pueden usarse para subdividirse en dos regiones: la médula ventral y la corteza dorsal.

Las neuronas de la médula presentan distintos neuropéptidos como el polipéptido intestinal vasoactivo (VIP), que conforma aproximadamente el 10% de las neuronas de la médula, calretinina (CAR, ~9%), neurotensina (~7%) y péptido liberador de gastrina (GRP) que representa aproximadamente el 5% de las neuronas de esta zona (Hastings et al., 2018). Estas neuronas se proyectan hacia la corteza, la médula contralateral y un grupo selecto de áreas efectoras (Moore, 2013). La corteza está delineada por neuronas que se caracterizan por expresar péptido arginina vasopresina (AVP; ~20%), angiotensina II (~10%), y met-enkefalina (~5%) y reciben entrada del hipotálamo, cerebro anterior, áreas límbicas y

corticales, tálamo y tallo cerebral (Welsh et al., 2010; Moore, 2013), mientras que proyectan a amplias áreas efectoras cerebrales y provee a la región ventral de retroalimentación de las vías. Se considera a esta región como la región osciladora más fuerte del NSQ (Hastings, 2018; Figura 8).

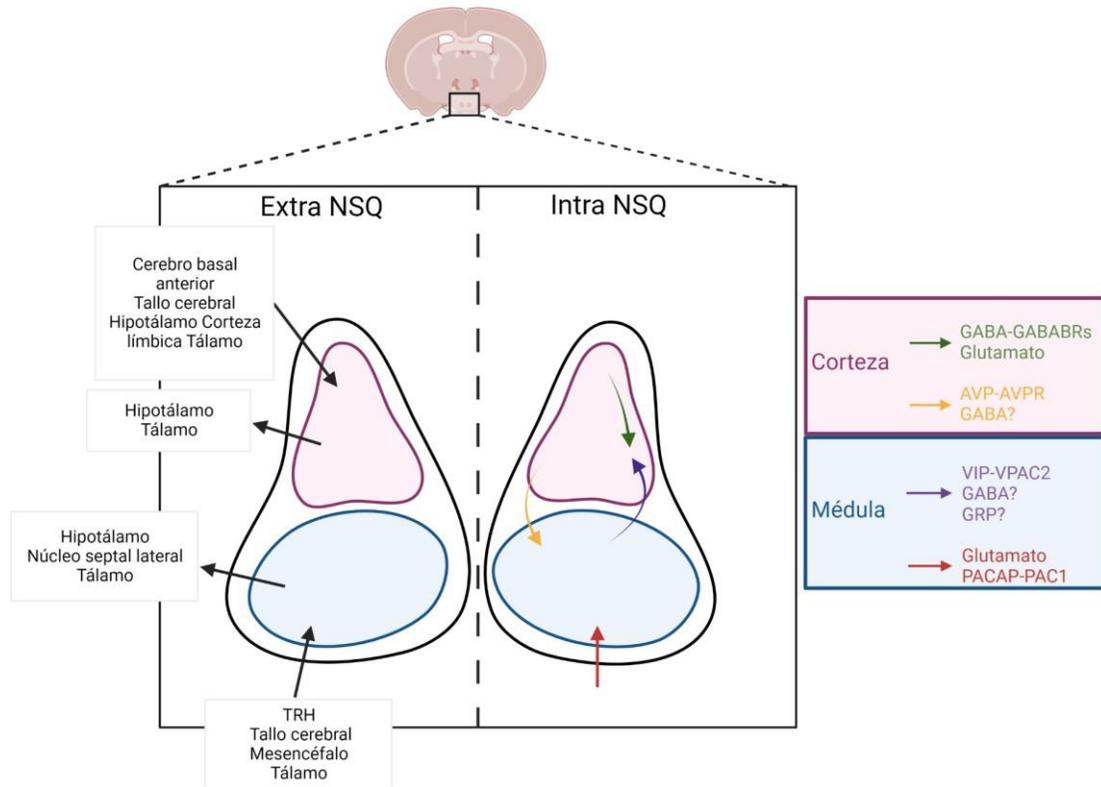


Figura 8. Redes del NSQ. Vista esquemática de las proyecciones aferentes y eferentes (izquierda) junto a señales dentro del NSQ (derecha) y sus subdivisiones anatómicas (modificado de Hastings et al., 2018). Creado en Biorender.com

Hastings et al. ha estudiado distintas pruebas farmacológicas que revelan una jerarquía de neuropéptidos en donde VIP es el neuropéptido de mayor importancia, seguido por AVP y finalmente GRP como el neuropéptido menos relevante para mantener los circuitos circadianos dentro del NSQ. Estos ejes neuropeptídicos pueden ser específicos a comportamientos circadianos programados al controlar vías aferentes particulares del NSQ (Hastings et al., 2018).

La neurotransmisión GABAérgica juega un papel importante en los cambios de fase

inducidos por luz, en los cambios de fase no fóticos y en la sincronización dorsal y ventral del NSQ (Aguilar, 2015). Además, se ha propuesto que su neurotransmisión modula la vía de entrada retinal al NSQ (Jiang et al., 1995), sincroniza patrones de disparo de corto plazo entre neuronas del NSQ (Kononenko y Dudek,

2004; revisado en Hastings et al., 2018), patrones de disparo circadianos (Liu y Reppert, 2000; Shirakawa et al., 2000), y regula la amplitud de los ritmos circadianos (Wagner et al., 2001; Aton et al., 2006). A su vez, el reloj circadiano regula la fuerza de la neurotransmisión de GABA y su efecto en las neuronas de NSQ modulando la síntesis de su receptor (Aguilar, 2015). Aun así, el papel de señalización de GABA es un enigma ya que, aunque es el neurotransmisor más importante y se conocen sus vías de señalización ionotrópicas y metabotrópicas, no se observa una disrupción en la función de NSQ cuando se interrumpe su transmisión (Hastings et al., 2018). Se cree que su importancia podría venir de su interacción con células de la glía, ya que estas constituyen una tercera parte del NSQ. Los astrocitos en el NSQ son un tipo de célula glial que mantiene las condiciones ambientales y de soporte para las células nerviosas, los cambios circadianos en su morfología alteran la comunicación entre neuronas, posiblemente regulando la actividad del TRH en su unión con el NSQ. Finalmente, el incremento de la actividad de los astrocitos en la noche subjetiva puede ser un controlador principal de las elevaciones nocturnas extracelulares de glutamato, lo que puede llevar a los ciclos circadianos de GABA que facilitan la hiperpolarización nocturna del circuito neuronal (Hastings et al., 2018).

La vía de entrada al NSQ consta de neuronas influenciadas por la sincronización fótica del TRH que mandan información circadiana de la médula a la corteza del NSQ, mientras que las vías de salida de la corteza se dan por la influencia de estímulos de sincronización provenientes de la médula y por vías de entrada no-fóticas provenientes de varias áreas corticales. Así, la señalización circadiana del NSQ varía con respecto a la subdivisión de su origen. La complejidad de la señal de salida es aumentada por el número y la variedad de sustancias neuroactivas que funcionan como transmisores o moduladores y a un nivel más complejo, por eventos humorales y conductuales que componen la vía de retroalimentación del NSQ (Hastings et al., 2018).

Proyecciones eferentes del NSQ

Las proyecciones eferentes del NSQ son menos numerosas y complejas de lo que se podría esperar ya que se dan principalmente a través de interneuronas en otras áreas hipotalámicas y con conectividad directa a otras neuronas neuroendocrinas, las cuales controlan diversas respuestas fisiológicas como la ingesta de agua, la calidad del sueño, conducta y la temperatura corporal, por lo que es posible que el NSQ provea información del contexto temporal y delegue el control directo de los estados fisiológicos y conductuales a regiones cerebrales específicas.

En conclusión, la información procesada en el NSQ involucra 4 pasos:

1. Integración fótica y vías de entrada de sincronización a la médula
2. Conexiones intrínsecas entre neuronas de la médula, de médula a corteza y entre neuronas de la corteza
3. Proyecciones comisurales entre médulas y entre cortezas (de ambos núcleos)
4. Integración de vías de entrada en la corteza de la médula del NSQ y de un conjunto amplio de entradas no visuales.

El NSQ como reloj maestro no sólo le dirige ritmicidad a células individuales y órganos, sino que también a las señales metabólicas que retroalimentan al sistema circadiano. Esto significa que el metabolismo no solo es una función aferente del sistema circadiano, sino que también retroalimenta la sincronización y reforzamiento de los ritmos, la cual es esencial para proveer a los relojes circadianos (tanto centrales como periféricos) con la flexibilidad necesaria para ajustar su fisiología a los requerimientos metabólicos de las células, tejidos y órganos completos (Reinke y Asher, 2019).

PARTE II: REGULACIÓN CIRCADIANA DEL METABOLISMO

El metabolismo es la red de reacciones bioquímicas que usan los organismos para transformar moléculas con el propósito de generar energía y construir estructuras necesarias para el mantenimiento celular. En general, la adaptabilidad metabólica es esencial para responder a señales externas en un ambiente cambiante, pero, aunque todos los organismos dependen de su habilidad para responder a estos cambios ambientales, la capacidad para predecir estos cambios dicta cómo los organismos se enfrentan a ellos.

En la retroalimentación entre el metabolismo y la regulación circadiana, el alimento tiene un impacto fuerte en el sistema de reloj circadiano en mamíferos, siendo los ritmos cíclicos de ayuno-alimento una señal sincronizadora dominante en relojes periféricos (Longo, 2016; Panda, 2016). De hecho, los horarios restringidos de alimentación, es decir, en momentos distintos a la fase de actividad del animal pueden separar por completo los osciladores periféricos del NSQ. Además, se ha demostrado que la expresión de los genes de reloj en el NSQ puede ser alterada por estos horarios de alimentación restringidas y por dietas hipocalóricas; por lo tanto, las señales metabólicas, moduladas por la dieta señalizan al NSQ y modifican sus vías de salida (Mendoza et al., 2005).

Otro ejemplo de vías metabólicas de retroalimentación circadiana es a través del microbioma intestinal (los microorganismos que habitan en el tracto gastrointestinal) que puede alterar el balance energético, modificaciones metabólicas y la disponibilidad de metabolitos microbianos (Narjis y Sobia, 2020). El microbioma presenta cambios diarios que dependen de reloj circadiano del hospedero, probablemente a través del control del comportamiento rítmico de la alimentación (Thaiss et al., 2014; Liang et al., 2015; revisado en Narjis y Sobia, 2020) por lo que los ritmos circadianos del huésped pueden alterar la composición y actividad del microbioma intestinal y a su vez este afecta al metabolismo del huésped (Voigt et al., 2016). Además, el reloj circadiano regula la transcripción de los receptores intestinales tipo Toll, los cuales han mostrado integrar señales nutricionales y bacterianas para regular el metabolismo intestinal (Mukherji et al., 2013). Finalmente, los metabolitos producidos por el microbioma intestinal son mediadores importantes que vinculan los procesos microbianos con el reloj del huésped, por lo que la disrupción de esta red circadiana puede llevar a enfermedades metabólicas como la obesidad (Leone et al., 2015, Voigt et al., 2016).

Los relojes periféricos también son referidos comúnmente como osciladores periféricos y alrededor del 10 al 40% de todos los genes en estos tejidos muestran una ritmicidad circadiana. Para comprender el control del NSQ hacia los relojes periféricos es importante entender a la célula como la unidad circadiana autónoma más pequeña, la cual puede generar ritmicidad de la mayoría de las funciones metabólicas independientemente de las señales sistémicas rítmicas generadas en otras partes en el cuerpo; posteriormente se van añadiendo niveles de complejidad para entender el control a nivel de órganos y sistemas y finalmente, la compleja red de retroalimentación entre estos (Reinke y Asher, 2019).

Control circadiano a nivel celular

Los relojes autónomos celulares interactúan tanto con los ciclos de luz-oscuridad (de manera indirecta) como con los de ayuno-alimentación, para coordinar oscilaciones circadianas de cientos de genes que codifican para la expresión de componentes de señalización que transmiten información temporal entre células y tejidos. Estos ritmos intracelulares diarios optimizan la fisiología y el uso de energía celular y separan en el tiempo procesos celulares incompatibles (Panda, 2016). En animales, los mecanismos principales que dan lugar a las oscilaciones circadianas son las vías moleculares de retroalimentación (PER y CRY) y (ROR y REV-ERB), y que están presentes en la mayoría de las células. Estos reguladores también permiten la expresión rítmica de cientos de genes, llamados “genes controlados por reloj”, al unirse a los sitios de regulación o a través de reguladores transcripcionales río abajo que tendrán un pico en su concentración en distintas fases o momentos del día (Panda, 2016).

Los factores de transcripción circadianos también interactúan con coactivadores, correceptores y factores relacionados a cromatina que modifican marcas en las histonas para activar o reprimir la transcripción. Por ejemplo, una proteína histona lisina desmetilasa (USF1) ayuda a la transición entre ciclos diarios de activación y represión al interactuar con los complejos CLOCK/BMAL1 y PER/CRY. Además de estas modificaciones en histonas, algunas proteínas de reloj llevan procesos de acetilación y des-acetilación, y elementos promotores controlan los ajustes rápidos de componentes circadianos en respuesta a cambios súbitos en el estado celular. Todos estos procesos de regulación involucran un gran número de proteínas e interacciones funcionales con una fracción importante de entre 3-20% de

metabolitos rítmicos controlados por genes de reloj (Panda, 2016), aunque otras fuentes presumen que este número puede llegar a ser del 28% (Krishnaiah et al., 2017).

Debido a que la mitocondria es considerada el organelo celular más importante para proveer energía a las células eucariotas, su control circadiano es indispensable para la optimización de la energía celular (Figura 9). Además del papel que juega en la generación de ATP, la mitocondria está involucrada en otros procesos como la biosíntesis de lípidos, la homeostasis del calcio y la apoptosis. Evidencia reciente apoya la existencia de ritmos diarios en la respiración mitocondrial y la producción de ATP, la tasa de consumo de oxígeno, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y en sus ciclos de fusión-fisión, lo que indica una relación entre el reloj circadiano y el metabolismo de este organelo (Reinke y Asher, 2019).

Existe también un patrón circadiano importante en la utilización de nutrientes de la mitocondria dado por el control de la sirtuina deacetilasa dependiente de NAD (SIRT3) y otras enzimas limitantes, por lo que no es extraño encontrar también oscilaciones circadianas en el lipidoma y proteoma mitocondrial. Los genes de sirtuina (*Sirt1*, *Sirt3* y *Sirt6*) también están involucrados en la regulación de genes controlados por reloj ya que controlan la expresión de *Bmal1* y *Clock* (Li, X, 2013; revisado en Narjis y Sobia, 2020) y tienen un papel importante en la regulación del reloj circadiano y la homeostasis metabólica (Masri, 2015). Específicamente, *Sirt1* regula procesos como el metabolismo de la glucosa y los lípidos, secreción de insulina y la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria (Zhou et al., 2018). De hecho, en ratones sometidos a una dieta alta en grasa se ha encontrado una perturbación en genes de reloj en distintos tejidos y una supresión de la proteína SIRT1 (Sun et al., 2012). De igual forma, la expresión de *Sirt3* ha mostrado una reducción de hasta el 50% en ratones con diabetes y regresando a valores normales cuando los ratones se someten a un protocolo de restricción calórica (Jing et al., 2011; revisado en Narjis y Sobia, 2020).

En cuanto a la producción circadiana de lípidos, la tasa de oxidación mitocondrial está limitada por la entrada de grupos acilo a la mitocondria a través de las transferasas carnitina palmitoil 1 y 2 (CPT 1 y 2). Los niveles de estas enzimas muestran ritmos diarios, además de que los niveles de malonil CoA, que son producidos durante la síntesis de ácidos grasos y llegan a su pico de concentración durante la ventana de alimentación, inhiben la actividad de

las CPT. Esta regulación genera un ritmo en la síntesis y oxidación de ácidos grasos, los cuales llegan a su pico durante los horarios de alimentación y ayuno respectivamente, cambia el perfil lipídico diario en órganos como el hígado y es más exacto cuando los horarios de alimentación y la composición de la dieta son constantes (Panda, 2016; Reinke y Asher, 2019).

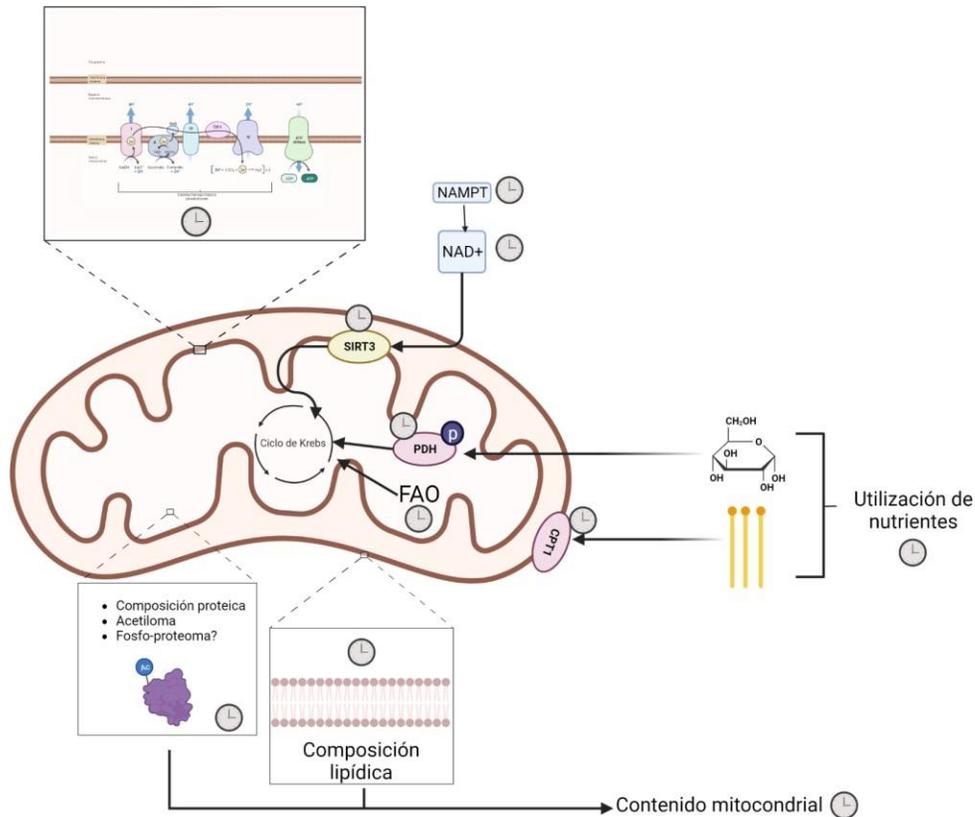


Figura 9. Control circadiano de la mitocondria. La composición y función mitocondrial muestra una ritmicidad circadiana, así como la utilización de nutrientes por el control de SIRT3 y enzimas limitantes como CPT1 para lípidos y PDT para carbohidratos. Además, el lipidoma y proteoma mitocondrial muestran oscilaciones circadianas, así como acetilaciones post-traduccionales y otras modificaciones de proteínas. FAO: oxidación de ácidos grasos; NAMPT: nicotinamida fosforribosiltransferasa; PDT: piruvato deshidrogenasa; NAD: nicotinamida adenina dinucleótido. Modificado de Reinke y Asher, 2019.

Creado en Biorender.com

Control circadiano a nivel de tejidos y órganos

En mamíferos la presencia de relojes periféricos existe en la mayoría de los órganos metabólicos como el hígado, tejido adiposo, corazón, músculo y riñones (Tabla 1). Las actividades metabólicas de cada órgano tienen cambios diarios de sus hormonas y metabolitos en sangre, al igual que los niveles de actividad de enzimas limitantes. Estas hormonas son la vía de comunicación entre el sistema nervioso central (CNS) y los órganos metabólicos más importantes, lo cual es esencial para la homeostasis (Reinke y Asher, 2019; Feng y Lazar, 2020).

Uno de los órganos más importantes por su diversidad en funciones fisiológicas es el hígado, el cual ha sido ampliamente estudiado en la biología circadiana. Entre sus varias funciones se encuentra el metabolismo de los carbohidratos, aminoácidos, lípidos y bilis, así como la síntesis de enzimas detoxificantes para el metabolismo de xenobióticos (sustancias que no se producen naturalmente dentro del organismo), componentes de la bilis y factores de coagulación (Reinke y Asher, 2019). Otras moléculas importantes de mencionar y que son secretadas de una manera circadiana por parte del páncreas son la insulina y glucagón por parte del tejido adiposo, la adiponectina y la leptina, y la ghrelina por el estómago (Froy, 2007; revisado en Reinke y Asher, 2019).

Tabla 1. Resumen de las hormonas y gases sanguíneos que tienen una regulación circadiana junto con su función principal (Modificado de Reinke y Asher, 2019).

Tabla 1 Regulación circadiana sistémica de hormonas y gases sanguíneos			
Origen	Hormona o gas sanguíneo regulada circadianamente	Función principal	Mecanismo de acción
Músculo	Miocinas	Regulación metabólica asociada al ejercicio	Movilización de glucosa
Páncreas	Glucagón	Metabolismo de glucosa y lípidos	Inhibición de la síntesis de glucógeno y estimulación de glucogenólisis y gluconeogénesis
	Insulina	Metabolismo de glucosa y lípidos	Absorción de glucosa
Tiroides	Triiodotironina	Tasa metabólica	Estimulación de síntesis proteica y uso de oxígeno
Cerebro	TRH y TSH	Producción de hormona tiroidea	Estimulación de T3 y T4 en tiroides
	FSH y LH	Sistema reproductivo	Estimulación de estrógeno y testosterona en órganos reproductores
	ACTH	Producción de corticosteroides	Estimulación de glucocorticoides en corteza suprarrenal
	Prolactina	Sistema reproductivo	Crecimiento de glándulas mamarias y producción de leche
	Melatonina	Sueño y reloj circadiano	Unión a receptores MT1 y MT2 en NSQ
Pulmones	Oxígeno	Gasto energético	Respiración celular
	Dióxido de carbono	Gasto energético y amortiguador de pH	Ciclo de Cori y unión con H ₂ O
Hígado	Ácidos biliares	Absorción de lípidos	Activación de lipasas
	FGF21	Metabolismo de nutrientes	Estimulación de absorción de glucosa por adipocitos
Riñón	Renina	Presión sanguínea y osmorregulación	Producción de angiotensina I
	Angiotensina	Presión sanguínea y osmorregulación	Estimulación de músculo liso vascular
	Corticosteroides	Metabolismo de nutrientes y sistema inmune	Activación de genes que codifican para proteínas antiinflamatorias
Tejido adiposo	Leptina	Gasto energético y regulación del hambre	Inducción de saciedad en el núcleo arqueado del hipotálamo
Estómago	Ghrelin	Gasto energético y regulación del hambre	Inducción de hambre en el núcleo arqueado del hipotálamo

Ritmicidad sistémica metabólica

A nivel sistémico existen variaciones circadianas en la distribución de nutrientes y gases sanguíneos, siendo la fase activa del día en la que se absorben más estas moléculas y la fase de descanso en la que la tasa de absorción disminuye o se detiene por completo. Para amortiguar estas fluctuaciones, el sistema circadiano conduce una absorción rítmica en órganos periféricos usando metabolitos y gases sanguíneos, como *Zeitgebers*, liberados también de forma rítmica (Reinke y Asher, 2019). De esta forma se modulan muchos procesos metabólicos importantes como la liberación de glucocorticoides (Balsalobre et al., 2000), la vía de AMPK (Jordan y Lamia, 2013), la síntesis de ácidos grasos y colesterol (Sitaula et al., 2017; Feng et al., 2011), la modulación hepática de gluconeogénesis (Zhang et al., 2010), entre otros (revisado en Poggiogalle et al., 2018). Por lo tanto, no es sorpresa esperar que los niveles de la mayoría de los metabolitos intermediarios como glucosa (Gill y Panda, 2015), aminoácidos (Feigin et al., 1967) y lípidos (Rivera-Coll et al., 1994) oscilan en la sangre, llegando a un pico en su concentración en el periodo de actividad. Como estas oscilaciones están sincronizadas con el tiempo externo, nuestro cuerpo utiliza mecanismos controlados por reloj para absorber y liberar metabolitos alineados con las señales ambientales, amortiguando el impacto de las fluctuaciones externas que pueden tener efectos

dañinos en el cuerpo humano (Adamovich et al., 2017; Reinke y Asher, 2019). Un ejemplo de esto es la secreción rítmica de cortisol, que ayuda a mantener la homeostasis de la glucosa y el balance energético a lo largo del día, siendo su pico de concentración en la mañana para proveer de energía y con menores concentraciones en la tarde para facilitar el descanso y la recuperación. Las disrupciones de este ritmo, provocadas por un cambio en el horario de sueño, por ejemplo, puede llevar a disfunciones metabólicas como la obesidad y diabetes (Reinke y Asher, 2019).

Otros intermediarios importantes que siguen oscilaciones rítmicas son los gases sanguíneos. Bajo condiciones aeróbicas, las células en mamíferos generan energía a través de la respiración mitocondrial en la cual carbohidratos, lípidos y otros metabolitos intermediarios son catabolizados y convertidos en equivalentes energéticos. En este proceso, el oxígeno se consume mediante la fosforilación oxidativa y el dióxido de carbono se usa en el Ciclo del Ácido Cítrico para generar energía. Debido a que la ventilación pulmonar aumenta durante la fase activa y disminuye durante la fase de descanso (Mortola, 2004), el consumo de oxígeno y la oxigenación de los tejidos exhiben una oscilación diaria (Adamovich et al., 2017; Emans et al., 2017). Un importante regulador de la homeostasis del oxígeno, el factor inducible a hipoxia 1α (HIF1 α), se acumula en condiciones hipóxicas y se ha observado su vinculación molecular con el reloj celular y el oxígeno, ya que reprograma la transcripción en respuesta a bajos niveles de oxígeno. La disrupción del reloj circadiano ha mostrado limitar la capacidad de HIF1 α para detectar y responder al oxígeno, llevando a la expresión de cambios genéticos de HIF1 α (Reinke y Asher, 2019).

Debido a que la glucosa es uno de los metabolitos mejor estudiados y tiene una amplia gama de funciones y respuestas metabólicas, es de gran interés entender su componente circadiano para tener un mejor panorama sobre los problemas metabólicos causados por su desregulación. Este se complementa también con la regulación circadiana del metabolismo de los lípidos, los cuales han sido ampliamente estudiados y sus consecuencias en el metabolismo son de alta importancia para la salud.

Ritmicidad circadiana de la glucosa

La primera evidencia de la regulación circadiana de la glucosa se dio alrededor de 1960-1970 cuando varios estudios reportaron variaciones diurnas en la tolerancia a la glucosa (Aparicio

et al., 1974; Walsh et al., 1975). La regulación circadiana de los niveles de glucosa en sangre exhibe la importancia de los relojes no solo para el metabolismo celular de la glucosa, sino también para los mecanismos intrínsecos por los que los relojes en distintos órganos como hipotálamo, el hígado, el páncreas y el músculo esquelético actúan en conjunto para controlar la concentración circulante de glucosa (Reinke y Asher, 2019).

La glucosa entra a los hepatocitos sólo si está fosforilada por la acción de la enzima glucocinasa (GCK). Una vez fosforilada, la glucosa es utilizada para **i)** producción de energía vía glucólisis, **ii)** almacenamiento de energía como glucógeno (para su uso rápido mediante la glucogénesis), o **iii)** producción de energía por la vía de las pentosas (Panda, 2016).

Para que la glucosa pueda entrar a las células existe la familia de receptores transportadores de glucosa (GLUT). Específicamente GLUT 2 se encuentra en los hepatocitos y muestra ritmos diarios al igual que la enzima GCK, con un pico en su nivel que coincide con los periodos de alimentación (Vollmers et al., 2009). En el estado alimentado, la insulina activa la glucogénesis a través de una señalización en cascada que lleva a la inhibición de la enzima glucógeno sintasa quinasa (GSK3) y activando la enzima glucógeno sintasa (GS). GSK3 también ha mostrado tener ritmos diarios de fosforilación (Yin et al., 2006; revisado en Panda 2016).

La utilización de glucosa a través de la vía de las pentosas también está conectada al reloj circadiano, contribuyendo a la reposición de NADPH en el citoplasma celular. Bajos niveles de NADPH activan el factor de transcripción NRF2, que conduce la transcripción de Rev-erb, afectando el reloj molecular (Rey et al., 2016). Cuando el organismo se encuentra alimentado, el reloj circadiano tiene una influencia en el metabolismo de la glucosa a través de su interacción con la señalización de la hormona glucagón. El glucagón señala a través de sus receptores asociados a proteínas G y adenilato ciclasa para la activación de la proteína cinasa A (PKA), la cual a su vez promueve la glucogenólisis y gluconeogénesis (Mayr y Montminy, 2001). PKA fosforila y activa al factor de transcripción bZIP para su unión con promotores gluconeogénicos, estimulando así su transcripción (Travnickova-Bendova et al., 2002). Además, el gen de reloj CRY1 inhibe la activación de PKA a través de la regulación negativa de las proteínas G y adenilato ciclasa (Zhang et al., 2010; Narasimamurthy et al., 2012). Finalmente, se ha comprobado que ayunos de larga duración también aumentan la

tasa de AMP/ATP y activa la cinasa activada por AMP (AMPK), la cual fosforila a los

complejos CRY para su degradación (Lamia et al., 2009). En conjunto, esto sugiere un mecanismo por el cual CRY1 actúa como un punto de equilibrio ante respuestas a déficit nutricionales de corta y amplia duración (Panda, 2016).

Finalmente, se ha demostrado que en ratones la pérdida de BMAL1 atenúa la variación diaria en glucosa y los niveles de triglicéridos, reduce la gluconeogénesis y causa intolerancia, mientras que los ratones con mutación para Clock desarrollan hiperglucemia e hiperinsulinemia (Rudic et al., 2004; Lamia et al., 2008; Turek et al., 2005; revisado en Feng y Lazar, 2020).

Control circadiano del control autonómico de la liberación de glucosa

Además del control celular del metabolismo de la glucosa, hay un control a nivel del CNS que controla varios aspectos de la absorción sistémica de la glucosa usando sus proyecciones GABAérgicas y glutamatérgicas hacia las neuronas simpáticas preautonómicas en el núcleo paraventral del hipotálamo (PVN) para controlar la producción hepática de la glucosa. Las proyecciones GABAérgicas se dirigen hacia las neuronas parasimpáticas preautonómicas en el PVN para controlar las respuestas insulínicas en el páncreas mediadas por el alimento. Además, experimentos realizados por Kalsbeek et al., (2010) demuestran evidencia de un rol importante de los sistemas de orexinas, el PACAP y VIP en el hipotálamo en el control circadiano de la producción de glucosa hepática

También existe un rol mediador de las neuronas NPY del núcleo arqueado hipotalámico (ARC) en los efectos de la insulina y corticosterona y en la producción de glucosa hepática y el metabolismo de los lípidos. Las neuronas de este núcleo también pueden contribuir a los efectos de las hormonas tiroideas, estrógeno y leptina en la producción de glucosa hepática, como se observa en la Figura 10. Finalmente, se les ha asignado un rol mediador a las neuronas NPY, como los efectos de la leptina y los estrógenos en el comportamiento alimenticio y los efectos de las hormonas tiroideas en la actividad del tejido adiposo pardo (Kalsbeek et al., 2014).

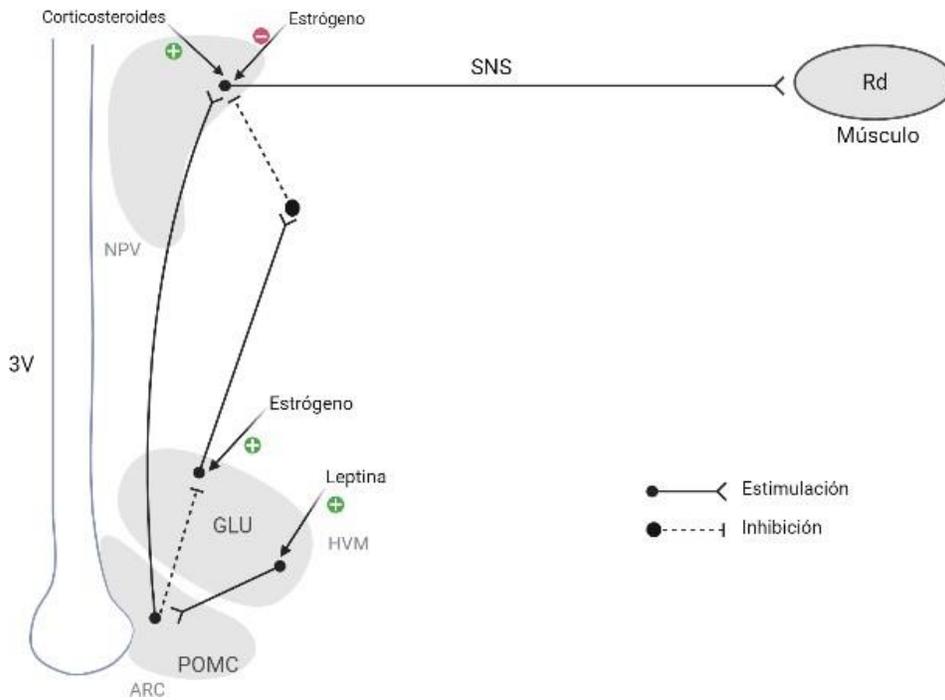


Figura 10. Representación gráfica de las vías hipotálamicas que pueden estar involucradas en los efectos de retroalimentación hormonal en la captación sistémica de la glucosa. Las proyecciones neuronales en el PVN son GABAérgicas en el sub PVN o vía POMC en el núcleo arqueado. ARC: núcleo arqueado del hipotálamo; POMC: neuronas de proopiomelanocortina; GLU: neuronas glutamatergicas; PVN: núcleo paraventricular; SNS: sistema nervioso simpático; 3V: tercer ventrículo. Modificado de Kalsbeek et al., 2014.

Creado con Biorender.com

Control circadiano de la homeostasis de la glucosa

El control de la glucosa también tiene un componente homeostático que involucra a numerosos órganos endocrinos. El ritmo diario en la sensibilidad a la insulina periférica es probablemente causado por vías intracelulares mediadoras de la absorción de glucosa y factores circulantes. El tamaño de las variaciones diurnas en la tolerancia a la glucosa es sorprendentemente alto, por ejemplo, adultos con tolerancia normal a la glucosa en la mañana pueden mostrar un perfil metabólico equivalente a individuos prediabéticos en la tarde (Jarrett et al., 1972; Grabner et al., 1975). Poggiogalle et al. 2018, ha reportado que la tolerancia a la glucosa oral en adultos prediabéticos es hasta 40 mg/dl más alto a las 19:00 h que a las 7:00 h, por lo que adultos diabéticos muestran un perfil metabólico equivalente a individuos diabéticos alrededor de la hora de la cena (Sonnier et al., 2014). Estas variaciones en la tolerancia a la glucosa pueden ser parcialmente causas de ritmos diurnos en la respuesta de las células β pancreáticas en la secreción y depuración de insulina. Aunque los datos en la existencia de una ritmicidad diurna de la insulina en ayuno son mixtos (Morris et al., 2015), la respuesta de secreción de insulina varía a través del día. La respuesta de las células β es mayor en la mañana que a cualquier otra hora. Aun así, la tasa de secreción de insulina y el total de insulina secretada en respuesta a una comida alcanza su pico a las horas del final de la fotofase (Saad et al., 2012; revisado en Poggiogalle et al., 2017).

Por otro lado, la hormona de crecimiento induce resistencia a la insulina (Moller et al., 1991; revisado en Poggiogalle et al., 2018) y está relacionada con los niveles de glucosa durante el sueño nocturno (Van Cauter et al., 1991; revisado en Poggiogalle et al., 2018). El cortisol, el cual es regulado por el reloj central, también es responsable de la variación circadiana plasmática de glucosa e insulina ya que promueve la glucogenólisis (Plat et al., 1999). Estos resultados sugieren que la tolerancia a la glucosa exhibe una variación circadiana, con menor control glicémico en la tarde y noche en adultos sanos. Los ritmos diarios en la respuesta de las células β del páncreas, la sensibilidad periférica a la insulina (influenciada por factores internos y circulantes), la depuración de insulina y la efectividad de la glucosa conduce a estos ritmos diarios en el metabolismo de la glucosa, mientras que la sensibilidad de la insulina hepática puede jugar un rol menos importante. Aun así, estos ritmos son atenuados en individuos con obesidad o con diabetes tipo 2, sugiriendo que una alteración en los ritmos circadianos pueden ser una causa o consecuencia de varias enfermedades metabólicas

(Poggiogalle et al., 2018).

Ritmicidad circadiana de los lípidos

Casi el 20% de la transcripción de genes que ocurre en el hígado muestra ritmos diarios, por lo que es lógico que al menos algunas de sus enzimas y reguladores en cada vía metabólica vaya a mostrar una ritmicidad circadiana. Estos componentes comúnmente son mediadores de pasos limitantes dentro de las vías de señalización, mostrando un pico en los niveles de expresión que coinciden con la disponibilidad de sustratos o las necesidades metabólicas (Panda, 2016). Fisiológicamente, los triglicéridos representan la unidad de almacenamiento más grande del cuerpo. El hígado es un órgano central en el metabolismo de ácidos grasos y triglicéridos, recibéndolos de dos maneras: i) a través de la hidrólisis de triglicéridos provenientes del intestino llenos de quilomicrones durante el periodo postprandial, y ii) a través de ácidos grasos no esterificados provenientes de la lipólisis del tejido adiposo durante condiciones de ayuno. Junto a estas fuentes de lípidos, el hígado es también capaz de sintetizar ácidos grasos *de novo* a través de la lipogénesis por el exceso de glucosa. Estos ácidos grasos de diferentes fuentes pueden ser usados para la oxidación dentro del hígado o empacados en triglicéridos para almacenamiento o secreción por el hígado al plasma sanguíneo en forma de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL).

Control celular de la homeostasis de los lípidos

La síntesis de ácidos grasos y la β -oxidación son controladas por el hígado. La molécula mitocondrial Acetil CoA es exportada al citoplasma por el transportador citrato/palmitato, donde la enzima ATP citrato liasa (ACLY) es considerada como la enzima limitante. Existe una acrofase en la expresión de ACLY que coincide con la ventana de alimentación (Vollmers et al., 2009).

El primer paso para la síntesis de ácidos grasos es la carboxilación de Acetil CoA por la Acetil CoA carboxilasa (ACACA) para producir malonil CoA. ACACA se inactiva por fosforilación de AMPK, la cual es inducida por el ayuno. La tasa de la β -oxidación es limitada por la entrada de grupos acilo grasos a la mitocondria por la CPT1 y CPT2, las cuales muestran ritmos diarios (Lamia et al., 2009). Además, altos niveles de malonil CoA, que son producidos durante la síntesis de ácidos grasos y llegan a su pico durante la ventana de alimentación, inhiben la actividad de CPT. Esta regulación circadiana genera un ritmo diario en la síntesis de ácidos grasos y su oxidación, las cuales llegan a su pico durante la ventana

de alimentación y ayuno respectivamente. Esto también da lugar a los ritmos diarios en otros lípidos hepáticos (Adamovich et al., 2014). La expresión rítmica de REV-ERB α genera ritmos diarios en la transcripción de muchos genes involucrados en la vía de síntesis de ácidos grasos y en ausencia de REV-ERB se desarrolla hígado graso en roedores (Feng et al., 2011; Cho et al., 2012; revisado en Panda, 2016).

Control hipotalámico de la síntesis de lípidos

Además de su papel de regulación en el metabolismo de carbohidratos, la conexión hipotálamo-SNA-hígado parece estar involucrada en el control del metabolismo de los lípidos (Figura 11). La regulación del empaquetamiento y secreción de VLDL es compleja, aunque hay varios factores que han sido investigados. La apolipoproteína B (ApoB), es una estructura proteínica importante de VLDL ya que está implicada en su regulación y secreción. La secreción de VLDL por el hígado puede ser almacenada en el tejido adiposo o usada como una fuente de energía por los músculos (Kalsbeek, 2014).

Van den Hoek et al. (2004), fue el primero en describir un efecto agudo de estimulación del neuropéptido Y (NPY) en la secreción de VLDL en ratones. Los estudios han demostrado que el aumento en la liberación de NPY de neuronas del núcleo arqueado del hipotálamo (ARC) durante el ayuno hacia neuronas preautonómicas del núcleo paraventral (PVN), lo que estimula el SNS a mantener la producción de glucosa hepática y secreción de VLDL. Una vía similar se ha descrito recientemente para el control de la actividad del tejido adiposo pardo (BAT), por ejemplo, un aumento en la liberación de NPY de las terminales de ARC resulta en un decremento en la expresión de tirosina hidroxilasa en neuronas preautonómicas (posiblemente dopaminérgicas) en el PVN y subsecuentemente una disminución en la regulación de la proteína desacoplante 1 (UCP1) y de la termogénesis en BAT (Shi et al., 2013; revisado en (Kalsbeeka et al., 2014). Aun así, la regulación hipotalámica de los lípidos involucra redes más complejas a través de su regulación de otros metabolitos como estrógenos, hormonas gástricas (leptina) y corticosteroides.

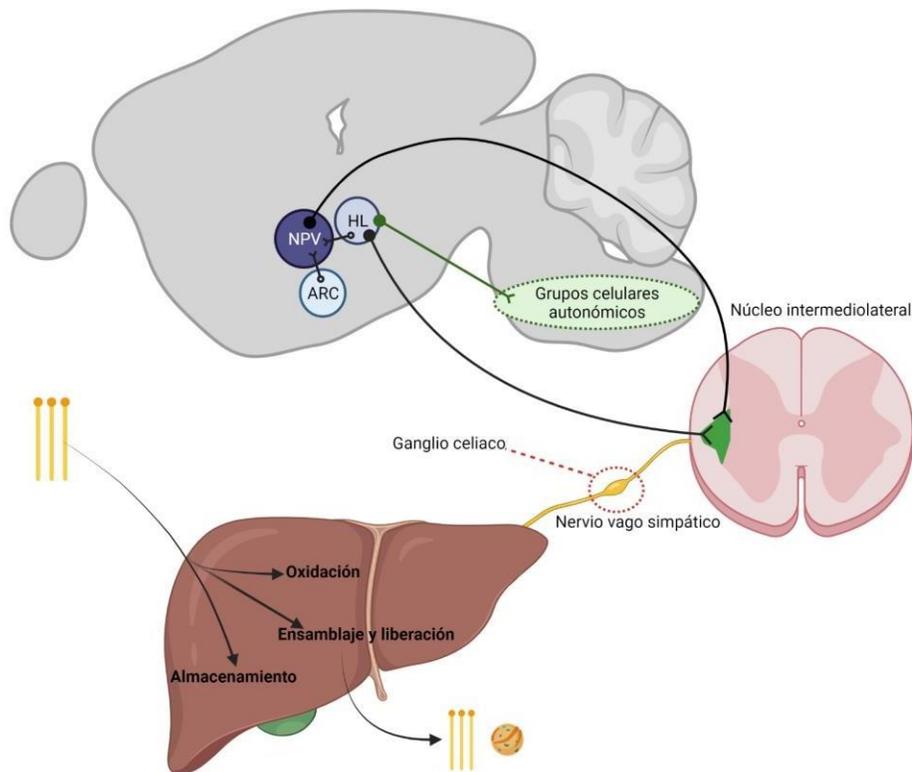


Figura 11. Representación de las vías eferentes simpáticas que conectan el cerebro de la ratona con el hígado en el metabolismo de los lípidos. PVN: Núcleo para ventral del hipotálamo; LH: hipotálamo lateral; ARC: núcleo arqueado; VLDL: lipoproteína de muy baja densidad (modificado de Kaslbeek, 2014).

Creado con Biorender.com

Control circadiano de la homeostasis de los lípidos

Aunque la mayoría de los estudios están de acuerdo con que los triglicéridos exhiben un ritmo diurno (Sennels et al., 2015; Rivera-Coll et al., 1994) con niveles que varían entre 33–63% durante el día, estos no coinciden con una fase específica. Por ejemplo, hay estudios que demuestran una acrofase en la tarde (~15:00 h) o noche (~17:45–, 20:00 h) (Van Moorsel et al., 2016; Sennels et al., 2015), mientras que otros valores llegan a su pico de concentración entre el mediodía y las primeras horas de la tarde en hombres, pero no en mujeres (Van Kerkhof et al., 2015). Hay varios factores que influyen en el ritmo del metabolismo de los lípidos. El sexo biológico, por ejemplo, puede explicar algunas de las diferencias en los ritmos de triglicéridos. En un estudio, los hombres mostraron un incremento del doble en los

niveles de triglicérido séricos después de una comida que las mujeres, además de tener una variación diaria más alta de estos valores (36% en hombres vs., 24% en mujeres; Demacker et al., 1982). Estas diferencias relacionadas con el sexo pueden darse por la influencia de estrógenos en el metabolismo de los lípidos (Halkes et al., 2001). Además, la edad, el fenotipo metabólico y las diferencias metodológicas de estudio como la medición de triglicéridos sérica versus la capilar (Klop et al., 2011; Halkes et al., 2004) pueden ser la razón de las discrepancias en la fase del ritmo.

El tejido adiposo subcutáneo, pero no el visceral, también demuestra una gran amplitud en ritmos circadianos en la sensibilidad a la insulina, siendo 54% más alta en la tarde que a medianoche (Carrasco-Benso et al., 2016). Los factores de circulación también contribuyen, como los ácidos grasos libres, que exhiben un ritmo diurno que reflejan la periodicidad en la homeostasis de la glucosa (Poggiogalle et al., 2018).

Los genes PPARs están involucrados en la homeostasis energética y la regulación del metabolismo de los lípidos, siendo un enlace importante entre los ritmos circadianos y el metabolismo (Chen, 2014). La expresión de PPAR α está regulada por CLOCK-BMAL1 y a su vez, se une con el gen Bmal1 y regula su transcripción (Serin y Acar, 2019). Además, también activa vías metabólicas en respuesta a la inanición como la cetogénesis y la oxidación de ácidos grasos hepáticos (Leone et al., 1999; revisado en Narjis y Sobia, 2020).

La mutación en genes del reloj circadiano y la deficiencia de Bmal1 también detiene el metabolismo de los lípidos, como se muestra por la hiperlipidemia, hiperleptinemia y la esteatosis hepática (Turek et al., 2005; Shimba et al., 2011). La delección de REV-ER β también causa esteatosis hepática, en parte por la reducción en lipogénesis (Feng et al., 2011; Bugge et al., 2012). De hecho, la evidencia sugiere que REV-ER β puede ser el responsable de la biosíntesis de lípidos en el hígado (Hems et al., 1975; Alenghat et al., 2008; Feng et al., 2011) ya que inhibe la biosíntesis de lípidos y favorece su almacenamiento, lo cual redirecciona los metabolitos gluconeogénicos y promueve indirectamente a la gluconeogénesis (Sun et al., 2012). Los agonistas de REV-ER β inhiben la síntesis de lípidos y colesterol en el hígado y promueven la oxidación de ácidos grasos y glucosa en el músculo, resultando en un aumento en el gasto energético. Estos agonistas promueven significativamente dislipidemia e hiperglicemia en modelos con obesidad inducida por dieta

(Solt et al., 2012; revisado en Feng y Lazar, 2020).

En conclusión, los lípidos tienen una gran variabilidad de acrofases que llegan a su pico en la mañana o alrededor de la tarde. Estos ritmos son conducidos, en parte, por diferencias en su síntesis y transporte. Aun así, hay una gran variabilidad individual en la ritmicidad de los lípidos, así como en su momento, amplitud y fuerza de su liberación, sugiriendo que puede haber una distinción fenotípica en el control circadiano del metabolismo de los lípidos (Poggiogalle et al., 2018).

La ritmicidad circadiana metabólica es un sistema complejo ya que involucra el control rítmico de muchas moléculas a través de distintas vías. En la Tabla 2 se resumen la característica de ritmicidad en los metabolitos más importantes en humanos, así como su posible afección por efectos de desincronización circadiana.

Tabla 2. Efecto del sistema circadiano en el metabolismo en humanos. Modificado de Poggiogalle et al., 2018.

	Ritmo diurno	Ritmo circadiano	Afección por desincronización
Metabolismo de glucosa			
Tolerancia a la glucosa	Sí	Sí	Sí
Glucosa en ayuno	Sí	Mixto	No
Glucosa postprandial	Sí	Sí	Sí
Insulina en ayuno	Mixto	No	No
Insulina postprandial	Sí	Mixto	Sí
Respuesta de células beta	Sí	?	?
Secreción de insulina	Sí	Sí	Sí
Depuración de insulina	Sí	Sí	?
Sensibilidad periférica a la insulina	Sí	Sí	Sí
Sensibilidad de adipocitos a la insulina	Sí	Sí	?
Sensibilidad hepática a la insulina	Mixto	?	?
Metabolismo de lípidos			
Tasa de síntesis de colesterol	Sí	?	?
Colesterol total	Sí	?	?
Colesterol LDL	Sí	?	?
Colesterol HDL	Mixto	?	?
Triglicéridos	Sí	Sí	No
Ácidos grasos libres	Sí	No	Mixto
Fosfolípidos en plasma	Sí	Poco	?
Acetilcarnitinas en plasma	Poco	?	?
Diglicéridos	Sí	Sí	?
Oxidación de lípidos mitocondriales	Sí	?	?
Metabolismo energético			
Gasto energético	Sí	Sí	Sí
Hambre subjetiva	Sí	Sí	Sí
Ingesta de alimento	Sí	No	?
Leptina	Sí	No	Sí
Ghrelin	Sí	No	No

"?": la influencia del sistema circadiano no es conocida

"Mixto" evidencia contradictoria

Control circadiano de la termorregulación

El reloj circadiano en los adipocitos es necesario para mantener los ritmos de la termorregulación en la temperatura corporal.

El tejido adiposo se presenta en tres categorías distintas: blanco (TAB), pardo (BAT) y beige (TABe). El más abundante en mamíferos es el TAB y está caracterizado por contener diferentes células (pre-adipocitos, adipocitos, fibroblastos, neutrófilos, macrófagos, linfocitos y células endoteliales (Ràfols, 2014). El BAT no proviene de la misma línea celular que el TAB, por lo que se distingue por tener un alto contenido mitocondrial, y por lo tanto, un mediador importante en la regulación de la temperatura. BAT convierte ATP en calor a través del desacoplamiento de la oxidación de lípidos en la mitocondria. Este proceso se da por las proteínas transmembranales mitocondriales llamadas UCPs. Específicamente laUCPI disminuye el gradiente normal de protones por la fosforilación oxidativa, por lo que los protones en el espacio intermembrana pueden regresar a la matriz mitocondrial, cambiando la concentración de protones en ambos lados de la membrana, lo que genera una pérdida de energía a través de calor. BAT se encuentra en mayores cantidades en humanos en edad temprana y en mamíferos pequeños. Finalmente, el TABe está relacionado a TAB, pero tiene funciones parecidas al BAT (Wu et al., 2013; revisado en Lekkas y Paschos, 2019).

El reloj circadiano en BAT regula la expresión rítmica del doble de los genes que en el TAB (Zhang et al., 2010). El cambio de fase por luz cambia la expresión genética de la termorregulación en BAT e induce la transformación de BAT a TAB con acumulación de lípidos (Herrero et al., 2015; revisado en Lekkas y Paschos, 2019). La exposición constante a la luz a lo largo de 24 horas incrementa la adiposidad en ratones, a través de la disminución de señalización adrenérgica hacia BAT y reduce la captación de glucosa y ácidos grasos en BAT (Kooijman et al., 2015). La β -oxidación de ácidos grasos estimula la termogénesis en BAT y la captación de glucosa y ácidos grasos por BAT incrementa con la activación de la termogénesis (Cannon and Nedergaard, 2011). Esta captación de glucosa y ácidos grasos por BAT ha mostrado ser rítmica en ratones, al igual que su capacidad de eliminar lípidos postprandiales (van den Berget al., 2018; van der Veen et al., 2012; revisado en Panda, 2016), teniendo su pico al inicio de la actividad de la fase activa que coincide con el de la actividad termogénica en ratones (Lekkas y Paschos, 2019).

La pérdida de Rev-erb específica de BAT genera una pérdida en la expresión rítmica de las proteínas UCP y de las fluctuaciones rítmicas en la temperatura corporal. Debido a que la temperatura corporal actúa como un zeitgeber, cambios en esta afecta el reloj en el resto del cuerpo (Panda, 2016).

PARTE III: DESINCRONIZACIÓN CIRCADIANA Y SUS EFECTOS EN EL METABOLISMO

La electricidad y el constante acceso a la luz, energía y alimento, así como los horarios de trabajo 24 horas y la capacidad de poder viajar entre zonas horarias han creado un ambiente con patrones muy diferentes a los que tenían nuestros ancestros. Aunque hay muchos aspectos positivos acerca del estilo de vida tecnológico, sin duda estos cambios han contribuido en un aumento en la prevalencia de enfermedades metabólicas y psiquiátricas (Vetter, 2020).

La melatonina es una hormona sintetizada principalmente en la glándula pineal, aunque también es sintetizada en varios tejidos en mamíferos. Su síntesis pineal está dada por el NSQ, por lo que está sincronizada al ciclo de luz-oscuridad, lo cual hace que la repetición diaria de la señal de melatonina sea perfectamente relacionada con la fase de oscuridad, haciendo que esta molécula sea un sincronizador de diversos ritmos circadianos. Los estímulos de luz (principalmente la luz azul) activan el catabolismo de la melanopsina en las células ganglionares fotorreceptoras que proyectan al hipotálamo vía el TRH inhibiendo la síntesis de melatonina (Reiter, 1991; revisado en Cipolla-Neto y Amaral, 2014)

El precursor de la melatonina es el triptófano, el cual es transformado por la enzima triptófano hidroxilasa en 5-hidroxitriptofano y posteriormente es convertido a serotonina. La serotonina a su vez es acetilada por una acetiltransferasa (AANAT) para convertirse en N-acetil serotonina (NAS) la cual se convierte en melatonina por una enzima metiltransferasa (ASMT). Todas estas enzimas están bajo el control de los sistemas endocrinos y circadianos que regulan el tiempo, duración y cantidad de melatonina que se produce (Cipolla-Neto y Amaral, 2014).

La melatonina tiene varios mecanismos de acción pleiotrópicos. Primero, tiene efectos no mediados por receptores celulares que involucran la interacción directa de la melatonina como agente antioxidante. De hecho, esta molécula se considera uno de los agentes antioxidantes más importantes ya que no sólo se quela el oxígeno y las especies reactivas del nitrógeno, sino que también moviliza el sistema enzimático antioxidante intracelular. Además, la melatonina se une a receptores específicos membranales (MTNR1A y MTNR1B en humanos) que interactúan con mensajeros secundarios, creando distintos efectos en los distintos tejidos en donde se encuentran los receptores. Finalmente, se ha propuesto una posible interacción con los receptores nucleares ROR/RZR (Jockers et al., 2016).

Aunque la melatonina sólo se produce durante la fase de oscuridad, esta tiene efectos que se ven durante el día cuando se encuentra en sus niveles mínimos, especialmente en las primeras horas en las que se detiene su producción (en humanos coincide con las primeras horas de la mañana al despertar). Estos efectos pueden darse por la inhibición durante la noche de algunas vías por melatonina, mostrando un efecto de potenciación en cuando se detiene su inhibición. Un ejemplo de esto es una mejora en la resistencia a la insulina en las horas tempranas del día, debido a la acción circadiana de la melatonina en la insulina y los niveles de glucosa plasmática. Otros efectos prolongados de la melatonina son aquellos que dependen de su acción en controlar la transcripción y/o traducción de los genes de reloj y los genes controlados por reloj. Un efecto sumamente importante de la melatonina y comúnmente excluido es su papel en establecer un balance energético adecuado al regular el flujo de energía entre los lugares de almacenamiento energético en el cuerpo. Así regula directamente el gasto energético a través de la activación del BAT y participando en el proceso de conversión de TAB a BAT (Cipolla-Neto et al., 2014).

La mayoría de los animales optimizan el balance energético concentrando el almacenamiento de energía durante el día y movilizandola la energía almacenada durante la fase de descanso para producir la energía necesaria para sostener los procesos básicos mientras no estamos consumiendo alimento. La melatonina es el mediador clave para la integración entre el patrón cíclico ambiental y la distribución de procesos físico y de comportamiento para la

optimización del balance energético y la regulación del peso corporal, características cruciales para un metabolismo saludable (Saarela y Reiter, 1994).

La reducción de la producción de melatonina dada por actividades que cambian la sincronización por luz como el trabajo por turnos, la exposición a luz durante la noche, o el cambio de horario causan desincronización circadiana e inducen resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, perturbaciones de sueño, y un estado de cronodisrupción que lleva a la obesidad. Varios estudios han demostrado que esta disrupción metabólica causada por la ausencia de melatonina en animales pinealectomizados causan síndrome diabetogénico, el cual puede ser revertido con terapia de reemplazo de melatonina o por un protocolo de restricción de tiempos de comida, mientras que el entrenamiento físico no ha demostrado revertir los síntomas cuando el síndrome es causado por deficiencia de melatonina (Borges et al., 2005).

La disrupción circadiana es un término que engloba la mayoría de otros términos usados comúnmente (desincronización circadiana, desalineación circadiana, cronodisrupción y desfase horario). La pérdida de la sincronización entre el reloj interno y los *Zeitgebers* resulta en la disrupción de los ritmos circadianos e impacta seriamente la homeostasis metabólica, provocando cambios en el comportamiento de la alimentación, alteraciones del metabolismo de la glucosa y lípidos y aumento de peso. Las desincronizaciones circadianas como comer de noche, exposición a luces artificiales de noche, trabajos nocturnos, y alteraciones en genes del reloj circadiano tienen efectos dañinos en el metabolismo y aumentan el riesgo de tener varios desórdenes cardio metabólicos como obesidad, diabetes, síndrome metabólico y enfermedades cardiovasculares (Narjis y Sobia, 2020). La figura 12 ilustra un modelo de la disrupción circadiana y sus posibles efectos metabólicos.

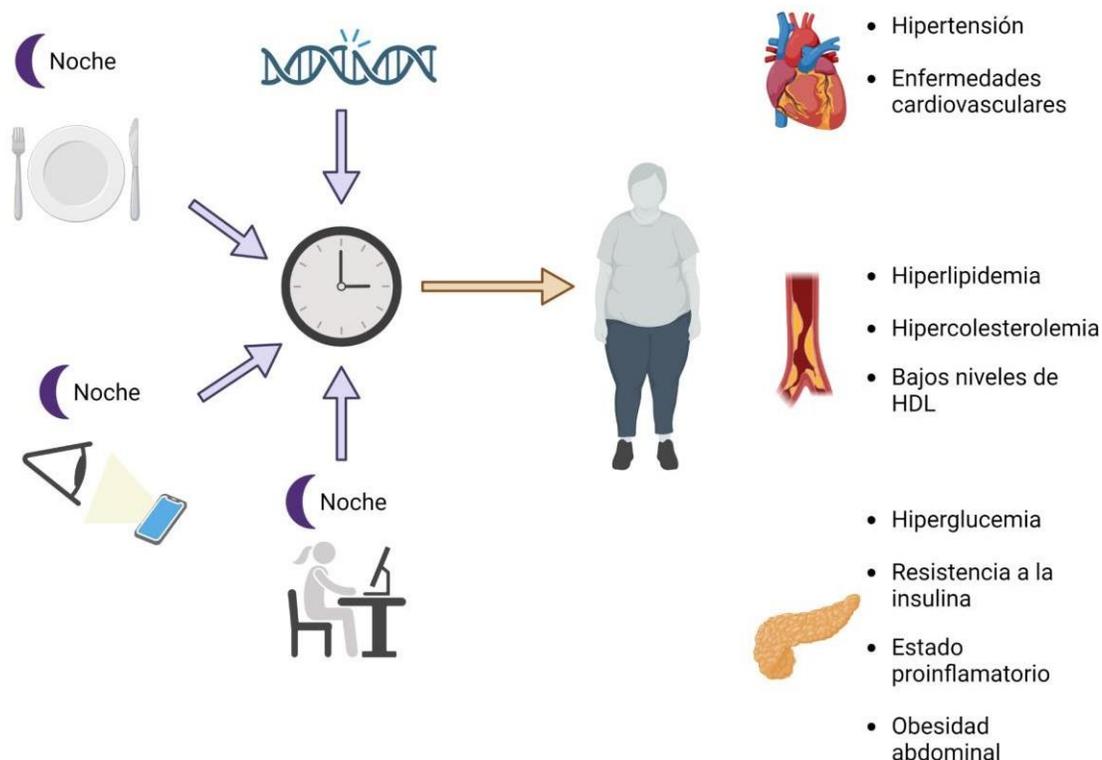


Figura 12. Efectos de la disrupción circadiana en el metabolismo en humanos. El reloj circadiano se ve afectado por variables con distintas etiologías. Las mutaciones genéticas, la disrupción en el consumo de alimento, la exposición a la luz y el trabajo nocturno pueden provocar alteraciones en el reloj circadiano que tenga como consecuencias distintas alteraciones metabólicas en órganos importantes. Modificado de Narjis y Sobia, 2020.

Creado en Biorender.com

Estudios en ratones han demostrado que las mutaciones en genes del reloj comúnmente muestran fenotipos diabéticos u obesos y poseen defectos en vías metabólicas centrales como la secreción de insulina y gluconeogénesis (Marcheva et al., 2013; Turek et al., 2005). Además, desincronizaciones circadianas en roedores comúnmente provocan hiperfagia, resistencia a la insulina e hiperlipidemia (Li et al., 2012; Morris et al., 2012). En humanos, la desincronización circadiana eleva los niveles de glucosa, insulina y triglicéridos (Scheer et al., 2009; Ribeiro et al., 1998) y disminuye los niveles de gasto energético (McHill et al., 2014; revisado en Poggiogalle et al., 2017). Cambios en la duración del periodo de sueño y baja calidad de este interfiere con el sistema endócrino y está estrechamente relacionado con la resistencia a la insulina, diabetes tipo 2 y obesidad (Zizi et

al., 2010). La privación de sueño combinada con una desincronización circadiana está relacionada experimentalmente a una menor tasa metabólica basal y un aumento en los niveles de glucosa plasmática postprandial (Buxton et al., 2012); también reduce la leptina (Mullington et al., 2003), incrementa los niveles de ghrelina y promueve la sensación de hambre (Schmid et al., 2008; revisado en Rienke et al., 2019). La leptina y la ghrelina son fuertes modificadores del metabolismo (Cui et al., 2017) y están controlados por el reloj circadiano (Kalsbeek et al., 2001; Laermans et al., 2015) por lo que no es sorpresa que las interrupciones circadianas inducidas por factores externos como el jet-lag, causen obesidad y resistencia a la leptina (Kettner et al., 2015). Además, desórdenes congénitos en el ritmo de sueño como el síndrome de la fase avanzada del sueño, causada por mutaciones en genes de reloj que codifican para *CK1δ*, *PER2* (Xu et al., 2005) o *CRY2* (Hirano et al., 2016), genera que los individuos afectados tengan sueño en la tarde y se despierten a la mitad de la noche, dando lugar a una incapacidad de llevar a cabo una vida social normal. De igual forma, una mutación específica en *CRY1* puede tener el efecto opuesto y causar un atraso en la fase de sueño (Patke et al., 2017). Lo más importante es que debido a que estas personas deben forzar el ajuste al ritmo “normal”, el ritmo circadiano de estas personas con desórdenes en el ciclo sueño-vigilia están constantemente desincronizados con el ambiente (Rienke et al., 2019).

Estudios experimentales de la desincronización circadiana

Debido a que la desincronización circadiana es difícil de medir, es indispensable contar con protocolos válidos para estudiar su comportamiento y sus efectos. Estos protocolos deben de forzar la desincronización de alguna manera, la más común es donde los individuos son expuestos a condiciones constantes diarias de luz tenue para evaluar su comportamiento con base en el reloj interno sin el enmascaramiento por la luz. Esto permite la medición no solo de los parámetros base de los ritmos circadianos (amplitud, periodo, fase, etc.), sino que también permite examinar los efectos de la desincronización entre ritmos circadianos y ciclos del comportamiento en la fisiología humana. Estos protocolos deben demostrar que la desalineación circadiana tiene efectos sobre el metabolismo de los humanos para poder ser válidos. Por ejemplo, algunos protocolos que evalúan la ingesta calórica proveen a los sujetos examinados de desayuno, comida, cena y meriendas los cuales no representan los mismos patrones de consumo calórico que en condiciones no experimentales, siendo estas más

erráticas. Por lo tanto, es necesario estandarizar estos protocolos para que los resultados, aunque no sean perfectos, sean constantes entre los mismos y los resultados sean comparables (Evans y Davidson, 2013).

Un concepto importante de considerar es el cronotipo, el cual ha sido definido por Roenneberg como la fase en la cual un individuo se sincroniza con el día (Roenneberg, 2012; revisado en Vetter, 2020). La medición del momento de liberación de melatonina es un marcador aceptado para determinar la fase circadiana en humanos (Arendt, 2006; Benloucif et al., 2008; revisado en Vetter, 2020). Para evitar efectos de enmascaramiento, es común recolectar muestras repetidas de plasma o saliva en condiciones de luz tenue, aunque otros parámetros fisiológicos como la temperatura corporal también pueden ser usados para estimar la fase circadiana, pero son más sensibles a enmascaramiento de otros factores como la actividad física o el sueño que los ritmos de melatonina. Por último, un recurso menos costoso es la evaluación del tiempo de sueño en días libres (sin alarmas) o por diarios o cuestionarios de sueño como el cuestionario de Cronotipo de Múnich (Vetter, 2020)

Impacto del trabajo nocturno en la salud metabólica

El trabajo por turnos es un esquema de trabajo no tradicional en donde los trabajadores laboran turnos de distintas horas durante el día o la noche. La sociedad moderna depende de operaciones que corren las 24 horas del día, por lo que se estima que hasta un 20% de trabajadores en naciones industrializadas tienen este tipo de trabajo (Antunes et al., 2010).

El trabajo nocturno en personas tiene efectos negativos en el metabolismo de los nutrientes y las personas que lo realizan tienen un riesgo más grande de desarrollar diabetes y enfermedades cardiovasculares específicamente por la alteración del ciclo sueño-vigilia, lo que lleva a una disrupción del reloj interno (Rienke y Asher, 2019). La síntesis de melatonina ocurre durante el periodo de oscuridad y resulta en la inducción de sueño en humanos. El trabajo nocturno y la exposición a luces artificiales en la noche altera la síntesis de melatonina pineal (Panda et al., 2002). La reducción en la síntesis de melatonina en humanos altera los ciclos de sueño-vigilia, disminuye la sensibilidad a la insulina, la intolerancia a la glucosa, y eventualmente lleva a la obesidad (Cipolla-Neto et al., 2014; revisado en Narjis y Sobia, 2020).

Para simular el trabajo por turnos en condiciones experimentales, se somete a los individuos a actividades de bajo estrés durante las horas nocturnas para mantener el estado de alerta por varios días en el laboratorio. En modelos de roedores nocturnos, el trabajo por turnos por rotación (como en enfermeras o doctores) ha sido simulado a través del uso de alternancia de ciclos de L:O, mientras que para el trabajo por turnos con noche fija (como un policía que trabaja en la seguridad de las calles por la noche) se administran horarios de trabajo diurno (haciendo a los ratones correr en una rueda) y se restringe el acceso a alimento. Los estudios actuales en ratones y ratas han demostrado que el momento en el que se realiza la actividad tiene efectos metabólicos, aunque el número de estudios es limitado. Los resultados en general sugieren que los cambios en el horario de luz/oscuridad afectan algunos parámetros metabólicos como peso corporal y metabolismo de la glucosa (Evans y Davidson, 2013).

Efecto de la intensidad de la luz durante la noche en la salud metabólica

Los seres humanos pasan la mayoría del tiempo bajo techo, lo cual disminuye drásticamente la exposición a la luz solar. Además, nos exponemos a luz artificial en las noches, lo cual resulta en una señal de luz/obscuridad debilitada (Vetter, 2020).

La exposición a luz brillante durante el día incrementa la secreción de melatonina nocturna (Park y Tokura 1999), por lo que falta de luz brillante durante el día puede atenuar los ritmos de reloj central y consecuentemente afectar el metabolismo. Varios experimentos han reportado que la terapia de luz de alta intensidad en la mañana mejora el metabolismo de carbohidratos y la pérdida de grasa. Por otro lado, la exposición aguda a luz brillante (>500–600 lux) en la tarde incrementa la resistencia a la insulina y eleva los niveles postprandiales de insulina, glucosa y niveles de GLP-1 relativo a la exposición a la luz tenue (<2-5 lux) (Albreiki et al., 2017; Gil-Lozano et al., 2016; revisado en Poggiogalle et al., 2018). En estudios realizados con ratones, se ha demostrado que la exposición a luces artificiales en la noche puede causar disrupción circadiana. Ratones expuestos a luz intensa constante por 24 horas mostraron una intolerancia a la glucosa y ganancia de peso sin haber incrementado el consumo calórico cuando se les comparó con ratones expuestos a un ciclo de luz-oscuridad normal (Fonken et al., 2014).

Se ha observado que los ratones en respuesta a 24 horas de exposición continua a la luz incrementaron su consumo de alimentos y disminuyeron su gasto energético. La ganancia de

peso fue más rápida en ratones expuestos a luz constante en comparación con ratones sometidos a una dieta alta en grasas. Esto explica el rol de la exposición a luz constante en la desregulación circadiana del metabolismo, ya que cuando estos ratones se regresaron a un ciclo de luz-obscuridad normal, recuperaron su habilidad para metabolizar la glucosa y mejoró su consumo alimenticio (Fonken et al., 2013; revisado en Narjis y Sobia, 2020).

La exposición a la luz durante la noche es una característica de las condiciones ambientales en las que vivimos actualmente. Las fluctuaciones anuales en la longitud de los días generan cambios en el tiempo de exposición a la luz solar, por lo que el uso de luces artificiales en humanos atenúa estos cambios estacionales (Narjis y Sobia, 2020).

Implicaciones en el metabolismo ocasionados por tiempos de comida irregulares

Los tiempos de alimentación son muy importantes para la sincronización adecuada de las vías metabólicas que se encargan del aprovechamiento de los nutrientes. Los patrones de alimentación en ratones están coordinados por el NSQ el cual regula la secreción de hormonas relacionadas a la alimentación de una manera circadiana, como la ghrelina y leptina (Kalsbeek et al., 2001). Los niveles de leptina se encuentran disminuidos en humanos que comen durante la noche, lo cual provoca un aumento de consumo de alimento en la misma (Milano et al., 2012). Aun así, la evidencia es contraria en este tema, pues algunos estudios han demostrado que los niveles de leptina son similares entre individuos que comen la noche y el grupo control que ingiere alimentos durante el día (Allison et al., 2005; Haraguchi et al., 2018).

El modelo de restricción de alimento (TRF por sus siglas en inglés) consiste en limitar la ingesta de alimentos a una ventana de tiempo que coincide con el periodo de actividad, comúnmente de 12 horas, pero recientemente se han implementado ventanas de 10, 8 y hasta 6 horas. En roedores, un TRF de 8-12 horas durante la noche subjetiva logra prevenir obesidad independientemente de la ingesta calórica y a mayor restricción se han observado mayores beneficios, aunque un tratamiento conjunto de déficit calórico con TRF causa los mayores beneficios en roedores (Manoogian et al., 2022).

Los protocolos de TRF pueden causar una desconexión entre la luz (NSQ) y los osciladores que responden a la alimentación cuando son implementados durante la fase inactiva del sujeto (noche en humanos y día en roedores), mientras que bajo condiciones *ad libitum* los ritmos

de alimentación están sincronizados y controlados por el NSQ.

El TRF ha demostrado reducir enfermedades metabólicas y revertir el desarrollo de desórdenes metabólicos en ratones con obesidad y diabetes tipo 2 preexistentes (Chaix et al., 2014) cuando se implementa durante la fase de actividad. Además, el TRF en ratones resulta en una pérdida de peso rápida, restaura la tolerancia a la glucosa y disminuye la severidad de la esteatosis hepática. Los ratones expuestos a este régimen alimenticio muestran mayores niveles de actividad que los ratones con alimentación libre (Chung et al., 2011).

En ratones knockout para *Cry1*, *Cry2*, *Bmal1* y *Rev-erb α/β* específico de hígado, la restricción en la ventana de alimentación previene obesidad y problemas metabólicos, como intolerancia a la glucosa, hígado graso y dislipidemias, comparado con ratones knockout expuestos a una alimentación libre durante el día (Chaix et al., 2014). Por otro lado, cuando a ratones juveniles sometidos a TRF durante su infancia se les deja un periodo de alimentación libre durante la adultez, muestran daños severos e irreparables como desórdenes metabólicos, aumento de peso, supresión del sistema inmune, retraso en la madurez sexual y un aumento en el riesgo a desarrollar enfermedades cardiovasculares (Hu et al., 2019; revisado en Narjis y Sobia, 2020).

En humanos, cuando el inicio de la ventana de alimentación es temprano en el día se observa un aumento en la sensibilidad a la insulina y mejoramiento de la función de las células β , así como disminución en la presión sanguínea y el estrés oxidativo (Sutton et al., 2018). Además, TRF en humanos ha mostrado disminuir el peso corporal, los niveles circulantes de glucosa, triglicéridos, LDL y aumenta los niveles circulantes de HDL (Rothschild et al., 2014; revisado en Narjis y Sobia, 2020).

Aunque se han llevado a cabo investigaciones en varios modelos animales, se ha observado que los protocolos experimentales se enfocan en problemas muy específicos, como la rotación de turnos, el desfase horario o el trabajo forzado durante el período de descanso. También existen protocolos que no tienen un equivalente claro en la vida social humana, pero que presentan un desafío para lograr una desincronización circadiana, como los períodos de duración distinta a 24 horas.

El uso de modelos animales nos permite comprender mejor los efectos de las manipulaciones

en el ambiente de luz sobre los aspectos metabólicos. La variabilidad en las respuestas observadas indica que la forma en que los organismos responden está influenciada tanto por el protocolo de fotoperiodo como por el de alimentación, además de depender del modelo biológico utilizado. Estudiar una variedad más amplia de organismos con fisiología similar nos ayudaría a determinar si algunas consecuencias experimentales son específicas del modelo utilizado o si pueden considerarse como una respuesta general en el grupo de estudio.

PROPUESTA DE PROTOCOLO EXPERIMENTAL EN LOS EFECTOS DE DESINCRONIZACIÓN CIRCADIANA

Los ciclos irregulares de sueño y vigilia también ocurren en otros sectores de la población; un ejemplo son los adultos jóvenes que suelen presentar horarios irregulares agudizados en los fines de semana y que pueden ser un factor detonante de diversos problemas metabólicos. Para estudiar el efecto que puede tener la desincronización circadiana causada por horarios irregulares, este protocolo experimental sugiere evaluar las consecuencias de la exposición a fotoperiodos irregulares sobre la conducta y la fisiología. Se propone como modelo experimental al ratón de los volcanes *Neotomodon alstoni* ya que en estos ratones, los cuales son criados en bioterio, existe una parte variable de la población más susceptible a desarrollar obesidad (Miranda-Anaya et al; 2019), debido a esta susceptibilidad, es interesante revisar si las alteraciones en la regularidad del fotoperiodo tienen impacto sobre los procesos fisiológicos y conductuales regulados de manera circadiana.

En los ratones adultos *N. alstoni* existe diversidad de fenotipos entre obesos y delgados. En investigaciones previas se ha observado que los ratones obesos muestran una desorganización circadiana comparada con los delgados, tanto en amplitud como en fase de diversos parámetros fisiológicos y conductuales (Miranda-Anaya et al; 2019). Se ha planteado la pregunta si es la obesidad la que lleva a un estado de organización circadiana distinta, o si es posible inducir dicha condición por efecto de una desincronización circadiana con el ambiente y que, además, induzca un cambio hacia la obesidad. Esta pregunta ha sido investigada en otros modelos animales con resultados variables; en nuestro caso el uso del modelo de *Neotomodon* es interesante por su vulnerabilidad a desarrollar obesidad sin inducir

con dietas hipocalóricas.

El presente trabajo tiene como propuesta plantear un escenario que permita conocer si es posible inducir una condición de desincronización circadiana en animales que se han mantenido delgados hasta su condición adulta, y que estuviera vinculada a desórdenes

conductuales y metabólicos como los que se aprecian en otros protocolos y modelos biológicos.

El protocolo consiste en la exposición semanal de iluminación en un formato zig-zag, caracterizado por tres ciclos L:O de 26 horas, seguidos de desfase horario de 4 horas, y continuar con tres ciclos de 22 horas. El protocolo sostenido durante tres meses debe evitar mantener una fase estable entre el NSQ y osciladores periféricos para poder forzar una desincronización circadiana interna.

Además, este protocolo permitirá entender si se puede evaluar una posible desincronización circadiana que sea referencia para estudios en otros niveles como el fisiológico y el molecular entre el NSQ del hipotálamo y los osciladores periféricos.

Un candidato importante son la expresión de proteínas de reloj PER1 y BMAL1, así como de algunas proteínas que retroalimentan al reloj circadiano, como la SIRT1 y PPAR en hígado.

En este sentido, si la exposición crónica a un fotoperiodo irregular tiene efectos en la amplitud de expresión de proteínas de reloj PER1 y BMAL1, así como en proteínas SIRT1 y PPARS en hígado, se puede considerar que horarios irregulares de iluminación pueden producir desincronización circadiana.

Estrategia metodológica

La metodología del protocolo se encuentra ilustrada en la figura 13. Durante todo el protocolo la disponibilidad de agua potable y alimento estándar para roedores será *ad libitum*. Los ratones serán aclimatados en una habitación con temperatura y fotoperiodo controlado. El mantenimiento de los animales, así como el registro de peso de los ratones se realizará una vez a la semana; durante el protocolo de luz-oscuridad se hará el mantenimiento en la fotofase.

Dado a que los ratones que desarrollan sobrepeso u obesidad se diferencian entre 4 y 7 meses de edad, se usarán ratones macho que tengan alrededor de un año y que hayan mantenido su peso estable durante los últimos dos meses. La especie tiene un periodo de vida de hasta 5 años de acuerdo con previas observaciones, por lo que se consideran ratones adultos jóvenes (Ayala-Guerrero et al., 1998).

Los estudios conductuales serán desarrollados como se ha señalado anteriormente (Arellanes-Licea et al., 2021):

1. Se expondrá a los individuos a tres semanas de aclimatación en el cuarto bioterio de la UMDI Juriquilla.
2. Los ratones serán introducidos a una cámara de ambiente controlado (ADAPTIS 1000) donde se mantendrá constantes la temperatura, la humedad y la ventilación.

La iluminación será controlada mediante un temporizador doméstico y tiras de luces LED blancas hasta lograr una intensidad de 300 Lx. Las cámaras están adicionadas con un sistema automatizado de registro basado en sensores infrarrojos, que al ser cruzados permiten detectar la actividad locomotriz de los ratones de manera individual (ACTIBIO).

Protocolo de fotoperiodo irregular:

1. Se pondrán 16 ratones macho en una cámara de ambiente controlado (ADAPTIS 1000, CONVIRON), donde durante 2 semanas permanecerán con un fotoperiodo LO 12:12 (fotofase 06:00-18:00).
2. Posteriormente se cambiará el fotoperiodo irregular. Ese patrón se repetirá durante al menos 3 meses.
3. Un grupo control de 12 ratones permanecerá fuera de la cámara de ambiente controlado, en un fotoperiodo LO 12:12 y una temperatura regulada entre 21-24°C durante los 3 meses que dure el experimento de fotoperiodo irregular para ser considerado como grupo control externo, dado a que es necesario corroborar si los posibles cambios no se deben a la edad aún en condiciones de fotoperiodo L:D 12:12.

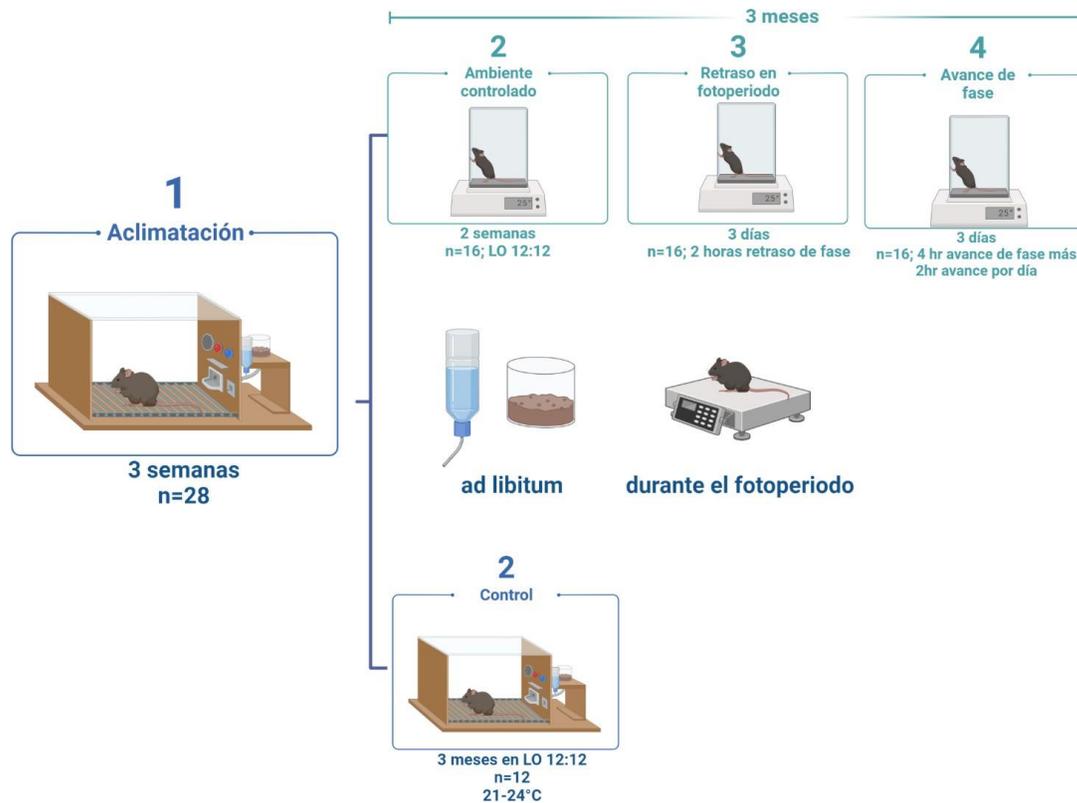


Figura 13. Metodología del protocolo de investigación de desincronización circadiana en *Neotomodon alstoni* que muestra el periodo de aclimatación de 3 semanas. Posteriormente, un grupo experimental con exposición a fotoperiodo irregular durante 3 meses y un grupo control que se mantendrá en un fotoperiodo regular durante 3 meses. Ambos grupos tendrán comida y agua ad libitum. Las mediciones experimentales se realizarán durante el fotoperiodo.

Creado en Biorender.com

Protocolo de muestreo por técnica Western blot:

La técnica de Western blot (también conocida como inmunotransferencia o immunoblotting) es una técnica de laboratorio conformada por la separación de las proteínas de una muestra mediante electroforesis en gel y ampliamente utilizada en investigación biomédica y biotecnológica, ya que permite identificar y cuantificar proteínas específicas, lo que puede ser útil para investigar su función y expresión en diferentes procesos biológicos. El proceso de Western blot implica varias etapas. Primero, se realiza una separación de las proteínas presentes en la muestra mediante una técnica de electroforesis en gel, donde se utilizan

campos eléctricos para mover las proteínas a través de un gel de poliacrilamida, que es un paso crítico donde las proteínas se separan según su tamaño y carga eléctrica permitiendo su visualización y posterior transferencia a una membrana.

La transferencia a una membrana permite la detección de las proteínas de interés mediante la utilización de anticuerpos específicos. La selección del anticuerpo primario es un paso importante en la técnica de Western blot, ya que debe ser altamente específico para la proteína de interés y no unirse a otras proteínas no deseadas en la muestra. Se realiza la incubación de la membrana con un anticuerpo primario específico que se une a la proteína de interés. La detección del anticuerpo primario se realiza mediante la utilización de un anticuerpo secundario etiquetado con una sustancia química como una enzima o un fluoróforo. La señal generada por el anticuerpo secundario se detecta mediante técnicas de imagen, como la quimioluminiscencia o la fluorescencia, lo que permite la visualización de la proteína de interés.

Las muestras de hígado extraídas en el experimento de desincronización circadiana serán homogeneizadas en una mezcla de inhibidores de proteasas y buffer RIPA para después ser analizados mediante la técnica de Western blot, utilizando protocolos estandarizados (Arellanes-Licea et al., 2014 y Miranda-Anaya et al; 2019). Se usarán anticuerpos primarios específicos policlonales (PER1, BMAL1, SIRT1, PPAR α) y el control de expresión constitutiva será la proteína GAPDH o Tubulina. Las bandas serán visualizadas con el kit AP Conjugate Substrate (Bio-Rad Laboratories) y las membranas digitalizadas con el programa Image J (versión 1.38, NIH, USA). Las proteínas de reloj serán normalizadas a la señal del constitutivo de acuerdo con previos trabajos publicados (Arellanes-Licea et al., 2014 y Miranda-Anaya et al; 2019).

En el caso de que la desincronización circadiana con fotoperiodo irregular tenga un efecto metabólico en *N. alstoni*, observaremos un cambio en la expresión de las proteínas de reloj PER1, BMAL1, SIRT1 y PPARs en el grupo experimental los cuales estarán relacionados con un aumento en marcadores de obesidad.

Conclusión

Los ritmos circadianos en humanos se han visto afectados en las últimas décadas debido a los avances tecnológicos que rompen con los patrones naturales de la ritmicidad diarias de luz, temperatura, acceso al alimento y otros factores biológicos que generan una desincronización circadiana causada por actividades como el trabajo por turnos, la ingesta de alimento y/o exposición a luz durante la noche, los cambios de horario, entre otros. Estas actividades están vinculadas con una mayor incidencia de enfermedades metabólicas debido a su disrupción en la liberación de hormonas con efectos cronobiológicos como la melatonina. Dentro de los efectos más importantes que ocurren por un estado de desincronización circadiana se encuentran la resistencia a la insulina, la intolerancia a la glucosa, perturbaciones de sueño, hiperlipidemia, aumento del riesgo de enfermedades cardiovasculares, y obesidad. Es sumamente importante tener un método para evaluar de manera eficaz el estadio cronobiológico con técnicas fiables que permitan tratar estos síndromes a través de intervenciones como la restricción en la ventana de alimento, terapias hormonales, o intervenciones cronobiológicas pertinentes. Por lo tanto, la propuesta de este trabajo es evaluar un protocolo experimental que permita medir los efectos de la desincronización circadiana crónica en los tejidos periféricos y su posible afección metabólica.

Referencias

1. Adamovich, Y., Rouso-Noori, L., Zwihaft, Z., Neufeld-Cohen, A., Golik, M., Kraut-Cohen, J., Wang, M., Han, X., & Asher, G. (2014). Circadian clocks and feeding time regulate the oscillations and levels of hepatic triglycerides. *Cell metabolism*, *19*(2), 319–330. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.12.016>
2. Adamovich, Y., Ladeux, B., Golik, M., Koeners, M. P., & Asher, G. (2017). Rhythmic Oxygen Levels Reset Circadian Clocks through HIF1 α . *Cell metabolism*, *25*(1), 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.09.014>
3. Aguilar, R. (2015). Mechanisms of Circadian Systems in Animals and Their Clinical Relevance. *International Review of Neurobiology*, *123*, 43-78. doi: 10.1016/bs.irn.2015.06.001
4. Albreiki, M. S., Middleton, B., & Hampton, S. M. (2017). A single night light exposure acutely alters hormonal and metabolic responses in healthy participants. *Endocrine connections*, *6*(2), 100–110. <https://doi.org/10.1530/EC-16-0097>
5. Alenghat, T., Meyers, K., Mullican, S. E., Leitner, K., Adeniji-Adele, A., Avila, J., Bućan, M., Ahima, R. S., Kaestner, K. H., & Lazar, M. A. (2008). Nuclear receptor corepressor and histone deacetylase 3 govern circadian metabolic physiology. *Nature*, *456*(7224), 997–1000. <https://doi.org/10.1038/nature07541>
6. Allison, K. C., Ahima, R. S., O'Reardon, J. P., Dinges, D. F., Sharma, V., Cummings, D. E., Heo, M., Martino, N. S., & Stunkard, A. J. (2005). Neuroendocrine profiles associated with energy intake, sleep, and stress in the night eating syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, *90*(11), 6214–6217. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-1018>
7. Antunes, L. C., Levandovski, R., Dantas, G., Caumo, W., & Hidalgo, M. P. (2010). Obesity and shift work: chronobiological aspects. *Nutrition research reviews*, *23*(1), 155–168. <https://doi.org/10.1017/S0954422410000016>
8. Aparicio, N. J., Puchulu, F. E., Gagliardino, J. J., Ruiz, M., Llorens, J. M., Ruiz, J., Lamas, A., & De Miguel, R. (1974). Circadian variation of the blood glucose, plasma insulin and human growth hormone levels in response to an oral glucose load in normal subjects. *Diabetes*, *23*(2), 132–137. <https://doi.org/10.2337/diab.23.2.132>
9. Arellanes-Licea, E. D. C., Pérez-Mendoza, M., Carmona-Castro, A., Díaz-Muñoz, M., & Miranda-Anaya, M. (2021). Obese *Neotomodon alstoni* mice exhibit sexual dimorphism in the daily profile of circulating melatonin and clock proteins PER1 and

- BMAL1 in the hypothalamus and peripheral oscillators. *Chronobiology international*, 38(4), 584–597. <https://doi.org/10.1080/07420528.2020.1860999>
10. Arellanes-Licea, E., Caldelas, I., De Ita-Pérez, D., & Díaz-Muñoz, M. (2014). The circadian timing system: a recent addition in the physiological mechanisms underlying pathological and aging processes. *Aging and disease*, 5(6), 406–418. <https://doi.org/10.14336/AD.2014.0500406>
 11. Aton, S. J., Huettner, J. E., Straume, M., & Herzog, E. D. (2006). GABA and Gi/o differentially control circadian rhythms and synchrony in clock neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(50), 19188–19193. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607466103>
 12. Ayala-Guerrero, F., Vargas-Reyna, L., Ramos, J. I., & Mexicano, G. (1998). Sleep patterns of the volcano mouse (*Neotomodon alstoni alstoni*). *Physiology & behavior*, 64(4), 577–580. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(98\)00081-x](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(98)00081-x)
 13. Balsalobre, A., Damiola, F., & Schibler, U. (1998). A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*, 93(6), 929–937. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81199-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81199-x)
 14. Borges-Silva, C. N., Fonseca-Alaniz, M. H., Alonso-Vale, M. I., Takada, J., Andreotti, S., Peres, S. B., Cipolla-Neto, J., Pithon-Curi, T. C., & Lima, F. B. (2005). Reduced lipolysis and increased lipogenesis in adipose tissue from pinealectomized rats adapted to training. *Journal of pineal research*, 39(2), 178–184. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2005.00241.x>
 15. Bugge, A., Feng, D., Everett, L. J., Briggs, E. R., Mullican, S. E., Wang, F., Jager, J., & Lazar, M. A. (2012). Rev-erba and Rev-erbb coordinately protect the circadian clock and normal metabolic function. *Genes & development*, 26(7), 657–667. <https://doi.org/10.1101/gad.186858.112>
 16. Buxton, O. M., Cain, S. W., O'Connor, S. P., Porter, J. H., Duffy, J. F., Wang, W., Czeisler, C. A., & Shea, S. A. (2012). Adverse metabolic consequences in humans of prolonged sleep restriction combined with circadian disruption. *Science translational medicine*, 4(129), 129ra43. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003200>
 17. Cannon, B., & Nedergaard, J. (2011). Nonshivering thermogenesis and its adequate measurement in metabolic studies. *The Journal of experimental biology*, 214(Pt 2), 242–253. <https://doi.org/10.1242/jeb.050989>
 18. Carrasco-Benso, M. P., Rivero-Gutierrez, B., Lopez-Minguez, J., Anzola, A., Diez-Noguera, A., Madrid, J. A., Lujan, J. A., Martínez-Augustin, O., Scheer, F. A., &

- Garaulet, M. (2016). Human adipose tissue expresses intrinsic circadian rhythm in insulin sensitivity. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 30(9), 3117–3123. <https://doi.org/10.1096/fj.201600269RR>
19. Chaix, A., Zarrinpar, A., Miu, P., & Panda, S. (2014). Time-restricted feeding is a preventative and therapeutic intervention against diverse nutritional challenges. *Cell metabolism*, 20(6), 991–1005. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.11.001>
20. Chen, L., & Yang, G. (2014). PPARs Integrate the Mammalian Clock and Energy Metabolism. *PPAR research*, 2014, 653017. <https://doi.org/10.1155/2014/653017>
21. Cho, H., Zhao, X., Hatori, M., Yu, R. T., Barish, G. D., Lam, M. T., Chong, L. W., DiTacchio, L., Atkins, A. R., Glass, C. K., Liddle, C., Auwerx, J., Downes, M., Panda, S., & Evans, R. M. (2012). Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB- α and REV-ERB- β . *Nature*, 485(7396), 123–127. <https://doi.org/10.1038/nature11048>
22. Chung, S., Son, G. H., & Kim, K. (2011). Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: its regulation and clinical implications. *Biochimica et biophysica acta*, 1812(5), 581–591. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.02.003>
23. Cipolla-Neto, J., Amaral, F. G., Afeche, S. C., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2014). Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. *Journal of pinealresearch*, 56(4), 371–381. <https://doi.org/10.1111/jpi.12137>
24. Cui, H., López, M., & Rahmouni, K. (2017). The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. *Nature reviews. Endocrinology*, 13(6), 338–351. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.222>
25. Dallmann, R., Viola, A. U., Tarokh, L., Cajochen, C., & Brown, S. A. (2012). The human circadian metabolome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(7), 2625–2629. <https://doi.org/10.1073/pnas.1114410109>
26. Demacker, P. N., Schade, R. W., Jansen, R. T., & Van 't Laar, A. (1982). Intra-individual variation of serum cholesterol, triglycerides and high density lipoprotein cholesterol in normal humans. *Atherosclerosis*, 45(3), 259–266. [https://doi.org/10.1016/0021-9150\(82\)90227-1](https://doi.org/10.1016/0021-9150(82)90227-1)
27. Emans, T. W., Janssen, B. J., Joles, J. A., & Krediet, C. T. P. (2017). Circadian Rhythm in Kidney Tissue Oxygenation in the Rat. *Frontiers in physiology*, 8, 205. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00205>

28. Esteve Ràfols M. (2014). Adipose tissue: cell heterogeneity and functional diversity. *Endocrinologia y nutricion : organo de la Sociedad Espanola de Endocrinologia y Nutricion*, 61(2), 100–112. <https://doi.org/10.1016/j.endonu.2013.03.011>
29. Evans, J. A., & Davidson, A. J. (2013). Health consequences of circadian disruption in humans and animal models. *Progress in molecular biology and translational science*, 119, 283–323. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396971-2.00010-5>
30. Fatima, N., & Rana, S. (2020). Metabolic implications of circadian disruption. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 472(5), 513–526. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02381-6>
31. Feigin, R. D., Klainer, A. S., & Beisel, W. R. (1967). Circadian periodicity of blood amino-acids in adult men. *Nature*, 215(5100), 512–514. <https://doi.org/10.1038/215512b0>
32. Feng, D., Liu, T., Sun, Z., Bugge, A., Mullican, S. E., Alenghat, T., Liu, X. S., & Lazar, M. A. (2011). A circadian rhythm orchestrated by histone deacetylase 3 controls hepatic lipid metabolism. *Science (New York, N.Y.)*, 331(6022), 1315–1319. <https://doi.org/10.1126/science.1198125>
33. Feng, D., & Lazar, M. A. (2012). Clocks, metabolism, and the epigenome. *Molecular cell*, 47(2), 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.06.026>
34. 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>
35. Froy O. (2007). The relationship between nutrition and circadian rhythms in mammals. *Frontiers in neuroendocrinology*, 28(2-3), 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2007.03.001>
36. Garaulet, M., Ordovas, J. M., & Turek, F. (2013). Discovery of the Clock Mutant and the First Mammalian Clock Gene and the Links to Obesity: Starting with Animal #25. In *Chronobiology and Obesity* (pp. 1–11). essay, Springer.
37. Gill, S., & Panda, S. (2015). A Smartphone App Reveals Erratic Diurnal Eating Patterns in Humans that Can Be Modulated for Health Benefits. *Cell metabolism*, 22(5), 789–798. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.005>
38. Grabner, W., Matzkies, F., Prestele, H., Rose, A., Daniel, U., Phillip, J., & Fischer, K. (1975). Untersuchungen zur circadianen Rhythmik der Glucosetoleranz [Diurnal

- variation of glucose tolerance and insulin secretion in man (author's transl)]. *Klinische Wochenschrift*, 53(16), 773–778. <https://doi.org/10.1007/BF01614859>
39. Gumz, M. L. (2016). *Physiology in Health and Disease*. John Wiley & Sons.
40. Halkes, C. J., Castro Cabezas, M., van Wijk, J. P., & Erkelens, D. W. (2001). Gender differences in diurnal triglyceridemia in lean and overweight subjects. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*, 25(12), 1767–1774. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801831>
41. Halkes, C. J., Van Wijk, J. P., Ribalta, J., Masana, L., & Castro Cabezas, M. (2004). Diurnal triglyceridaemia and insulin resistance in mildly obese subjects with normal fasting plasma lipids. *Journal of internal medicine*, 255(1), 74–81. <https://doi.org/10.1046/j.0954-6820.2003.01252.x>
42. Haraguchi, A., Fukuzawa, M., Iwami, S., Nishimura, Y., Motohashi, H., Tahara, Y., & Shibata, S. (2018). Night eating model shows time-specific depression-like behavior in the forced swimming test. *Scientific reports*, 8(1), 1081. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19433-8>
43. Hastings, M. H., Maywood, E. S., & Brancaccio, M. (2018). Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Nature reviews. Neuroscience*, 19(8), 453–469. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0026-z>
44. Hems, D. A., Rath, E. A., & Verrinder, T. R. (1975). Fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of normal and genetically obese (ob/ob) mice during the 24-hour cycle. *The Biochemical journal*, 150(2), 167–173. <https://doi.org/10.1042/bj1500167>
45. Herrero, L., Valcarcel, L., da Silva, C. A., Albert, N., Diez-Noguera, A., Cambras, T., & Serra, D. (2015). Altered circadian rhythm and metabolic gene profile in rats subjected to advanced light phase shifts. *PloS one*, 10(4), e0122570. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122570>
46. Hirano, A., Shi, G., Jones, C. R., Lipzen, A., Pennacchio, L. A., Xu, Y., Hallows, W. C., McMahon, T., Yamazaki, M., Ptáček, L. J., & Fu, Y. H. (2016). A Cryptochrome 2 mutation yields advanced sleep phase in humans. *eLife*, 5, e16695. <https://doi.org/10.7554/eLife.16695>
47. Hu, D., Mao, Y., Xu, G., Liao, W., Ren, J., Yang, H., Yang, J., Sun, L., Chen, H., Wang, W., Wang, Y., Sang, X., Lu, X., Zhang, H., & Zhong, S. (2019). Time-restricted feeding causes irreversible metabolic disorders and gut microbiota shift in pediatric mice. *Pediatric research*, 85(4), 518–526. <https://doi.org/10.1038/s41390-018-0156-z>

48. Jarrett, R. J., Baker, I. A., Keen, H., & Oakley, N. W. (1972). Diurnal variation in oral glucose tolerance: blood sugar and plasma insulin levels morning, afternoon, and evening. *British medical journal*, *1*(5794), 199–201. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.5794.199>
49. Jiang, Z. G., Allen, C. N., & North, R. A. (1995). Presynaptic inhibition by baclofen of retinohypothalamic excitatory synaptic transmission in rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*, *64*(3), 813–819. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)00429-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)00429-9)
50. Jockers, R., Delagrangé, P., Dubocovich, M. L., Markus, R. P., Renault, N., Tosini, G., Cecon, E., & Zlotos, D. P. (2016). Update on melatonin receptors: IUPHAR Review 20. *British journal of pharmacology*, *173*(18), 2702–2725. <https://doi.org/10.1111/bph.13536>
51. Jordan, S. D., & Lamia, K. A. (2013). AMPK at the crossroads of circadian clocks and metabolism. *Molecular and cellular endocrinology*, *366*(2), 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.06.017>
52. Kalsbeek, A., Fliers, E., Romijn, J. A., La Fleur, S. E., Wortel, J., Bakker, O., Endert, E., & Buijs, R. M. (2001). The suprachiasmatic nucleus generates the diurnal changes in plasma leptin levels. *Endocrinology*, *142*(6), 2677–2685. <https://doi.org/10.1210/endo.142.6.8197>
53. Kalsbeek, A., Bruinstroop, E., Yi, C. X., Klieverik, L., Liu, J., & Fliers, E. (2014). Hormonal control of metabolism by the hypothalamus-autonomic nervous system-liver axis. *Frontiers of hormone research*, *42*, 1–28. <https://doi.org/10.1159/000358312>
54. Kettner, N. M., Mayo, S. A., Hua, J., Lee, C., Moore, D. D., & Fu, L. (2015). Circadian Dysfunction Induces Leptin Resistance in Mice. *Cell metabolism*, *22*(3), 448–459. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.06.005>
55. Klop, B., Cohn, J. S., van Oostrom, A. J., van Wijk, J. P., Birnie, E., & Castro Cabezas, M. (2011). Daytime triglyceride variability in men and women with different levels of triglyceridemia. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, *412*(23-24), 2183–2189. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.08.010>
56. Kononenko, N. I., Medina, I., & Dudek, F. E. (2004). Persistent subthreshold voltage-dependent cation single channels in suprachiasmatic nucleus neurons. *Neuroscience*, *129*(1), 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.06.080>

57. Kooijman, S., van den Berg, R., Ramkisoensing, A., Boon, M. R., Kuipers, E. N., Loef, M., Zonneveld, T. C., Lucassen, E. A., Sips, H. C., Chatzisprou, I. A., Houtkooper, R. H., Meijer, J. H., Coomans, C. P., Biermasz, N. R., & Rensen, P. C. (2015). Prolonged daily light exposure increases body fat mass through attenuation of brown adipose tissue activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(21), 6748–6753. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504239112>
58. Koukkari, W. L., & Sothorn, R. B. (2006). *Introducing biological rhythms: a primer on the temporal organization of life, with implications for health, society, reproduction, and the natural environment*. Springer.
59. Krishnaiah, S. Y., Wu, G., Altman, B. J., Growe, J., Rhoades, S. D., Coldren, F., Venkataraman, A., Olarerin-George, A. O., Francey, L. J., Mukherjee, S., Girish, S., Selby, C. P., Cal, S., Er, U., Sianati, B., Sengupta, A., Anafi, R. C., Kavakli, I. H., Sancar, A., Baur, J. A., ... Weljie, A. M. (2017). Clock Regulation of Metabolites Reveals Coupling between Transcription and Metabolism. *Cell metabolism*, *25*(4), 961–974.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.03.019>
60. Laermans, J., Vancleef, L., Tack, J., & Depoortere, I. (2015). Role of the clock gene *Bmal1* and the gastric ghrelin-secreting cell in the circadian regulation of the ghrelin-GOAT system. *Scientific reports*, *5*, 16748. <https://doi.org/10.1038/srep16748>
61. Lamia, K. A., Sachdeva, U. M., DiTacchio, L., Williams, E. C., Alvarez, J. G., Egan, D. F., Vasquez, D. S., Juguilon, H., Panda, S., Shaw, R. J., Thompson, C. B., & Evans, R. M. (2009). AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. *Science (New York, N.Y.)*, *326*(5951), 437–440. <https://doi.org/10.1126/science.1172156>
62. Lamia, K. A., Storch, K. F., & Weitz, C. J. (2008). Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(39), 15172–15177. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806717105>
63. Lee, P., Bova, R., Schofield, L., Bryant, W., Dieckmann, W., Slattery, A., Govendir, M. A., Emmett, L., & Greenfield, J. R. (2016). Brown Adipose Tissue Exhibits a Glucose-Responsive Thermogenic Biorhythm in Humans. *Cell metabolism*, *23*(4), 602–609. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.02.007>
64. Lekkas, D., & Paschos, G. K. (2019). The circadian clock control of adipose tissue physiology and metabolism. *Autonomic neuroscience : basic & clinical*, *219*, 66–70. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2019.05.001>

65. Leone, T. C., Weinheimer, C. J., & Kelly, D. P. (1999). A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(13), 7473–7478. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.13.7473>
66. Leone, V., Gibbons, S. M., Martinez, K., Hutchison, A. L., Huang, E. Y., Cham, C. M., Pierre, J. F., Heneghan, A. F., Nadimpalli, A., Hubert, N., Zale, E., Wang, Y., Huang, Y., Theriault, B., Dinner, A. R., Musch, M. W., Kudsk, K. A., Prendergast, B. J., Gilbert, J. A., & Chang, E. B. (2015). Effects of diurnal variation of gut microbes and high-fat feeding on host circadian clock function and metabolism. *Cell host & microbe*, 17(5), 681–689. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.03.006>
67. Li, M. D., Li, C. M., & Wang, Z. (2012). The role of circadian clocks in metabolic disease. *The Yale journal of biology and medicine*, 85(3), 387–401.
68. Liu, C., & Reppert, S. M. (2000). GABA synchronizes clock cells within the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron*, 25(1), 123–128. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80876-4](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80876-4)
69. Logan, R. W., & McClung, C. A. (2019). *Rhythms of life: circadian disruption and brain disorders across the lifespan*. *Nature reviews. Neuroscience*, 20(1), 49–65. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0088-y>
70. Longo, V. D., & Panda, S. (2016). Fasting, Circadian Rhythms, and Time-Restricted Feeding in Healthy Lifespan. *Cell metabolism*, 23(6), 1048–1059. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.06.001>
71. Manoogian, E. N. C., Chow, L. S., Taub, P. R., Laferrère, B., & Panda, S. (2022). Time-restricted Eating for the Prevention and Management of Metabolic Diseases. *Endocrine reviews*, 43(2), 405–436. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnab027>
72. Marcheva, B., Ramsey, K. M., Peek, C. B., Affinati, A., Maury, E., & Bass, J. (2013). Circadian clocks and metabolism. *Handbook of experimental pharmacology*, (217), 127–155. https://doi.org/10.1007/978-3-642-25950-0_6
73. Masri, S. (2015) Sirtuin-dependent clock control: new advances in metabolism, aging and cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 18, 521–527. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000219>
74. Mayr, B., & Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2(8), 599–609. <https://doi.org/10.1038/35085068>

75. McHill, A. W., Melanson, E. L., Higgins, J., Connick, E., Moehlman, T. M., Stothard, E. R., & Wright, K. P., Jr (2014). Impact of circadian misalignment on energy metabolism during simulated nightshift work. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(48), 17302–17307. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412021111>
76. Mendoza, J., Graff, C., Dardente, H., Pevet, P., & Challet, E. (2005). Feeding cues alter clock gene oscillations and photic responses in the suprachiasmatic nuclei of mice exposed to a light/dark cycle. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *25*(6), 1514–1522. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4397-04.2005>
77. Migliori, M. L. (2012). Ritmos circadianos en *Caenorhabditis elegans*.
78. Milano, W., De Rosa, M., Milano, L., Capasso, A. (2012) Night eating syndrome: an overview. *J Pharm Pharmacol*, *64*, 2–10. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2011.01353.x>
79. Miranda-Anaya, M., Pérez-Mendoza, M., Juárez-Tapia, C. R., & Carmona-Castro, A. (2019). The volcano mouse *Neotomodon alstoni* of central Mexico, a biological model in the study of breeding, obesity and circadian rhythms. *General and comparative endocrinology*, *273*, 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.04.024>
80. Møller, N., & Jørgensen, J. O. (2009). Effects of growth hormone on glucose, lipid, and protein metabolism in human subjects. *Endocrine reviews*, *30*(2), 152–177. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0027>
81. Moore R. Y. (2013). The suprachiasmatic nucleus and the circadian timing system. *Progress in molecular biology and translational science*, *119*, 1–28. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396971-2.00001-4>
82. Morris, C. J., Yang, J. N., Garcia, J. I., Myers, S., Bozzi, I., Wang, W., Buxton, O. M., Shea, S. A., & Scheer, F. A. (2015). Endogenous circadian system and circadian misalignment impact glucose tolerance via separate mechanisms in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(17), E2225–E2234. <https://doi.org/10.1073/pnas.1418955112>
83. Morris, C. J., Yang, J. N., & Scheer, F. A. J. L. (2012). The impact of the circadian timing system on cardiovascular and metabolic function. *Progress in brain research*, *199*, 337–358. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59427-3.00019-8>

84. Mortola J. P. (2004). Breathing around the clock: an overview of the circadian pattern of respiration. *European journal of applied physiology*, 91(2-3), 119–129. <https://doi.org/10.1007/s00421-003-0978-0>
85. Mukherji, A., Kobiita, A., Ye, T., & Chambon, P. (2013). Homeostasis in intestinal epithelium is orchestrated by the circadian clock and microbiota cues transduced by TLRs. *Cell*, 153(4), 812–827. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.020>
86. Mullington, J. M., Chan, J. L., Van Dongen, H. P., Szuba, M. P., Samaras, J., Price, N. J., Meier-Ewert, H. K., Dinges, D. F., & Mantzoros, C. S. (2003). Sleep loss reduces diurnal rhythm amplitude of leptin in healthy men. *Journal of neuroendocrinology*, 15(9), 851–854. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2003.01069.x>
87. Narasimamurthy, R., Hatori, M., Nayak, S. K., Liu, F., Panda, S., & Verma, I. M. (2012). Circadian clock protein cryptochrome regulates the expression of proinflammatory cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(31), 12662–12667. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209965109>
88. Opperhuizen, A. L., van Kerkhof, L. W., Proper, K. I., Rodenburg, W., & Kalsbeek, A. (2015). Rodent models to study the metabolic effects of shiftwork in humans. *Frontiers in pharmacology*, 6, 50. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00050>
89. Panda S. (2016). Circadian physiology of metabolism. *Science (New York, N.Y.)*, 354(6315), 1008–1015. <https://doi.org/10.1126/science.aah4967>
90. Panda, S., Antoch, M. P., Miller, B. H., Su, A. I., Schook, A. B., Straume, M., Schultz, P. G., Kay, S. A., Takahashi, J. S., & 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)
91. Park, S. J., & Tokura, H. (1999). Bright light exposure during the daytime affects circadian rhythms of urinary melatonin and salivary immunoglobulin A. *Chronobiology international*, 16(3), 359–371. <https://doi.org/10.3109/07420529909116864>
92. Partch, C. L., Green, C. B., & Takahashi, J. S. (2014). Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends in cell biology*, 24(2), 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.07.002>

93. Patke, A., Murphy, P. J., Onat, O. E., Krieger, A. C., Özçelik, T., Campbell, S. S., & Young, M. W. (2017). Mutation of the Human Circadian Clock Gene CRY1 in Familial Delayed Sleep Phase Disorder. *Cell*, *169*(2), 203–215.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.027>
94. Plat, L., Leproult, R., L'Hermite-Baleriaux, M., Fery, F., Mockel, J., Polonsky, K. S., & Van Cauter, E. (1999). Metabolic effects of short-term elevations of plasma cortisol are more pronounced in the evening than in the morning. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, *84*(9), 3082–3092. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.9.5978>
95. Poggiogalle, E., Jamshed, H., & Peterson, C. M. (2018). Circadian regulation of glucose, lipid, and energy metabolism in humans. *Metabolism: clinical and experimental*, *84*, 11–27. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.11.017>
96. Reinke, H., & Asher, G. (2019). Crosstalk between metabolism and circadian clocks. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *20*(4), 227–241. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0096-9>
97. Rey, G., Valekunja, U. K., Feeney, K. A., Wulund, L., Milev, N. B., Stangherlin, A., Ansel-Bollepalli, L., Velagapudi, V., O'Neill, J. S., & Reddy, A. B. (2016). The Pentose Phosphate Pathway Regulates the Circadian Clock. *Cell metabolism*, *24*(3), 462–473. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.07.024>
98. Ribeiro, D. C., Hampton, S. M., Morgan, L., Deacon, S., & Arendt, J. (1998). Altered postprandial hormone and metabolic responses in a simulated shift work environment. *The Journal of endocrinology*, *158*(3), 305–310. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1580305>
99. Rivera-Coll, A., Fuentes-Arderiu, X., & Díez-Noguera, A. (1994). Circadian rhythmic variations in serum concentrations of clinically important lipids. *Clinical chemistry*, *40*(8), 1549–1553
100. Roenneberg, T. (2012). What is chronotype? *Sleep and Biological Rhythms*, *10*(2), 75–76. <https://doi.org/10.1111/j.1479-8425.2012.00541.x>
101. Rudic, R. D., McNamara, P., Curtis, A. M., Boston, R. C., Panda, S., Hogenesch, J. B., & Fitzgerald, G. A. (2004). BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS biology*, *2*(11), e377. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020377>

102. Saad, A., Dalla Man, C., Nandy, D. K., Levine, J. A., Bharucha, A. E., Rizza, R. A., Basu, R., Carter, R. E., Cobelli, C., Kudva, Y. C., & Basu, A. (2012). Diurnal pattern to insulin secretion and insulin action in healthy individuals. *Diabetes*, *61*(11), 2691–2700. <https://doi.org/10.2337/db11-1478>
103. Saarela, S., & Reiter, R. J. (1994). Function of melatonin in thermoregulatory processes. *Life sciences*, *54*(5), 295–311. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(94\)00786-1](https://doi.org/10.1016/0024-3205(94)00786-1)
104. Scheer, F. A., Hilton, M. F., Mantzoros, C. S., & Shea, S. A. (2009). Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(11), 4453–4458. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808180106>
105. Schmid, S. M., Hallschmid, M., Jauch-Chara, K., Born, J., & Schultes, B. (2008). A single night of sleep deprivation increases ghrelin levels and feelings of hunger in normal-weight healthy men. *Journal of sleep research*, *17*(3), 331–334. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2869.2008.00662.x>
106. Sehgal, A., & Naidoo, N. (2004). In *Molecular biology of circadian rhythms* (pp. 149–170). essay, Wiley-Liss.
107. Sennels, H. P., Jørgensen, H. L., & Fahrenkrug, J. (2015). Diurnal changes of biochemical metabolic markers in healthy young males - the Bispebjerg study of diurnal variations. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, *75*(8), 686–692. <https://doi.org/10.3109/00365513.2015.1080385>
108. Serin, Y., & Acar Tek, N. (2019). Effect of Circadian Rhythm on Metabolic Processes and the Regulation of Energy Balance. *Annals of nutrition & metabolism*, *74*(4), 322–330. <https://doi.org/10.1159/000500071>
109. Sheredos, B., Harrison, L., & Golden, S.S. [The BioClock Studio]. (2016, March 7). *1 - Free-running periods* [Video file]. Retrieved from <https://youtu.be/1P4fPKC7238>.
110. Shimba, S., Ogawa, T., Hitosugi, S., Ichihashi, Y., Nakadaira, Y., Kobayashi, M., Tezuka, M., Kosuge, Y., Ishige, K., Ito, Y., Komiyama, K., Okamatsu-Ogura, Y., Kimura, K., Saito, M. (2011) Deficient of a clock gene, brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), induces dyslipidemia and ectopic fat formation. *PLoS One* *6*:e25231. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025231>

111. Shirakawa, T., Honma, S., Katsuno, Y., Oguchi, H., & Honma, K. I. (2000). Synchronization of circadian firing rhythms in cultured rat suprachiasmatic neurons. *The European journal of neuroscience*, 12(8), 2833–2838. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00170.x>
112. Sitaula, S., Zhang, J., Ruiz, F., & Burris, T. P. (2017). Rev-erb regulation of cholesterologenesis. *Biochemical pharmacology*, 131, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.02.006>
113. Solt, L. A., Wang, Y., Banerjee, S., Hughes, T., Kojetin, D. J., Lundasen, T., Shin, Y., Liu, J., Cameron, M. D., Noel, R., Yoo, S. H., Takahashi, J. S., Butler, A. A., Kamenecka, T. M., & Burris, T. P. (2012). Regulation of circadian behaviour and metabolism by synthetic REV-ERB agonists. *Nature*, 485(7396), 62–68. <https://doi.org/10.1038/nature11030>
114. Sonnier, T., Rood, J., Gimble, J. M., & Peterson, C. M. (2014). Glycemic control is impaired in the evening in prediabetes through multiple diurnal rhythms. *Journal of diabetes and its complications*, 28(6), 836–843. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2014.04.001>
115. Sun, Z., Miller, R. A., Patel, R. T., Chen, J., Dhir, R., Wang, H., Zhang, D., Graham, M. J., Unterman, T. G., Shulman, G. I., Sztalryd, C., Bennett, M. J., Ahima, R. S., Birnbaum, M. J., & Lazar, M. A. (2012). Hepatic Hdac3 promotes gluconeogenesis by repressing lipid synthesis and sequestration. *Nature medicine*, 18(6), 934–942. <https://doi.org/10.1038/nm.2744>
116. Sutton, EF., Beyl, R., Early, KS., Cefalu, WT., Ravussin, E., Peterson, CM. (2018) Early time-restricted feeding improves insulin sensitivity, blood pressure, and oxidative stress even without weight loss in men with prediabetes. *Cell Metab.* 27, 1212–1221.e1213. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.04.010>
117. Thaïss, C. A., Zeevi, D., Levy, M., Zilberman-Schapira, G., Suez, J., Tengeler, A. C., Abramson, L., Katz, M. N., Korem, T., Zmora, N., Kuperman, Y., Biton, I., Gilad, S., Harmelin, A., Shapiro, H., Halpern, Z., Segal, E., & Elinav, E. (2014). Transkingdom control of microbiota diurnal oscillations promotes metabolic homeostasis. *Cell*, 159(3), 514–529. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.048>
118. Travnickova-Bendova, Z., Cermakian, N., Reppert, S. M., & Sassone-Corsi, P. (2002). Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(11), 7728–7733. <https://doi.org/10.1073/pnas.102075599>

119. Turek F. W. (2005). Role of light in circadian entrainment and treating sleep disorders--and more. *Sleep*, 28(5), 548–549. <https://doi.org/10.1093/sleep/28.5.548>
120. van den Berg, R., Kooijman, S., Noordam, R., Ramkisoensing, A., Abreu-Vieira, G., Tambyrajah, L. L., Dijk, W., Ruppert, P., Mol, I. M., Kramar, B., Caputo, R., Puig, L. S., de Ruiter, E. M., Kroon, J., Hoekstra, M., van der Sluis, R. J., Meijer, O. C., Willems van Dijk, K., van Kerkhof, L. W. M., Christodoulides, C., ... Rensen, P. C. N. (2018). A Diurnal Rhythm in Brown Adipose Tissue Causes Rapid Clearance and Combustion of Plasma Lipids at Wakening. *Cell reports*, 22(13), 3521–3533. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.004>
121. van den Hoek, A. M., Voshol, P. J., Karnekamp, B. N., Buijs, R. M., Romijn, J. A., Havekes, L. M., & Pijl, H. (2004). Intracerebroventricular neuropeptide Y infusion precludes inhibition of glucose and VLDL production by insulin. *Diabetes*, 53(10), 2529–2534. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.10.2529>
122. van Kerkhof, L. W., Van Dycke, K. C., Jansen, E. H., Beekhof, P. K., van Oostrom, C. T., Ruskovska, T., Velickova, N., Kamcev, N., Pennings, J. L., van Steeg, H., & Rodenburg, W. (2015). Diurnal Variation of Hormonal and Lipid Biomarkers in a Molecular Epidemiology-Like Setting. *PloS one*, 10(8), e0135652. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135652>
123. van Moorsel, D., Hansen, J., Havekes, B., Scheer, F. A. J. L., Jörgensen, J. A., Hoeks, J., Schrauwen-Hinderling, V. B., Duez, H., Lefebvre, P., Schaper, N. C., Hesselink, M. K. C., Staels, B., & Schrauwen, P. (2016). Demonstration of a day-night rhythm in human skeletal muscle oxidative capacity. *Molecular metabolism*, 5(8), 635–645. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2016.06.012>
124. Vetter C. (2020). Circadian disruption: What do we actually mean?. *The European journal of neuroscience*, 51(1), 531–550. <https://doi.org/10.1111/ejn.14255>
125. Voigt, RM., Forsyth, CB., Green, SJ., Engen, PA., Keshavarzian, A. (2016) Circadian rhythm and the gut microbiome. *Int Rev Neurobiol* 131, 193–205. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2016.07.002>
126. Vollmers, C., Gill, S., DiTacchio, L., Pulivarthy, S. R., Le, H. D., & Panda, S. (2009). Time of feeding and the intrinsic circadian clock drive rhythms in hepatic gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(50), 21453–21458. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909591106>
127. Wagner, S., Sagiv, N., & Yarom, Y. (2001). GABA-induced current and circadian regulation of chloride in neurones of the rat suprachiasmatic nucleus. *The*

- Journal of physiology*, 537(Pt 3), 853–869. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.00853.x>
128. Walsh, C. H., & Wright, A. D. (1975). Diurnal patterns of oral glucose tolerance in diabetics. *Postgraduate Medical Journal*, 51(593), 169–172.
129. Welsh, D. K., Takahashi, J. S., & Kay, S. A. (2010). Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annual review of physiology*, 72, 551–577. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135919>
130. Wu, J., Cohen, P., & Spiegelman, B. M. (2013). Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? *Genes & development*, 27(3), 234–250. <https://doi.org/10.1101/gad.211649.112>
131. Xu, Y., Padiath, Q. S., Shapiro, R. E., Jones, C. R., Wu, S. C., Saigoh, N., Saigoh, K., Ptáček, L. J., & Fu, Y. H. (2005). Functional consequences of a CK1delta mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. *Nature*, 434(7033), 640–644. <https://doi.org/10.1038/nature03453>
132. Yin, L., Wang, J., Klein, P. S., & Lazar, M. A. (2006). Nuclear receptor Rev-erbalpha is a critical lithium-sensitive component of the circadian clock. *Science (New York, N.Y.)*, 311(5763), 1002–1005. <https://doi.org/10.1126/science.1121613>
133. Zhang, E. E., Liu, Y., Dentin, R., Pongsawakul, P. Y., Liu, A. C., Hirota, T., Nusinow, D. A., Sun, X., Landais, S., Kodama, Y., Brenner, D. A., Montminy, M., & Kay, S. A. (2010). Cryptochrome mediates circadian regulation of cAMP signaling and hepatic gluconeogenesis. *Nature medicine*, 16(10), 1152–1156. <https://doi.org/10.1038/nm.2214>
134. Zhou, S., Tang, X., Chen, H-Z. (2018) Sirtuins and insulin resistance. *Front Endocrinol* 9, 748. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00748>
135. Zisapel N. (2018). New perspectives on the role of melatonin in human sleep, circadian rhythms and their regulation. *British journal of pharmacology*, 175(16), 3190–3199. <https://doi.org/10.1111/bph.14116>
136. Zizi, F., Jean-Louis, G., Brown, C. D., Ogedegbe, G., Boutin-Foster, C., & McFarlane, S. I. (2010). Sleep duration and the risk of diabetes mellitus: epidemiologic evidence and pathophysiologic insights. *Current diabetes reports*, 10(1), 43–47. <https://doi.org/10.1007/s11892-009-0082-x>