



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Efectos de la sobre-nutrición materna y el consumo de una dieta alta en grasas y carbohidratos sobre la expresión de los genes reloj en osciladores circadianos en conejos chinchilla

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

PAMELA ESTEFANIA VEGA RUIZ

DIRECTOR

Dra. Ivette Caldelas Sánchez

CO-DIRECTOR

Dr. Francisco Castelán

Tlaxcala, Tlaxcala

ENERO, 2020



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

“Efectos de la sobre-nutrición materna y el consumo de una dieta alta en grasas y carbohidratos sobre la expresión de los genes reloj en osciladores circadianos en conejos chinchilla”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Pamela Estefania Vega Ruiz

CO-DIRECTOR

Dra. Ivette Caldelas Sánchez

CO-DIRECTOR

Dr. Francisco Castelán

Comité Tutoral

Dr. Jorge Rodríguez Antolín

Dra. Esmeralda García Torres

Tlaxcala, Tlax.

ENERO, 2020

Financiamiento

Esta tesis fue realizada en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, la cual fue financiada con parte de los recursos de los proyectos:

IN211219 del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM.

Proyecto **No. 398**: "La sobre-nutrición materna como factor de riesgo para el desarrollo de alteraciones cronostáticas, metabólicas y genotóxicas de la descendencia", FON.INST./95/2016 de la Convocatoria de Investigación en Fronteras de la Ciencia 2015-1.

Agradezco al CONACyT por otorgarme la beca con número de registro 854814 proporcionada durante el periodo del 1 de agosto del 2017 hasta el 31 de agosto de 2019.

A la Maestría en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala la cual está registrada en el Programa para el Fortalecimiento del Programa Nacional de Posgrados de Calidad del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (PNPC-CONACyT).



Universidad
Autónoma de
Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas
Coordinación de la División de Ciencias Biológicas
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado



**COORDINACIÓN POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E**

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Pamela Estefania Vega Ruiz** realiza para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es: **“Efectos de la sobre-nutrición materna y el consumo de una dieta alta en grasas y carbohidratos sobre la expresión de los genes reloj en osciladores circadianos en conejos chinchilla”**.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., 08 DE ENERO 2020

DRA. IVETTE CALDELAS SÁNCHEZ

DR. JORGE RODRÍGUEZ ANTOLÍN

DRA. ESMERALDA GARCÍA TORRES

DRA. MARGARITA MARTÍNEZ GÓMEZ

DRA. VERÓNICA DÍAZ HERNÁNDEZ



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:
ISO 9001:2015-NMX-CC-9001-IMNC-2015



Agradecimientos Académicos

Al posgrado del Centro de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (CTBC) por ser una casa de estudios que me ha brindado la oportunidad de aprendizaje, crecimiento, retos, constante crecimiento, por los amigos entrañables que he formado, los destacados investigadores que alberga, dedicados a la admirable tarea de la docencia.

Agradezco al CONACyT por otorgarme la beca con número de registro 854814 proporcionada durante el periodo del 1 de agosto del 2017 hasta el 31 de agosto de 2019.

Agradezco a la directora de esta tesis la Dra. Ivette Caldelas Sánchez por hacerme participe en este proyecto de investigación, por el tiempo y la infinita paciencia que logré perturbar con el escrito de esta tesis, por brindarme la oportunidad de concluir este trabajo en su laboratorio, al igual que agradezco todos los comentarios para mejorar este trabajo. Admirable ese entusiasmo, perseverancia y dedicación por sus proyectos de investigación, por mostrarme las estrategias para abordar y solucionar los problemas en un experimento, hasta la manera de manejar y organizar un equipo de trabajo.

A los integrantes de mi comité tutor: al Dr. Jorge Rodríguez Antolín, a la Dra. Esmeralda García y al Dr. Francisco Castelán cuyas observaciones, comentarios y cuestionamientos enriquecieron este trabajo.

A la M. en C. Erika Navarrete Monroy por todo el apoyo técnico brindado en este trabajo resaltando su admirable y excepcional labor en este campo. A quien le tengo un profundo respeto y admiración por su apoyo incondicional, con regocijo agradezco infinitamente el poder compartir esta experiencia acompañada de un vaivén de emociones, por todos los consejos, por ser una persona íntegra, confiable, leal y con una gran calidez humana. Gracias por esa pasión y tener esa virtud de llevar tu trabajo más allá de tus labores. Sobre todo por ser mi amiga y decirme mis errores de frente y como mejorar.

A la Dra. Margarita Martínez Gómez por su apoyo, observaciones y comentarios que enriquecieron este trabajo. Le agradezco por la confianza y este cúmulo de oportunidades que me brindo.

Al Señor Pedro Medina por su apoyo técnico, su disposición y entusiasmo al enseñarme el montaje y elaboración de tinciones, admirable la pasión por su trabajo.

A la MVZ. Georgina Díaz Herrera por el apoyo técnico brindado para el manejo de los conejos, gracias por el tiempo, paciencia, disposición, amabilidad y confianza que la caracteriza. Por su entusiasmo y disposición para explicarme las situaciones, por su honestidad y ayudarnos en todo momento.

A la Dra. Verónica Hernández por su asesoramiento y apoyo técnico en la estandarización de la técnica de PCR Tiempo Real.

Al Dr. Genaro Matus Ortega por brindarme su apoyo y la oportunidad de integrarme en la docencia.

Al Dr. Manuel Miranda por su admirable vocación y su excelente labor en la docencia, sus pláticas y consejos.

Dra. Ivonne Mora por su apoyo técnico brindado en la técnica de PCR, por su paciencia y compromiso. Admirable su entrega y entusiasmo por su labor en el área de investigación.

A la Química Delia Arlette Castillo Mata por su apoyo para la determinación de los niveles séricos de los diferentes metabolitos analizados.

A la paste en Ingeniería Naomi Lizeth García Medina por su apoyo brindado para el análisis de datos con el diseño de su programa COSINOR.

Al laboratorista Marco Antonio Meza, por su apoyo incondicional y sobre todo por su compromiso, disposición y entusiasmo para realizar su trabajo y el apoyo brindado en el transcurso de este proyecto de investigación.

A la auxiliar de laboratorio Juanita Álvarez Hernández gracias por su disposición y el compromiso brindado en el transcurso y finalización de este proyecto.

A la C. Ma. Ovdulia Minor Cupio por su disposición, compromiso y entusiasmo en su labor.

A Rebeca Sánchez López por su coordinación, apoyo, eficiencia y paciencia para realizar los trámites y recepción de documentos, pieza clave para el posgrado, sobre todo esa disposición y amabilidad que siempre demuestra.

A Xóchitl Vázquez Padilla por su disposición, comprensión, compromiso y paciencia que siempre demuestra con su trabajo.

A la Química Laura García por su apoyo y disposición para cualquier trámite.

Al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme tomar todas mis materias en esta gran casa de estudios y en este programa. Les agradezco a los increíbles profesores dedicados a la docencia de quienes aprendí y me orientaron en todo momento.

Dedicatoria

Esta tesis se la dedico a mi FAMILIA, les agradezco la paciencia y el apoyo incondicional de mis padres: Juan Vega Parra, mi madre Julia Ruiz López, así como mis hermanas: Paola Itzel Vega Ruíz y Carolina Vega Ruíz. Gracias por ser mi ejemplo, mi inspiración y mi fortaleza, porque en conjunto son y seguirán siendo mis alas, mis héroes y mi inspiración para continuar en cualquier camino que elija, los amo.

Le agradezco a DIOS por bendecirme con una familia maravillosa, por los amigos que conservo, el amor, salud y trabajo. Le agradezco porque nunca me ha abandonado, me ha puesto en situaciones difíciles, que con el tiempo, paciencia y sabiduría me ha enseñado a levantarme y él sigue alentando mis pasos e iluminando mí camino porque cada día es una nueva oportunidad de vida y aprendizaje.

A Dr. Ivette Caldelas le agradezco por ser mi mentora, por el apoyo, por su infinita paciencia, en el transcurso de estos cuatro años tuve la fortuna de convivir, y aprender de una gran investigadora. A Erika Navarrete, Ivonne Mora y Paty Cueto por su amistad y cada consejo, son excelentes seres humanos.

A Francisco Castelán te agradezco por el apoyo, disposición, amabilidad, observaciones y comentarios que recibí de tú parte. Además, por esos momentos de reflexión y consejos que me brindaste. Tuve la oportunidad y la fortuna de conocer y convivir con un excelente ser humano y un sobresaliente investigador.

A mis amigos que estuvieron en el laboratorio y fueron participe de esta travesía: Juan Ortega, Yosette Barb, Lucero Trejo y Nahomi García. Gracias por brindarme su AMISTAD, la cual se ha fortalecido con el paso del tiempo, por el apoyo, cariño, las risas y las pláticas infinitas, las aventuras que hemos pasado juntos dentro y fuera del laboratorio, por todos los consejos a nivel profesional y personal, los admiro y los quiero mucho. A los nuevos compañeros de laboratorio Vid y Mishell les agradezco por ser parte de esta travesía, por su apoyo, platicas y risas.

Agradezco a mis mejores amigos: Alejandra Barcelos por su apoyo incondicional, por estar siempre presente a pesar de la distancia, por los doce años de amistad y a Ulises Pedroza por la paciencia, el apoyo brindado, el fútbol y las fiestas.

A Karla y Verónica por ser mis amigas y hermanas de la universidad, por estar conmigo en los malos y buenos momentos, por las salidas, su hospitalidad y su confianza. A todas las personas maravillosas que me han acompañado en el transcurso de estos dos años, a los amigos que encontré en la UNAM y en el CTBC que han estado conmigo en las buenas y en las malas: Al Sr. Marco, Manuel, Laura García, Iván, Dora Luz, Cecy, Lupita, Jorge, Salvador por su apoyo incondicional.

RESUMEN

El sistema circadiano es el encargado de modular temporalmente diversas funciones fisiológicas y parámetros metabólicos, los genes reloj son los encargados de generar y controlar la ritmicidad, además funcionan como mediadores que regulan las funciones metabólicas. Durante los periodos críticos del desarrollo embrionario la sobre-nutrición materna podría alterar el acoplamiento entre la regulación cronostática y homeostática en diferentes tejidos asociados con la generación ritmicidad circadiana y el desarrollo de enfermedades metabólicas en la edad adulta de la descendencia. Por lo que el presente estudio determinó el efecto del sobre-nutrición crónica materna por el consumo de una dieta alta en grasas y carbohidratos, así como el consumo directo de la misma en la descendencia de conejos chinchilla en la edad adulta sobre la expresión de los genes reloj en osciladores circadianos.

En el presente estudio fueron utilizados conejos obtenidos de hembras alimentadas *ad libitum* con una dieta estándar (CON) o con una dieta alta en grasa y en carbohidratos (SN) previo al apareamiento y durante la gestación, las cuales fueron apareadas con machos alimentados con una dieta estándar. Al nacer las crías de ambos grupos (CON y SN) fueron amantadas por hembras nodrizas, alimentadas con alimento estándar, con esta misma dieta continuaron las crías al destete hasta los 440 días de edad.

Posteriormente, los conejos de ambos grupos se sometieron a un reto alimenticio durante 30 días, para tal efecto a ambos grupos se les proporcionó alimento estándar o alimento alto en grasa y carbohidratos, finalmente se formaron 4 grupos experimentales: CON-CON, CON-SN, SN-CON y SN-SN. Se registró la ingesta de alimento, el peso corporal, se caracterizó el patrón temporal de los metabolitos en suero de glucosa, colesterol total, lipoproteínas de baja y alta densidad, ácidos grasos libres y triglicéridos. Se determinaron marcadores de daño hepático y la expresión de los genes *Clock*, *Bmal*, *Cry1* y *Per1* en el hipotálamo e hígado.

Se demostró que la influencia combinada del estado nutricional materno y el consumo de una dieta alta en grasas en la adulta tienen efectos significativos en los niveles séricos de diferentes metabolitos, alteraciones en la temporalidad y ritmicidad de todas las variables metabólicas conllevando al desarrollo de hiperglucemia, hipercolesterolemia y altos niveles de LDL y cambios en la fase de expresión de los genes reloj en el hígado. Sin embargo, el consumo directo de la dieta desequilibrada produce cambios en el comportamiento alimenticio y en la fase y expresión del gen *Cry*. El factor de la programación metabólica induce alteraciones en la fase y expresión del gen *Per1*, *Clock* y *Bmal1* en el hígado.

Estas observaciones indican que las alteraciones a nivel metabólico y cronostático de la descendencia están asociados a cambios en la expresión de los genes reloj en el hígado, por lo que la maquinaria molecular del reloj molecular responde de manera diferencial dependiendo de la condición experimental.

ÍNDICE

Pag

1. INTRODUCCIÓN	
1. Síndrome metabólico.....	1
1.1 Definición y características del síndrome metabólico	1
2. Programación metabólica fetal	2
2.1 Fisiología del embarazo, la función placentaria y la relación con la programación metabólica	4
3. Ritmos biológicos.....	7
3.1 Definición y propiedades de los ritmos circadianos	7
3.2 Componentes del sistema circadiano	11
3.3 Osciladores y marcapasos	14
3.4 Bases anatómicas y moleculares de la generación de la ritmicidad circadiana.....	14
3.5 Aferencias del sistema circadiano en mamíferos	22
3.6 Vías eferentes del sistema circadiano en mamíferos	23
3.7 Osciladores periféricos en mamíferos	25
4. La regulación circadiana y su interacción en los procesos metabólicos.....	27
4.1 El sistema circadiano y su relación con el metabolismo de carbohidratos y lípidos... ..	28
4.2 Alteraciones circadianas y el desarrollo de enfermedades metabólicas.....	29
4.3 Enfermedades metabólicas y su asociación con la ritmicidad circadiana	31
4.4 Malnutrición materna y alteraciones en la ritmicidad circadiana de la descendencia	32
5. El conejo europeo como modelo de síndrome metabólico.....	34
II. JUSTIFICACIÓN	35
III. HIPÓTESIS	36
IV. OBJETIVOS	36
4.1 Objetivo general	36

4.2 Objetivos específicos	36
V. MATERIAL Y MÉTODOS	37
5.1 Sujetos y alojamiento	37
5.1.1 Obtención y tratamiento de la descendencia	37
5.1.2 Tratamiento nutricional con alimento alto en grasas y carbohidratos en la descendencia	39
5.2 Determinación de metabolitos en suero de la descendencia.....	41
5.3 Obtención y procesamiento de tejidos de los animales	42
5.4.1 Marcadores bioquímicos de daño hepático y análisis histológico de hígado	42
5.4 Extracción de RNA total.....	43
5.4.1 Extracción de RNA total de hipotálamo.....	43
5.4.2 Extracción de RNA total de hígado.....	44
5.5 Síntesis de cDNA de hipotálamo e hígado	44
5.6 Estandarización de la qRT-PCR.....	44
5.6.1 Estandarización de la PCR tiempo real por el método comparativo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ en hipotálamo	45
5.6.2 Estandarización de la PCR tiempo real por el método comparativo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ en hígado	47
5.7 Análisis cuantitativo de la expresión génica por el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ en hipotálamo e hígado	47
5.8 Análisis de datos del perfil metabólico en suero	49
VI. RESULTADOS	50
6.1 Peso corporal previo y posterior al reto alimenticio.....	50
6.2 Ingesta de alimento	51
6.2.1 Ingesta de kilocalorías aportadas por los carbohidratos	53
6.2.2 Ingesta de kilocalorías aportadas por los lípidos.....	55
6.3 Perfil metabólico posterior al reto alimenticio	58
6.4 Marcadores bioquímicos en el hígado	64
6.4.1 Análisis histológico en el hígado.....	64
6.5 Expresión de genes reloj en el hipotálamo e hígado	67
7. DISCUSIÓN	72

8. CONCLUSIÓN	79
9. PERSPECTIVAS	80
10. REFERENCIAS	81
11. GLOSARIO DE TÉRMINOS	104
12. ANEXOS	108

I. INTRODUCCIÓN

1. Síndrome metabólico

1.1 Definición y características del síndrome metabólico

El síndrome metabólico (SM) se conoce al conjunto de alteraciones metabólicas como son la obesidad central, la dislipidemia, la hiperglucemia, la hipertensión arterial y la resistencia a la insulina, las cuales son consideradas como factores de riesgo que incrementan la susceptibilidad de desarrollar diabetes mellitus tipo II (DM II), enfermedades crónicas degenerativas y enfermedades cardiovasculares (ECV) (Kassi y cols. 2011). Esta última se cataloga como una de las enfermedades no transmisibles (ENT) más importantes y es la segunda causa de mortalidad en la población mexicana (Soto-Estrada y cols. 2016). De acuerdo con los criterios de diagnóstico del Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol, a través del Panel de Expertos sobre Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipercolesterolemia en Adultos (ATP III) el diagnóstico del SM se establece al presentarse tres de los cinco factores de riesgo enlistados en la Tabla 1 (García-García y cols. 2008 y Lorenzo y cols. 2007).

Tabla 1. Criterios de diagnóstico del Síndrome Metabólico para adultos mayores de 20 años, de acuerdo con ATP III

Factor de Riesgo	Sexo	Medidas
Obesidad abdominal (circunferencia abdominal)	Hombres	>102 cm
	Mujeres	>88 cm
Niveles de triglicéridos	Ambos	≥150 mg/dl
Niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL)	Hombres	< 40 mg/dl
	Mujeres	< 50 mg/dl
Presión arterial	Ambos	≥130/≥85 mm Hg
Glucosa en ayunas	Ambos	≥100 mg/dl

El incremento en la incidencia del SM en la población mexicana resulta alarmante, de acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) en el 2006, la prevalencia de sobrepeso y obesidad fue de 66.7%, donde el 42.5% tenían sobrepeso y el 24.2% obesidad, además se reportó que el 52.7% de mujeres mexicanas en edad reproductiva presentan SM (Zimmet y cols. 2005 y ENSANUT, 2006). En 2012, la ENSANUT reportó la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad en mujeres adolescentes y adultas fue del 35.8% y 73%. En mujeres en edad reproductiva (20 a 29 años) las cifras de combinadas de sobrepeso y obesidad fueron del 30.6% y 24%, respectivamente. De acuerdo con el informe final de los resultados de la ENSANUT (2016), la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad en mujeres mayores de 20 años fue de 75% (Hernández-Higareda y cols. 2016). Las cifras anteriores muestran la elevada incidencia de sobrepeso y la obesidad pre-gestacional, por lo que estas condiciones pueden estar presentes en mujeres mexicanas en edad reproductiva.

2. Programación metabólica fetal

La condición nutricional materna durante el embarazo, se ha considerado un factor de gran relevancia que se asocia con el desarrollo de obesidad y de diferentes factores de riesgo relacionados al diagnóstico del SM. Esta relación comenzó a estudiarse desde 1980, se conoció como la hipótesis del fenotipo ahorrador de Barker, la cual postula que la mal nutrición materna durante la gestación, tiene como resultado un crecimiento fetal deficiente y una mayor susceptibilidad en la descendencia a desarrollar diabetes tipo II, dislipidemia e hipertensión (Barker 1989, 1992, Goudfrey y Barker 2000). Se ha demostrado que la restricción calórica durante el embarazo produce en la descendencia un bajo peso al nacer, así como en la edad adulta presentan mayor susceptibilidad a desarrollar diabetes mellitus tipo II e hipertensión (Baker 1989). La sobre-nutrición materna durante la gestación también predispone a la descendencia a desarrollar hiperglicemia y dislipidemia (Alfaradhi y Ozanne 2011).

En roedores, la restricción proteica durante la gestación se ha asociado con el desarrollo de obesidad, diabetes e hipertensión arterial en la descendencia (Vickers y cols. 2011) y este

efecto es potenciado por la ingesta de una dieta alta en grasas en la vida postnatal estos animales presentan un menor número de células β -pancreáticas (Krechowec y cols. 2006). Desai y colaboradores (2014) demostraron en ratas Sprague Dawley, que la ingesta de una dieta alta en grasa durante la gestación tiene un impacto en la composición corporal de la descendencia y el riesgo de desarrollar SM dependerá del período de exposición de la dieta, ya sea durante el embarazo y/o la lactancia. Otros estudios han demostrado que la restricción calórica durante la gestación y la exposición a una dieta alta en grasas postnatalmente se asocia con un mayor riesgo de ECV y diabetes en la segunda generación (F2) (Kaati y cols. 2002). En un estudio transgeneracional se observó que la desnutrición materna durante la gestación puede causar un incremento en la adiposidad y la intolerancia a la glucosa tanto en la F1 y F2, además de alteraciones en la función de los islotes pancreáticos y en el número de nefronas (Jimenez-Chillaron y cols. 2005 y 2009). Estos patrones de transmisión de riesgo de enfermedad de padres a hijos, podrían ser resultado del impacto de la salud parental *per se* del embarazo o en las células germinales maternas o paternas. Huypens y colaboradores (2016), demostraron mediante fertilización *in vitro*, que células germinales colectadas de ratones expuestos a diferentes factores nutricionales (dieta baja en grasas, dieta normal y dieta alta en grasas) son capaces de transmitir fenotipos metabólicos a su descendencia.

Los estudios mencionados muestran una relación directa entre los factores maternos, perinatales y de la primera infancia con el riesgo de desarrollar obesidad, ECV, DMT II en la edad adulta (Figura 1). A esto se le conoce como los orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad, donde se establece que un insulto durante los periodos críticos causan alteraciones en el crecimiento y en el desarrollo fetal, además, que un desajuste en la vida postnatal puede dar lugar adaptaciones inapropiadas e incrementar la susceptibilidad del individuo al desarrollo de enfermedades metabólicas en la edad adulta (Gluckman y cols. 2008, Gluckman y Hanson 2014). Por lo tanto, la exposición a condiciones intrauterinas adversas pueden afectar la implantación del embrión y su desarrollo, aumentando en última instancia el riesgo de enfermedad en la descendencia. Además, los factores ambientales postnatales y el desarrollo de enfermedades metabólicas en la vida adulta, también contribuyen a los cambios epigenéticos, incluidas las alteraciones en las células germinales, tanto espermatozoides como ovocitos (Sales y cols. 2017).

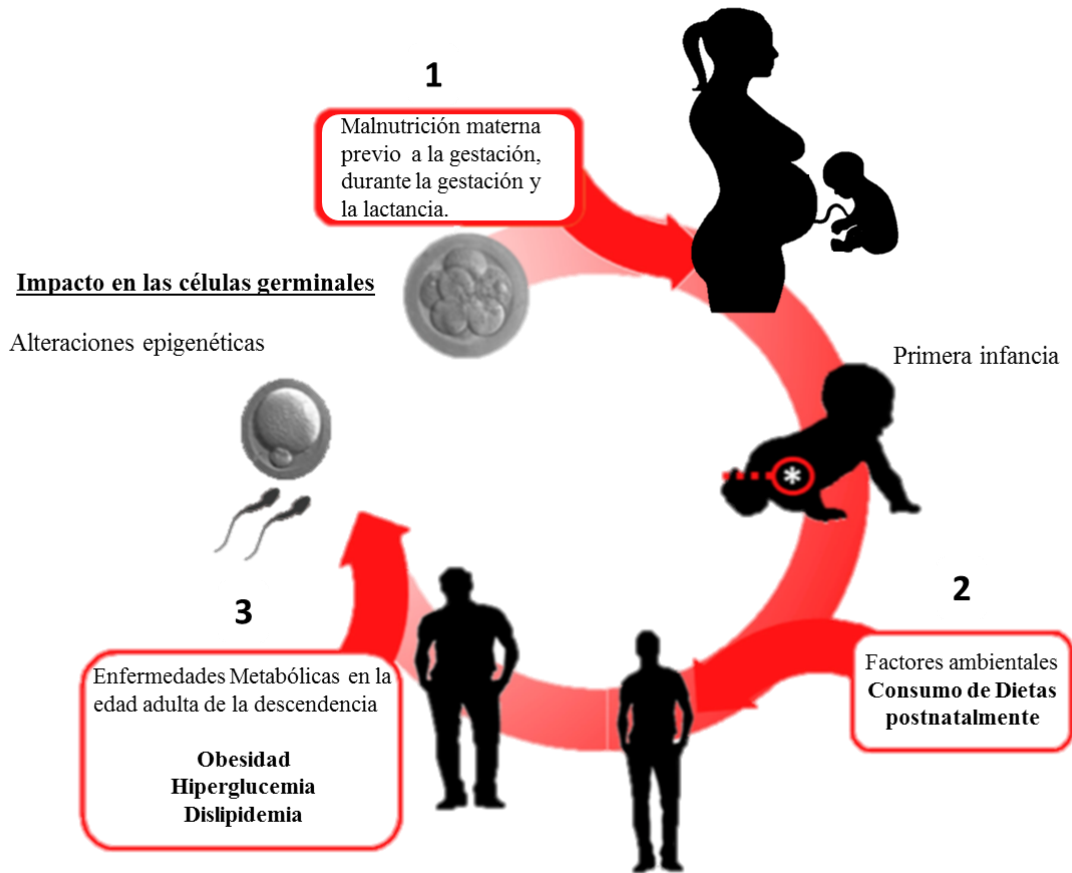


Figura 1. Factores de riesgo en diferentes periodos del desarrollo conducen a la programación metabólica. 1) exposición intrauterina adversa. 2) factores ambientales postnatales y 3) desarrollo de enfermedades metabólicas en la vida adulta además que las células germinales tanto espermatozoides como ovocitos pueden verse afectadas tanto por la exposición intrauterina como por el desarrollo de enfermedades metabólicas en el adulto lo que afecta a las siguientes generaciones (Modificado de Sales y cols. 2017)

2.1 Fisiología del embarazo, la función placentaria y su relación con la programación metabólica

Durante el embarazo existen dos etapas metabólicas de gran relevancia, la primera comprende los dos primeros tercios del embarazo se caracterizan por una condición predominantemente anabólica, en donde se favorece el incremento del tejido adiposo. La acumulación de grasa debida a la hiperfagia, aunado a un aumento de la lipogénesis y disminución de la actividad de la lipasa hepática (King 2006, Sullivan y Goreve 2010). La segunda etapa, comprende el último tercio de la gestación que se caracteriza por un estado catabólico, en el cual predomina, un estado de resistencia a la insulina (RI), con la finalidad de cubrir la demanda

energética requerida por el feto para su desarrollo (Gustafsson 2009). En esta etapa, ocurren importantes cambios en lo que respecta al metabolismo de los lípidos maternos, hay una mínima absorción de triglicéridos circulantes y un aumento de la lipólisis del tejido adiposo, el glicerol y los ácidos grasos libres (AGL), los cuales son liberados a la circulación y son capturados por el hígado convirtiéndose en sus formas activas, acil-CoA y glicerol-3-fosfato, respectivamente (Zambrano y cols. 2016). Por lo que pueden reesterificarse y sintetizarse en TAG liberados en la circulación, adicionalmente las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) se encuentran en concentraciones más altas. Además del aumento de la lipólisis y la disminución de la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL), el aumento en la concentración de estrógenos y el estado de RI también pueden contribuir al aumento de los niveles de TAG (triacilglicéridos) y VLDL durante el embarazo (Galtier y cols. 2008, Zambrano y cols. 2013, Zambrano y cols. 2016).

Se ha demostrado que mujeres con obesidad son más propensas a desarrollar citotoxicidad y disfunción metabólica, lo que puede exacerbar la acumulación de depósitos de grasa durante el embarazo, como consecuencia de la disfunción del tejido adiposo presentan alteraciones a nivel endocrino, incrementos hormonales (progesterona y cortisol), metabólicas (glucosa, lípidos, adiponectina y leptina) y de citocinas inflamatorias (IL-6), proteína C-reactiva (PCR) y el factor de necrosis tumoral tipo alfa (TNF- α) (Leddy y cols. 2008). Por lo tanto, en mujeres con obesidad las reservas energéticas maternas almacenadas durante el primer trimestre del embarazo se ven incrementadas y con ello se compromete el estado intrauterino para un adecuado desarrollo fetal. Además, la exposición fetal a concentraciones elevadas de lípidos, por el consumo de dietas altas en grasas durante el periodo gestacional repercute en el transporte de nutrientes a nivel placentario, así como al tejido adiposo fetal mediante la activación de citocinas proinflamatorias. Los niveles altos de glucosa materna, disminuyen la oxidación de ácidos grasos mitocondriales placentarios a través de la inhibición de la canitina palmitoltransferasas I (CPT I), incrementando la acumulación de TAG en la placenta (Visiedo y cols. 2013). Por lo tanto, la nutrición materna subóptima (desnutrición o nutrición excesiva) durante la gestación, pueden tener como resultando alteraciones del ambiente intrauterino o en el transporte de nutrientes de la madre al feto por lo cual tiene un impacto sobre el adecuado desarrollo fetal.

Por otra parte, la placenta juega un papel crucial en el transporte de nutrientes de la madre hacia el feto, se considera como el principal factor determinante del crecimiento intrauterino. El transporte placentario está regulado por numerosos factores que incluyen los gradientes de concentración, el metabolismo placentario y el flujo sanguíneo. Estos procesos dependen de la abundancia de transportadores en la placenta, así como de la síntesis y metabolismo de nutrientes (Sibley y cols. 1997). La expresión y la abundancia de los transportadores de membrana son de gran importancia para el suministro de nutrientes al feto en desarrollo. La placenta responde y se adapta a cualquier alteración en el microambiente modulando los sistemas transportadores ubicados en sincitiotrofoblastos, una barrera placentaria del epitelio de dos capas. Estos sistemas incluyen transportadores para aminoácidos, ácidos grasos y glucosa; se expresan tanto en la membrana microvellosa (materno), como en la membrana plasmática basal (fetal) de sincitiotrofoblastos. Entre estos, los principales sistemas transportadores son el A y el L. Los transportadores del Sistema A son responsables de la absorción de aminoácidos no esenciales y están principalmente vinculados a la membrana microvillosa de los sincitiotrofoblastos y su actividad incrementa durante el embarazo (Desforges y cols. 2010).

El consumo de dietas bajas en proteínas durante la gestación está relacionada con una baja regulación de transportadores placentarios del sistema y con la restricción del crecimiento intrauterino (Glazier y cols. 1997). Además, los transportadores de ácidos grasos en la barrera placentaria involucran las lipasas, proteínas de transporte de ácidos grasos y proteínas de unión a ácidos grasos, las placentas con IUGR muestran un incremento en la expresión de ARNm de lipoproteína lipasa y endotelial lipasa con una disminución en la actividad de la lipoproteína lipasa en la placenta de individuos prematuros (Magnusson y cols. 2004). Por otra parte, la obesidad materna en ratones disminuye la oxidación de ácidos grasos mitocondriales placentarios a través de la inhibición de la carnitina palmitoiltransferasa I (CPT-I), incrementa la acumulación de triacilglicéridos en la placenta (Visiedo y cols. 2013), y produce alteraciones en la expresión de la proteína de unión a los ácidos grasos en la placenta, lo que lleva a una mayor acumulación de lípidos fetales (Makkar y cols. 2014).

El consumo de dietas hipercalóricas durante la gestación, resulta en alteraciones a nivel placentario y en el tejido adiposo fetal mediante la activación de citocinas proinflamatorias

como la interleucina 1 y 6 (IL-1-6) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (Lappas y cols. 2014). Por lo tanto, la exposición fetal excesiva a lípidos, incrementa el almacenamiento de grasa y aumenta el riesgo de desarrollar ECV en la vida posnatal del individuo (Kirk y cols. 2009). Con todo lo anterior se demuestra que un adecuado estado nutricional materno durante la gestación resulta fundamental para propiciar un ambiente intrauterino favorable para el adecuado desarrollo fetal y el futuro metabólico de la descendencia.

3. Ritmos biológicos

3.1 Definición y propiedades de los ritmos circadianos

Una de las características inherentes de los sistemas biológicos es el exhibir fluctuaciones temporales rítmicas en diversas funciones biológicas, a las cuales se les ha denominado Ritmos Biológicos (Pittendrigh, 1981a). Un ritmo se define como una secuencia de eventos repetitivos o cambios de estado, con periodos regulares y típicamente controlados por un mecanismo (Webb y Oates 2016). Por lo tanto, cuando se habla de ritmos biológicos nos referimos a la recurrencia de cualquier evento en un sistema biológico, que se repite en intervalos regulares de tiempo (Aschoff 1981).

En la naturaleza podemos encontrar una amplia variedad de ritmos biológicos. En general, la frecuencia de estos guardan una estrecha relación con diferentes ciclos geofísicos; de esta manera podemos encontrar cuatro principales ritmos biológicos: a) los ritmos anuales, aquellos que ocurren aproximadamente cada 365 días, estos ritmos están ligados al movimiento de translación de la tierra, por ejemplo, la migración, la hibernación en aves y en mamíferos. b) Los ritmos lunares, son ciclos cercanos a los 29.5 días, estos ciclos se relaciona con la translación de la luna, por ejemplo, la reproducción en especies marinas. c) Los ritmos mareales, son aquellos con intervalos de aproximadamente 12.4 horas, guardan una estrecha relación con el movimiento de rotación de la luna y las consecuentes transiciones entre marea alta y baja, por ejemplo, los periodos de actividad de algunas especies litorales (Helm y Stevenson 2014). d) Los más estudiados son los ritmos circadianos, en 1960, el fisiólogo Franz Halberg acuñó por primera vez este término, el cual deriva de los vocablos latinos *circa= próximo a* y *diem=días* (“cercano al día”), para describir los ciclos con periodos cercanos a las 24 horas, correspondiente al tiempo de rotación de la tierra sobre su propio eje, por lo tanto a la alternancia entre el día y la noche. Algunos ejemplos de estos

ritmos son, el sueño-vigilia de los seres humanos o la eclosión de las larvas de *Drosophila melanogaster*, entre otros (Halberg 1959, Aschoff 1981). Estos ritmos han generado mayor interés en el campo de la investigación, debido a su predominio. Se ha propuesto que la función más importante de los ritmos circadianos es la adaptación del organismo a su medio ambiente con la finalidad de anticiparse, predecir y acoplar su fisiología a un ambiente cíclico, en consecuencia incrementar su supervivencia, por lo que el presente trabajo se enfocará en estos últimos.

En relación a estos ritmos y con base a su periodo, los ritmos circadianos se subdividen en ritmos ultradianos aquellos cuyo periodo es menores a las 24 horas y los ritmos infradianos los cuales presentan periodos mayores a 24 horas, Tabla 2 (Aschoff 1981).

Tabla 2. Clasificación de los Ritmos

Tipo de ritmo	Periodo	Ejemplo
<i>Circadianos</i>	24 horas	Actividad- Reposo Ciclo sueño-vigilia Procesos Metabólicos
	0.1 segundos	Electroencefalograma
	1 segundos	Ritmo Cardíaco
	6 segundos	Ritmo Respiratorio
Ultradiano	60 minutos	Actividad neuronal
	Infradiano	365 días

Existen una serie de parámetros descriptivos que generalmente son considerados en el estudio de los ritmos biológicos (Moore-Ede y col. 1982) y que a continuación se definen (Figura 2).

Periodo (T). Intervalo de tiempo que ocurre entre dos puntos de referencia idénticos y cuyo recíproco es la frecuencia.

Fase (ϕ). Estado de la variable en un momento determinado de las oscilaciones en relación a un punto de referencia.

Acrofase: Valor máximo que se representa en la oscilación.

Nadir o Batifase: El valor mínimo que se presenta en la oscilación.

Amplitud: Diferencia entre el valor máximo y el mínimo de la oscilación

Mesor: Valor promedio alrededor del cual la variable oscila.

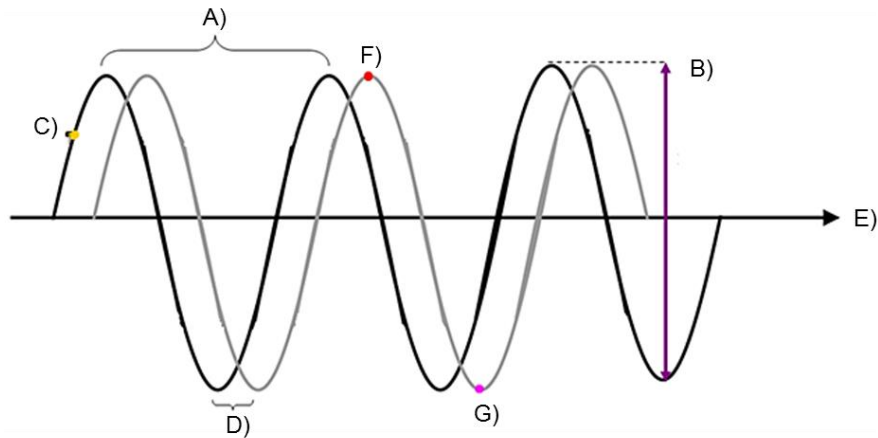


Figura 2. Representación esquemática de los parámetros básicos de los Ritmos Circadianos. A) periodo de oscilación; B) amplitud; C) fase del ritmo; D) ángulo de fase; E) mesor; F) acrofase; G) nadir. La línea negra indica la expresión normal del ritmo, mientras que la línea gris muestra la expresión en presencia del sincronizador. Imagen modificada de Guart y cols., 2002.

Uno de los primeros trabajos que abordan la temática de la fisiología circadiana datan del siglo XVIII, en 1729 Jean Jacques d'Órtous de Mairan describió en un sencillo experimento, lo que ahora se conoce como control nictinástico en la planta *Mimosa pudica*. Se sabía que además del plegamiento repentino de los folíolos al ser tocados, esta planta también posee plegamientos dependientes de la hora del día, ya que sus hojas se mantienen abiertas durante el día y se pliegan durante la noche. De' Mairan mantuvo dichas plantas en oscuridad constante mientras registró los movimientos de las hojas y reportó que en ausencia del ciclo luz-oscuridad, el plegamiento y apertura de las hojas sigue ocurriendo con un periodo cercano a las 24 horas. De' Mairan no realizó conjeturas sobre el origen de dichas variaciones diarias, su trabajo dejó ver que los ritmos de apertura y cierre de las hojas de la *Mimosa pudica* son

independientes de los cambios de iluminación y por tanto no se tratan de un simple reflejo pasivo a las variaciones ambientales (Schwartz y Daan 2017).

Posteriormente en 1832, estas observaciones fueron constatadas por el botánico Augustin Pyramus de Candolle quien añadió una segunda evidencia sobre la naturaleza endógena del ritmo biológico de la *Mimosa pudica*. Demostró que colocando la planta en obscuridad continua, persistía el ritmo de apertura y cierre del follaje, con un período entre veintidós y veintitrés horas, bajo estas condiciones el ritmo manifiesta su periodo endógeno, fenómeno que se conoce actualmente como oscilación espontánea o libre corrimiento (Moore-Ed y cols. 1982, Aguilar-Roblero 1993). Con estos hallazgos, se demostró una de las propiedades fundamentales de los ritmos circadianos, los cuales son generados de manera endógena y autosostenida.

Con el paso del tiempo se realizaron diferentes trabajos sobre los procesos rítmicos, y fue hasta el siglo XX, August Forel a partir de las observaciones que realizó con las abejas fue el primero en proponer que los organismos poseían una memoria temporal o *Zeitgedächtnis*. Posteriormente, Erwin Bünning contribuyó a la comprensión de los ritmos circadianos, demostrando el origen genético de la ritmicidad circadiana en las plantas y en insectos, ya que estos se mantienen por generaciones en ausencia de señales cíclicas (Pittendrigh 1981b, Aguilar-Roblero 1993). Con el paso del tiempo, Aschoff y Pittendrigh demostraron la capacidad de los organismos para medir el paso del tiempo, con estas demostraciones el término *Zeitgedächtnis* fue reemplazado por el concepto de reloj biológico.

Con ello se identificó una de las características más importantes de los ritmos circadianos, la capacidad de compensar la temperatura, mecanismo que fue descubierto por Colin S. Pittendrigh en sus bastos estudios sobre la ritmicidad en la eclosión de los huevos de *Drosophila melanogaster*, estableció que los cambios de temperatura no afectan la fase, ni el periodo de los ritmos circadianos (Pittendrigh y Caldarola 1973). Con estos trabajos se conceptualizaba un sistema que permitía la adecuada interacción del dominio temporal entre el organismo y su ambiente, y no necesita de ningún proceso de aprendizaje en la generación de los ritmos biológicos (Pittendrigh 1981b, Aguilar-Roblero 1993).

3.2 Componentes del sistema circadiano

Para poder llevar a cabo esta función, de mantener la organización temporal interna de los múltiples procesos que ocurren en el individuo respecto a los cambios cíclicos diarios (Aguilar–Roblero 1993, Gruart y cols. 2002), se describió al sistema circadiano como un sencillo modelo lineal (Figura 3), conceptualmente conformado por tres componentes esenciales.

a) **Osciladores**: células capaces de generar oscilaciones autónomas y autosostenidas en su fisiología. Un grupo de osciladores puede acoplarse y formar un marcapasos, es decir, sincronizar sus oscilaciones entre sí, generando oscilaciones más robustas con la finalidad de regular la fisiología de otras células (Herzog 2007).

b) **Aferencias**: se trata de las vías de entrada sensorial de la información cíclica ambiental, hacia los osciladores endógenos (Kuhlman y cols. 2007).

c) **Eferencias**: son las vías de salida de la información rítmica generada por los osciladores a múltiples efectores para ser expresada a nivel conductual, fisiológico o molecular (Korf y Von Gall 2013).

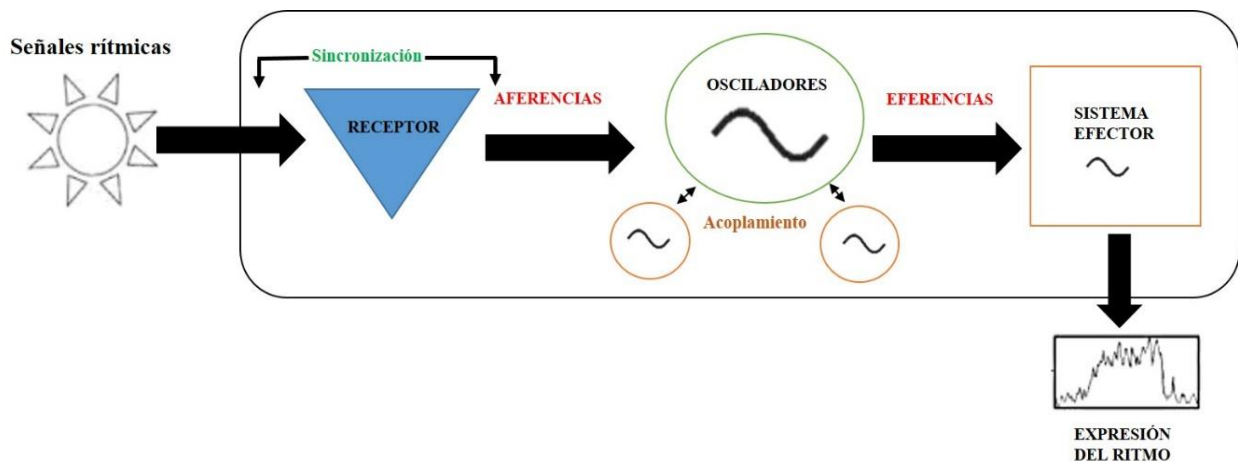


Figura 3. Representación esquemática de los elementos fundamentales que constituyen el sistema circadiano, el cual está constituido por receptores encargados de proporcionar información sobre los cambios ambientales para que pueda establecerse el proceso de sincronización. El sistema posee más de un elemento oscilatorio, estos osciladores mantienen el funcionamiento coordinado mediante el proceso de acoplamiento, para que la ritmicidad sea finalmente expresada, el sistema cuenta con vías eferentes hacia los efectores, proceso que se le denomina transmisión y se dé la expresión del ritmo (Modificado de Cambras y Díez 2000).

Uno de los procesos más relevantes para el sistema circadiano es la **sincronización**, proceso por el cual los osciladores internos ajustan su funcionamiento (fase y periodo) a la ocurrencia de las señales cíclicas ambientales. Dichas señales se denominan sincronizadores o *zeitgeber* (termino de origen alemán que se traduce literalmente como “dador de tiempo”) y funcionan como guías para que un organismo se pueda orientar respecto al tiempo geofísico (Aschoff 1981, Pittendrigh 1981a). Para que la sincronización se lleve a cabo se debe cumplir tres condiciones: 1) la señal ambiental sincronizadora debe ser regular y predecible, 2) los osciladores internos deben ser sensibles a dicha señal, 3) la señal sincronizadora debe producir una corrección diaria de la fase del oscilador (Pittendrigh 1981b).

En ausencia de señales sincronizadoras, el ritmo exhibirá el periodo endógeno; fenómeno que se le conoce como oscilación espontánea (Pittendrigh 1960, Klein 2004).

El ciclo de luz-obscuridad (L:O) es el principal sincronizador del sistema circadiano, sin embargo, existen una amplia variedad de señales cíclicas no luminosas, que también influyen o sincronizan el sistema circadiano. Algunas de las señales no-fóticas capaces de modular los ritmos circadianos reportadas en la literatura son la disponibilidad de alimento, la restricción materna, el amamantamiento, inyecciones hormonales, y en cultivos *in vitro* a exposiciones periódicas de concentraciones de suero, entre otros estímulos (Escobar y cols. 1998, Ohta 2003, Balsalobre y cols. 2000, Balsalobre 2002, Caldelas 2009).

Otro de los procesos de gran relevancia en el sistema circadiano, es el **acoplamiento**, a través del cual se mantiene el funcionamiento coordinado de los distintos osciladores circadianos distribuidos en todo el organismo, los cuales poseen diferentes periodos de oscilación espontánea. Este proceso va a ser posible mediante el ajuste del periodo y la fase entre los distintos osciladores (Pittendrigh 1981, Granados-Fuentes y cols. 1995). Hasta el momento se ha sugerido que el fenómeno de acoplamiento se lleva a cabo de tres maneras: 1) vía de secreción de hormonas, 2) vía parasimpática y 3) vía simpática del sistema nervioso autónomo y central.

En el humano se han identificado diferentes ritmos fisiológicos que mantienen un funcionamiento coordinado al ser sometidos a oscilación espontánea, estos ritmos muestran

distintos periodos circadianos y se pierde la relación de fase entre ellos a este fenómeno se le conoce como *desincronización interna* (Figura 4) (Aschoff 1981).

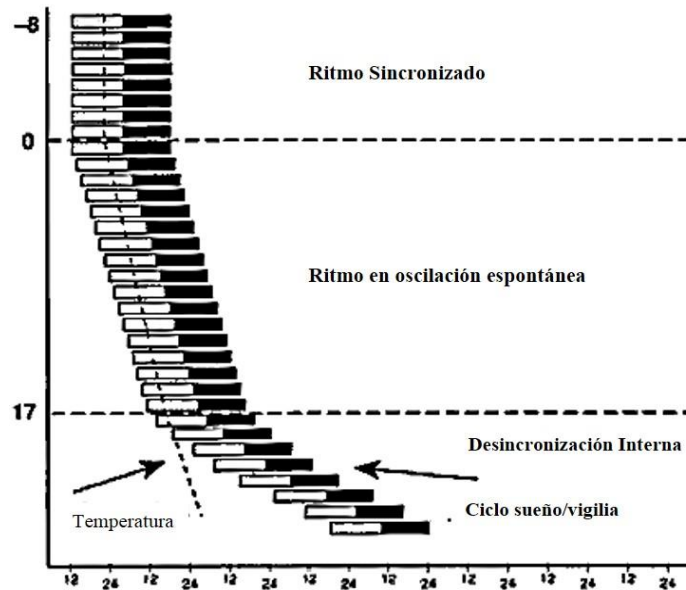


Figura 4. Ejemplo de desincronización interna de diferentes ritmos circadianos en humanos bajo condiciones de oscilación espontánea. En esta gráfica se muestra el ciclo temperatura rectal y sueño vigilia. El ritmo de temperatura queda bajo el control del ritmo endógeno, mientras que el de sueño vigilia adquiere un periodo mucho menor (Carninali y cols. 1994).

Se han descrito 3 formas de desincronización.

1) La desincronización externa. Se le conoce como a la pérdida de la sincronización entre el ritmo endógeno y el zeitgeber. Este fenómeno ocurre en seres humanos bajo condiciones normales por ejemplo, el ciclo sueño-vigilia y el ritmo de temperatura corporal muestran un periodo de 24 horas, con una relación de fase constante, sin embargo bajo condiciones de aislamiento temporal se pierde su relación de fase y muestran cada uno de estos ritmos periodos independientes. Esto sugiere la existencia de osciladores independientes para cada uno de los parámetros, los cuales se desacoplan en las condiciones experimentales descritas (Aschoff 1981).

2) La desincronización interna. Se le conoce a la pérdida de la relación entre las fluctuaciones del medio externo y las fluctuaciones de dos o más ritmos generadas por los osciladores en el organismo. Cuando se realiza un vuelo transmeridional los ritmos circadianos de diferentes

procesos fisiológicos, como son, ciclo de actividad-reposo, la calidad del sueño, la temperatura corporal y el ritmo cardiaco, se desajustan del horario local, se pierde la relación de fase con relación a la temporalidad. El organismo requiere algunos días para resincronizarse al nuevo horario bajo estas condiciones se ha encontrado que distintos parámetros muestran diferentes velocidades de resincronización (Moore-Ede y cols. 1982).

3) Desincronización interna forzada. Se produce al someter al organismo más de un sincronizador, que influyen en la temporalidad de solo algunas de las variables rítmicas circadianas y es posible lograr la separación de los distintos ritmos exponiendo a los sujetos a “días artificiales” con periodos diferentes (cerca de las 24 horas), siempre y cuando sea desconocido para ellos. En dichas condiciones algunos parámetros en estudio se sincronizan al periodo impuesto, mientras que otros presentan libre corrimiento (Weber 1983).

3.3 Osciladores y marcapasos

En organismos multicelulares se sabe que las funciones oscilatorias autónomas se han concentrado en un tipo particular de células acopladas entre sí, conocidas como marcapasos. Además, los marcapasos son capaces de coordinar la ritmicidad específica de los tejidos, mantener la precisión y la coherencia rítmica en el organismo (Bell-Pedersen y cols. 2005). Entre los marcapasos ya identificados se encuentran las neuronas ventrolaterales del cerebro de *Drosophila melanogaster*, la glándula pineal, células de la retina y el hipotálamo anterior están relacionadas con la generación de ritmos en aves (Gwinner y Brandstätter 2001), en reptiles (*Iguana iguana*) la retina, la glándula pineal y áreas del hipotálamo funcionan de la misma manera y en mamíferos el núcleo supraquiasmático y el bulbo olfativo (Bartell y cols. 2004, Caldelas y cols. 2007).

3.4 Bases anatómicas y moleculares de la generación de la ritmicidad circadiana

El Núcleo Supraquiasmático (NSQ) es considerado como el principal marcapasos identificado en mamíferos, es una estructura bilateral ubicada en la zona periventricular del hipotálamo anterior, dorsal al quiasma óptico (QO) y lateral al tercer ventrículo (III V) (Figura 5), encargada de regular y coordinar la actividad de todos los osciladores internos y de generar la ritmicidad de manera endógena y auto-sostenida (Reppert y Weaver 2002).

El NSQ está constituido por neuronas pequeñas de aproximadamente 12 μm de diámetro y consta entre 10,000 a 20,000 neuronas en roedores, lo que permite su fácil identificación en cortes coronales teñidos con tinción de Nissl (Figura 5). El NSQ se divide en dos áreas: la región ventrolateral (NSQvl), también llamada marginal, se encuentra adyacente al quiasma óptico y recibe la inervación de la retina; el principal neurotransmisor presente en las neuronas de esta región es el polipéptido vasoactivo intestinal (VIP), aunque también se puede encontrar en menor medida células que expresan calretinina, neurotensina, y el péptido liberador de la gastrina (GRP). La región dorsomedial (NSQdm) o interna envuelve parcialmente a la región ventral y está densamente inervada por esta, mientras que las proyecciones de la región dorsal hacia la ventral son más escasas. Se ha detectado abundante presencia de arginina vasopresina (AVP) en esta región, así como en menor medida angiotensina II y metencefalina. En la mayoría de las células del NSQ también se expresa el ácido gama-aminobutírico (GABA), aunque solo se presentan algunas neuronas glutamatérgicas. Cabe mencionar que la morfología del NSQ, la presencia y ausencia de neuropéptidos varía considerablemente entre especies (Moore y cols. 2002, Welsh cols. 2010, Moore 2013).

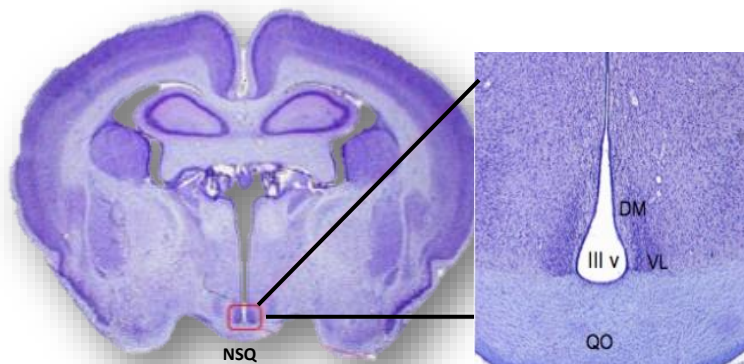


Figura 5. Fotomicrografía de un corte coronal del cerebro de conejo teñido mediante la técnica de Nissl mostrando la ubicación del NSQ. La imagen derecha muestra un acercamiento al hipotálamo, QO: quiasma óptico, III v: Tercer ventrículo, NSQ: Núcleo supraquiasmático, DM: Región Dorso Medial, VL: Región Ventrolateral (Caldelas y cols. 2007).

La identificación del NSQ se realizó por dos grupos de investigación de forma simultánea por Robert y Moore, y por Fred Stephan e Irvin Zucker (Weaver, 1998). A mediados del siglo

XX, Curt Richter realizó una serie de experimentos en los que lesionaba regiones cerebrales en ratas; con estos experimentos demostró que existían regiones hipotalámicas probablemente responsables de la ritmicidad circadiana, además sugirió que este sitio podría estar cerca del núcleo ventromedial (Richter 1967). Posteriormente, Moore fue el primero en describir una vía de comunicación no visual proveniente de la retina que inerva directamente al NSQ, conocida como tracto retino hipotalámico (TRH) en roedores y posteriormente en otros mamíferos (Moore y Lenn 1972). A partir de estos hallazgos, se realizaron lesiones electrolíticas bilaterales en el NSQ con la finalidad de identificar y corroborar su participación en la generación de los ritmos circadianos, el resultado fue la pérdida de los ritmos de actividad locomotora, ingesta de agua y niveles de corticosterona en sangre (Stephan y Zucker 1972, Moore y Eichler 1972).

A partir de este momento, los estudios se enfocaron en la identificación de las propiedades de las células que conforman al NSQ. Los primeros estudios revelaron que las neuronas de este núcleo exhiben actividad metabólica diferencial a lo largo del día, presentando una mayor actividad a mitad de la fase luminosa, y una posterior disminución durante la fase oscura (Schwartz y Gainer, 1977). Adicionalmente, una de las primeras evidencias sobre la autonomía en el funcionamiento circadiano de las células que conforman el NSQ, fue aislando tejido hipotalámico en animales previamente enucleados al medir la actividad eléctrica de áreas circuncindantes al hipotálamo, con lo que se observó pérdida de la ritmicidad mientras que la isla hipotalámica que contenía al NSQ persistió la ritmicidad, aún en ausencia de las conexiones neurales con el resto del cerebro (Inouye y Kawamura 1979). En otros estudios *in vitro* se monitoreó la actividad eléctrica de cortes hipotalámicos que contenían el NSQ, se observaron oscilaciones sostenidas hasta por tres días (Green y Gillette 1982).

A nivel celular, se sabe que las células del NSQ aisladas exhiben oscilaciones circadianas en su actividad eléctrica, esto significa que cada célula es capaz de oscilar de forma independiente (Welsh y cols. 1995). Otros estudios han demostrado que manteniendo neuronas del NSQ en cultivo estas mantienen oscilaciones robustas por varias semanas, mientras que en explantes de hígado bajo las mismas condiciones, la ritmicidad se pierde a los 7 días, hasta que un nuevo estímulo sincronizador las restaura, con ellos se demostró la

presencia del reloj molecular está inmerso dentro de las células a nivel individual en el marcapasos central y en los osciladores periféricos autosostenidos (Reppert y Weaver 2002).

En 1984 fue publicada una de las evidencias experimentales más reveladoras sobre la participación del NSQ como marcapasos circadiano en mamíferos. Ratas arrítmicas por lesiones electrolíticas del NSQ, recibieron un trasplante de un bloque de tejido fetal de hipotálamo anterior que contenía el NSQ, después de 4 semanas el ritmo diurno fue recuperado (Drucker-Colín y cols. 1984). Posteriormente, se reportó que al utilizar células del NSQ en suspensión se restaura la ritmicidad en la actividad locomotora (Silver y cols. 1990), lo que indica que no es necesario mantener la integridad estructural del NSQ, o tal vez que el NSQ puede volver a formar su propia integridad estructural tras ser trasplantado. Por otro lado, haciendo uso de la mutación autosómica tau, en el hámster dorado *Mesocricetus auratus*, cuya finalidad es acortar el periodo de actividad del animal en oscilación espontánea, se demostró que en hámsteres silvestres arrítmicos por lesiones previas al NSQ, quienes recibieron el trasplante de tejido fetal de NSQ de hámster mutantes tau, fueron capaces de restablecer la ritmicidad con el período endógeno y la fase del ritmo correspondiente al NSQ del donador (Ralph y cols. 1990).

Por lo tanto, después de conocer que las células del NSQ son capaces de funcionar como osciladores independientes se comenzó a indagar sobre las bases de generación de los ritmos circadianos. Utilizando diversas técnicas moleculares se realizaron los primeros estudios en la mosca *Drosophila melanogaster*.

En la década de los 70's se identificó la mutación de un gen en el cromosoma X de *D. melanogaster*, una de las variantes modificaba la duración del periodo del ritmo de actividad y de eclosión mientras que la otra hacía al organismo arrítmico, el gen fue llamado Periodo (*Per*) (Konopka y Benzer 1971). En 1990, se descubrió que la proteína del gen período de *Drosophila* se requiere para la acumulación cíclica de su propio ARNm y con ello se propuso que el gen período estaba involucrado en un circuito de retroalimentación autorreguladora. A partir del descubrimiento del gen *Per* en moscas y su participación en la generación de la ritmicidad circadiana, se fueron agregando componentes al reloj mediante manipulaciones genéticas y análisis de fenotipos conductuales (Ko y Takahashi 2006, Takahashi y cols. 2008).

A nivel molecular los mecanismos del reloj circadiano comparten homología entre especies y son altamente conservados. En todos los taxa coincide con la formación de asas de transcripción/traducción autorreguladas positiva y negativamente a través de las cuales, se lleva a cabo la producción rítmica del RNAm y de las proteínas involucradas en el reloj circadiano, que en conjunto son conocidos como “*genes reloj*”. En esta asa participan factores de transcripción: dos activadores **CLOCK** (*Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*, por sus siglas en inglés) y **BMAL1** (*Brain and Muscle Aryl hydrocarbon receptor translocator-like protein 1*) y dos represores **Per** (*Period*) y **Cry** (*Cryptochrome*) (Figura 6). Al inicio del día en el citoplasma de cada célula, los factores de transcripción CLOCK y BMAL1, forman un heterodímero (CLOCK-BMAL1) el cual se transloca al núcleo y al unirse a las cajas-E para activar la transcripción de los genes de las familias periodo (*Per1*, *Per2* y *Per3*) y Criptocromo (*Cry1* y *Cry2*). En el transcurso del día los niveles de *Per* y *Cry* aumentan, son traducidos en el citoplasma. Al final del día el nivel de sus respectivas proteínas aumentan, se da la formación del heterodímero PER-CRY el cual es fosforilado por la enzima caseína quinasa 1 épsilon (CK1 ϵ) o delta (CK1 δ), lo cual permite que el heterodímero se transloque al núcleo de la célula, para inhibir la actividad de CLOCK-BMAL1 y por tanto su propia transcripción (Ko y Takahashi 2006).

Por otra parte existe otra asa involucrada en la generación y regulación circadiana (Figura 6), la cual también incluye al heterodímero CLOCK:BMAL1 el cual activa la transcripción de los genes *Rev-erba* y *Rora*, estos son capaces de regular la expresión de *Bmal1*, activándola por medio de las proteínas ROR o reprimiéndola las proteínas REV-ERB quienes están directamente ligados al metabolismo de lípidos y la adipogénesis (Guillaumond y cols. 2005). Por otra parte, se sugiere que algunos genes controlados por el reloj (GCR) están modulados directamente por los procesos de auto regulación de CLOCK:BMAL1 en el NSQ, y la expresión de estos son los que producen los eventos rítmicos tales como la secreción rítmica de la arginina vasopresina presente en las neuronas del NSQ (Balsalobre 2002, Takahashi 2016). Para completar un ciclo de esta asa autoregulada toma aproximadamente 24 horas, por lo cual se dice que constituye un reloj molecular, el cual genera la ritmicidad en cada una de las células que lo expresan.

Las proteínas CLOCK:BMAL1 activan la transcripción de GCR (*Reverba*, *Dbp*, *E4bp4*, *Id2*, *Tlf*) y receptores nucleares (proteínas REV-ERB, ROR, PPAR α , PPAR γ y PPAR δ), que son reguladores transcripcionales claves del metabolismo de los lípidos. Estos receptores nucleares están regulados diurnamente en el hígado, el tejido adiposo blanco y marrón, así como por músculo (Yang y cols. 2006). Por lo tanto, estos funcionan como una interfaz entre el reloj molecular, con las redes transcripcionales involucradas en el metabolismo energético (Adamovich y cols. 2015).

La proteína REV-ERB α puede activar la transcripción de PPAR γ en el tejido adiposo, el cual está involucrado en la diferenciación de adipocitos y la regulación de la sensibilidad de la insulina (Fontaine y cols. 2003), a su vez PPAR γ es un co-activador de la proteína 1α coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PGC1 α), quien juega un papel central en la homeostasis de la glucosa y lípidos (Leone y cols. 2005).

Existen múltiples interacciones que vinculan al reloj molecular con el metabolismo intracelular a través de cambios en el estado redox, la sirtuína-1 desacetilasa dependiente de NAD⁺ (SIRT 1), la proteína quinasa activada por monofosfato de adenina (AMPK) y otros sensores metabólicos que interactúan con factores de transcripción metabólicos como son los receptores activados por proliferador de peroxisoma (PPAR), quienes participan en la expresión y modulación de diferentes genes mediante modificaciones post-traduccionales (Asher y cols. 2008, Hirayama y cols. 2008N).

En el caso de SIRT1 es una desacetilasa de histonas que contribuye al silenciamiento de genes y a una gran cantidad de procesos biológicos como la gluconeogénesis, sensibilidad y secreción de insulina, regulación de lípidos, por lo tanto es considerada un sensor metabólico intracelular clave que interactúa directamente con la proteína CLOCK (Asher y cols. 2008, Nakahata, y cols. 2008). La AMPK es otro sensor metabólico clave para la transmisión de señales dependientes de nutrientes y energía, contribuye a regular el balance energético y la ingesta calórica; se relaciona directamente con la maquinaria del reloj molecular (Jordan y Lamia 2013), cuya actividad incrementa en respuesta a las concentraciones ATP/AMP dentro de las células e interactúa directamente al impulsar la fosforilación de las proteínas PER y CRY, haciéndolas diana de la destrucción proteosomal y su degradación, respectivamente (Lamia y cols. 2009). Adicionalmente, controla la expresión de genes involucrados en el

metabolismo energético y funciona en coordinación con SIRT1, al incrementar los niveles de NAD⁺, a su vez AMPK incrementa la expresión de nicotinamida fosforibosil transferasa (NAMPT), quien es regulada por el heterodímero CLOCK:BMAL1, la cual está íntimamente relacionada con los niveles intracelulares de NAD⁺, induciendo la desacetilación de SIRT1 (Canto y cols. 2009). Adicionalmente, se ha demostrado que CLOCK:BMAL1 se une al promotor de SIRT1 y regula la sensibilidad a la insulina. Por lo tanto, la interacción de CLOCK:BMAL1 y la vía NAMPT / NAD⁺ / SIRT1 demuestra una conexión entre la maquinaria del reloj circadiano y las vías metabólicas (Figura 6).

Los nutrientes que se obtienen de la dieta también pueden funcionar como sensores metabólicos a través de receptores nucleares, factores de transcripción o co-activadores participando en la regulación del metabolismo, las concentraciones de glucosa, dióxido de carbono, los glucocorticoides, logran mantener una estrecha relación con las concentraciones de ATP/AMP que interactúan directamente en el asa de retroalimentación negativa y positiva de los genes de la maquinaria molecular del reloj circadiano (Figura 6).

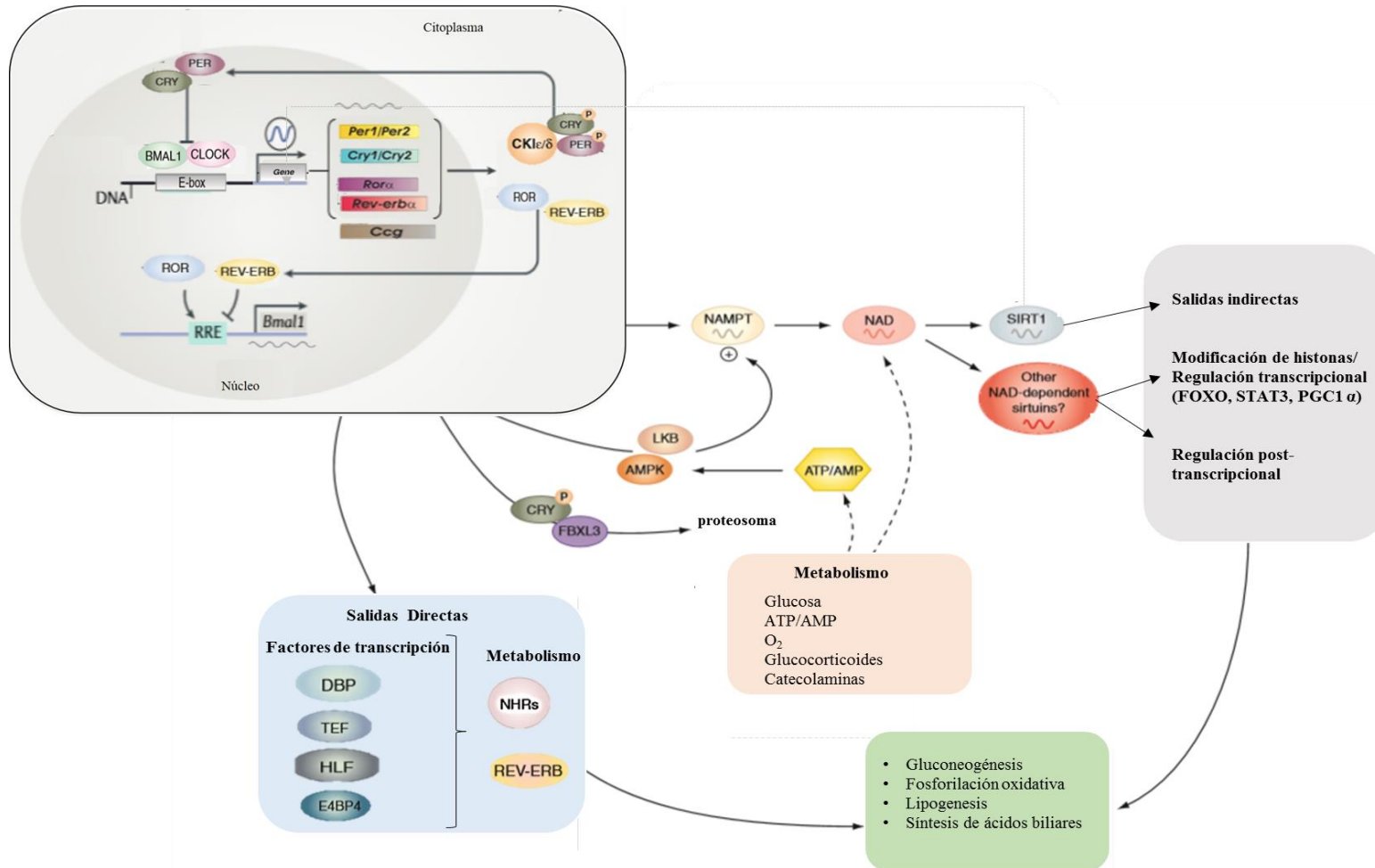


Figura 6. Mecanismo molecular propuesto para la generación de la ritmicidad circadiana en mamíferos: Asa de retroalimentación transcripcional y traduccional que involucra al activador transcripcional CLOCK:BMAL1 y sus genes blanco *Per*, *Cry*, cuyos productos regulan negativamente la acción del dímero, y a los genes *Rev-Erba* y *Rora* cuyos productos ejercen una regulación negativa y positiva respectivamente sobre *Bmal1*, regulando así su propia transcripción. Así mismo, se sincronizan diversos procesos metabólicos a través de salidas directas e indirectas que incluyen la gluconeogénesis y el metabolismo oxidativo, el cual también recibe entradas recíprocas de las vías de señalización de nutrientes (incluidos SIRT1 y AMPK), que funcionan como reóstatos para acoplar los ciclos circadianos al flujo metabólico, especialmente en los tejidos periféricos. Para mayor detalle consultar el texto (Bass y Takahashi 2010).

3.5 Aferencias del sistema circadiano de mamíferos

Las aferencias y eferencias son las vías de transmisión de la información rítmica hacia el marcapasos y de él mismo hacia otros blancos (Figura 7). En el caso de las aferencias se han caracterizado tres vías importantes: la principal vía aferente por la cual la luz llega al NSQ proviene del tracto retino hipotalámico (TRH). Esta proyección inicia en las células ganglionares de la retina e inerva la región ventral del NSQ (Berson y cols, 2002). Estudios realizados en ratones modificados genéticamente para la carencia de conos y bastones mostraron que esta ruta es totalmente independiente a la vía encargada de la percepción visual (Freedman cols. 1999). Se sabe que dicha vía involucra la participación de neurotransmisores tales como el glutamato y del polipéptido pituitario activador de la adenilato ciclasa (Hannibal 2002). Otra de las vías es el tracto genículo hipotalámico (TGH), el cual se origina de la retina y hace relevo en la hojuela intergeniculada (IGL) y posteriormente inerva el NSQ y representa una vía indirecta de la entrada de la información fótica. Las fibras del TGH liberan neuropéptido Y (NPY), que predominantemente inhibe las células del NSQ; adicionalmente se libera GABA para reforzar la naturaleza inhibitoria de la proyección (Moore 2013, Morin 2013). La última vía ampliamente descrita proviene de las fibras serotoninérgicas originadas en el núcleo medial del rafé (MR), los cuales inervan la zona ventrolateral del NSQ y liberan serotonina. Ambas aferencias (TGH y MR) en animales nocturnos, participan en ajustar el inicio de la actividad con el comienzo de la fase oscura. Se ha propuesto estas aferencias pueden transmitir información no-fótica hacia el NSQ, como la temperatura o el movimiento. A través de estas vías diversos estímulos también pueden ejercer influencia como sincronizador de los ritmos circadianos (Moore y cols. 2002).

Además de estas tres vías también se han encontrado otras aferencias al NSQ que se originan de estructuras hipotalámicas, por ejemplo, se ha descrito una densa inervación proveniente de las neuronas orexigénicas del hipotálamo lateral, las cuales activan la actividad neuronal del NSQ y actúa para acentuar la acción del NPY, lo cual implica que esta conexión también comunica información no-fótica (Burt y cols. 2010). El núcleo paraventricular del tálamo (PVT) también participa como modulador de la respuesta del NSQ a la luz, principalmente durante el final de la noche; además de ser una vía de entrada de información visceral y de modalidades sensoriales no-fóticas hacia el NSQ (Salazar-Juárez y cols. 2002). Las inervaciones del TRH, TGH y del MR convergen particularmente en la zona ventral del NSQ.

Por lo que se considera que las neuronas del NSQ integran la información fótica y no-fótica, para adaptar la fase del reloj molecular y conseguir la sincronización del sistema circadiano a las señales ambientales externas (Moore 2013, Morin 2013).

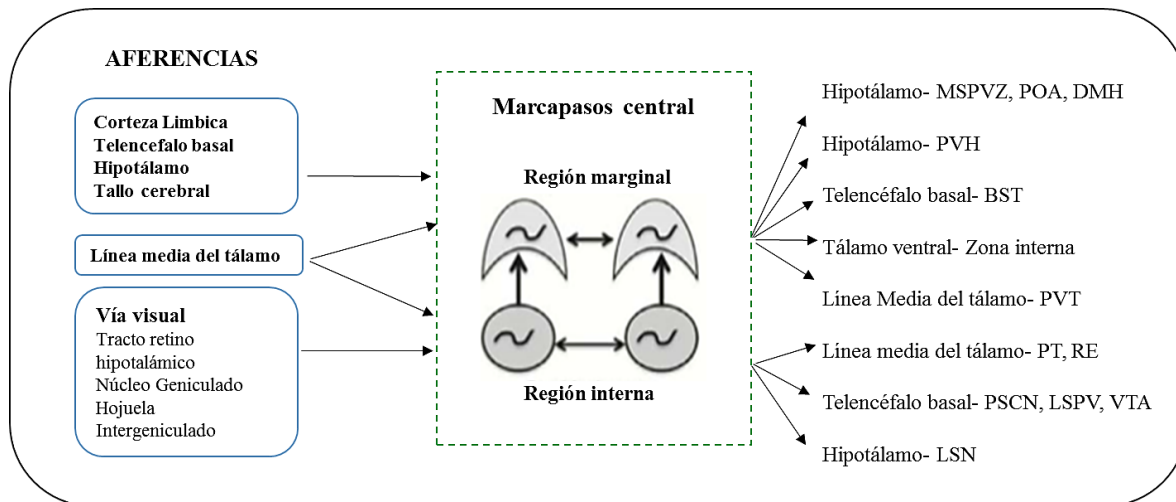


Figura 7. Resumen de las principales aferencias y eferencias del NSQ. BST, núcleo del lecho de la estría terminal; DMH, núcleo dorsomedial del hipotálamo; LSN, núcleo septal lateral; POA, área preóptica; PT, núcleo paratenial; PSCN, núcleo perisupraquiasmático; PVH, núcleo paraventricular del hipotálamo; PVT, núcleo paraventricular del tálamo; RE, núcleo reuniens; LSPVZ, área subparaventricular lateral; MSPVZ, área subparaventricular medial; VTA, área tuberal ventral; ZI, zona incerta (Modificado de Moore 2013).

3.6 Vías eferentes del sistema circadiano en mamíferos

Como marcapasos circadiano, el NSQ debe sincronizar al resto de los osciladores presentes en el organismo, este proceso se logra gracias a la comunicación de las señales rítmicas a otras áreas cerebrales encargadas del control de los procesos fisiológicos, metabólicos y conductuales de los mamíferos (Buijs y Kalsbeek 2001, Saper 2013). A través de marcajes anterógrado y retrogrado de las neuronas del NSQ se ha demostrado que existen conexiones sinápticas directas e indirectas con varias regiones cerebrales, como son el hipotálamo adyacente, el telencefalo basal, el tálamo ventral y la región medial del tálamo, el sistema olfativo, límbico y los órganos circumventriculares (Krout y cols. 2002). Se ha demostrado que muchos núcleos hipotalámicos, proyectan recíprocamente al NSQ y están implicados en la regulación circadiana de distintas funciones fisiológicas entre estos se encuentran: el área preóptica (POA), el núcleo paraventricular (PVT), el núcleo subparaventricular dorsal

relacionado con el control de la temperatura corporal, el núcleo subparaventricular ventral implicado en el control de niveles de actividad locomotora, el ciclo de sueño-vigilia, y el núcleo dorsomedial (DMH) implicado en el control de la actividad locomotora, el sueño, la alimentación y niveles de secreción de hormonas relacionadas con el estrés (Watts y cols. 1987, Chou y cols. 2003, Saper y cols. 2005, Abrahamson y Moore 2006, Buijs y cols. 2016). Por lo que se plantea que algunas de las conexiones directas del NSQ con áreas cerebrales específicas son el primer relevo de las vías de sincronización más complejas, que eventualmente regulan la ritmicidad del organismo entero.

Existe también una especialización en la organización de las aferencias y eferencias en la anatomía del NSQ. La corteza límbica, el área septal y el tallo cerebral proyectan principalmente a la zona interna del NSQ, mientras que las proyecciones de la IGL, el MR y la retina se dirigen a la región marginal del NSQ. Las proyecciones eferentes al área supraventricular medial (MSPVZ), área preóptica (POA), núcleo dorsomedial del hipotálamo (DMH), núcleo paraventricular del hipotálamo (PVH), núcleo del lecho de la estria terminal (BST), zona incerta (ZI), el PVT, núcleo paratenial (PT) y núcleo reuniens (RE) provienen de la zona interna, mientras que las que inervan al PSCN, LSPVZ, VTA y LSN provienen de la región marginal (Figura 7) (Vrang y cols. 2003, Deurveilher y Semba 2005).

Además se considera que diversos núcleos cerebrales, principalmente el hipotálamo adyacente y los osciladores periféricos, comunican señales temporales internas al NSQ que influyen en su actividad, en dicha comunicación pueden estar implicadas diversas señales como son las señales postraduccionales (desfosforilación, acetilación y la metilación), el estado de oxidación, señales extracelulares (neurotransmisores), intercambios iónicos transmembranales, señales hormonales (melatonina), el alimento, presión sanguínea, y la actividad locomotora, entre otros (Dibner y cols. 2010, Saper 2013). Todas estas señales rítmicas entrantes y salientes interactúan, son integradas para regular el estado fisiológico del organismo formando así una compleja red de regulación homeostática (Buijs y Kalsbeek 2001, Buijs y cols. 2016).

3.7 Osciladores periféricos en mamíferos

La identificación de la maquinaria molecular necesaria para la generación de los ritmos circadianos, ha permitido comprobar que la expresión rítmica de los genes reloj no es exclusiva del NSQ, ya que estos se expresan con ubiquidad en las células de mamífero (Takahashi 2016). En las últimas décadas se ha demostrado que un número importante de tejidos exhiben oscilaciones de los componentes centrales del asa molecular circadiana, a nivel del sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP). Abe y colaboradores (2002) realizaron estudios utilizando animales transgénicos caracterizados por emitir bioluminiscencia cuando expresan un gen reloj al que le fue acoplado en su secuencia promotora el gen reportero de luciferasa (Yamazaki y cols. 2000). Con este modelo encontraron que diferentes áreas cerebrales exhibían ritmicidad circadiana *in vitro* tales como la glándula pineal, la glándula pituitaria, el área retroquiasmática, la eminencia media y el bulbo olfativo, entre otras. Además se han registrado oscilaciones rítmicas de genes reloj en diversos núcleos del tálamo y del hipotálamo (Challet y cols. 2003, Buijss y cols. 2016).

Las oscilaciones circadianas no solo se limitan al SNC, desde 1998 se ha demostrado la expresión circadiana de los RNAm de los genes *Bmal1*, *Per1* y *Per2* en retina, corazón, riñón y pulmón de rata a distintas horas del día (Oishi y cols, 1998 a,b, Nakahata y cols. 1998). Mientras que en ratón, se describió la expresión oscilatoria del RNAm de *Per3* en hígado, músculo esquelético y testículo (Zylka cols. 1998). En diversos osciladores periféricos de rata y ratón, el patrón de expresión de 24 horas del gen *Bmal1* se caracteriza por oscilaciones marcadas del nivel del RNAm en antifase con respecto al de *Per* y *Cry*; mientras que el nivel del RNAm de *Clock* permanece estable en el perfil de 24 horas (Reppert y Weaver 2002, Fanarell y cols. 2011). En el hígado, los genes reloj se expresan abundantemente y muestran un ritmo circadiano (Hsieh y cols. 2010). En ratones bajo un ciclo luz oscuridad 12:12, en el hígado de ratones la acrofase del ritmo para *Per1* se encontró en ZT 09, durante la fase de luz, para *Per2* la acrofase del ritmo está en ZT 15, durante la fase oscura, y para el gen *Bmal1* su punto máximo es en ZT 03 durante el día. Durante los últimos años, diferentes estudios han identificado la maquinaria del reloj molecular en diferentes tejidos periféricos como el hígado, el pulmón, el riñón y el corazón (Mendoza y Challet 2009, Hastings y cols.

2014). La evidencia anterior indica que en todos estos órganos la expresión rítmica de los genes reloj sucede de manera similar que en el NSQ.

Existe una diferencia fundamental entre las oscilaciones del NSQ respecto a otros osciladores a nivel del SNC y SNP, se ha demostrado que en ratones *Per1-luc*, se realizaron explantes de músculo esquelético, hígado y pulmón, los cuales fueron mantenidos en cultivo por varios días presentaban ritmos de expresión del gen *Per1*, los cuales se amortiguaron después de 7 ciclos *in vitro*, en contraste con los explantes del NSQ que seguían oscilando después de semanas (Yamazaki y cols., 2000). Un estudio con ratones heterocigotos *mPer2^{Luc}* se demostró que las oscilaciones de los genes reloj en los osciladores periféricos *in vitro* se atenuaban rápidamente, posterior a 3-6 días (Yoo y cols. 2004). Esta gran diferencia radica en las interacciones intercelulares especializadas que ocurren en el NSQ y que le otorgan la identidad de marcapasos circadiano. En un estudio realizado por Liu y colaboradores (2007) examinaron la persistencia y dinámica de las oscilaciones del asa de retroalimentación del reloj circadiano en ratones y concluyeron que en ausencia de algunos componentes individuales del asa del reloj molecular, la ritmicidad del NSQ es rescatada gracias al acoplamiento de sus células, en comparación con los tejidos periféricos en los que el acoplamiento parece ser débil, ya que la pérdida de los componentes del asa molecular compromete la generación de la ritmicidad. Por lo que se considera que la existencia de un acoplamiento débil entre las células de los osciladores periféricos es una propiedad adaptativa, ya que les permitiría responder de forma más rápida y flexible, no solo a las señales sincronizadoras provenientes del NSQ, sino también a otras señales que pueden ser relevantes, tales como las metabólicas o conductuales (Hastings y Herzog 2004, Buhr y cols. 2010).

4. La regulación circadiana y su interacción con los procesos metabólicos

El control homeostático de la ingesta de alimentos, la disponibilidad de nutrientes, las señales de alimentación y saciedad se integran en el NSQ por una intrincada red de estructuras hipotalámicas y del tronco encefálico, las cuales están coordinadas por el sistema circadiano (Figura 8). El NSQ incide sobre el funcionamiento de otros centros extra hipotalámicos involucrados en el comportamiento, así como en centros hipotalámicos: ARC, DMH, HL, NPV y el TMN, quienes albergan osciladores secundarios (Guilding y Piggins 2007, Bujis y cols. 2003) los cuales están influenciados por los ciclos alimentación-ayuno. A su vez, estos núcleos tienen comunicación con el cuerpo estriado dorsal, el cerebelo y los núcleos parabranciales quienes se coordinan mediante vías autónomas y neuroendócrinas para la expresión circadiana de diferentes neurotransmisores y hormonas que regulan el apetito y la saciedad (Challet y cols. 2019).

Estas señales sistémicas sincronizan los relojes moleculares en los osciladores ubicados en los tejidos periféricos, que a su vez, expresan fluctuaciones circadianas en diversas variables metabólicas como son la insulina, el glucagón, la adiponectina, corticosterona la leptina y la grelina. Esta regulación endocrina, se consigue modulando la expresión o la actividad de las enzimas metabólicas y sistemas de transporte relacionados con el metabolismo del colesterol y glucosa, la regulación de aminoácidos (La Fleur y cols. 1999, Davidson y cols. 2004, Bodosi y cols. 2004, Froy 2007).

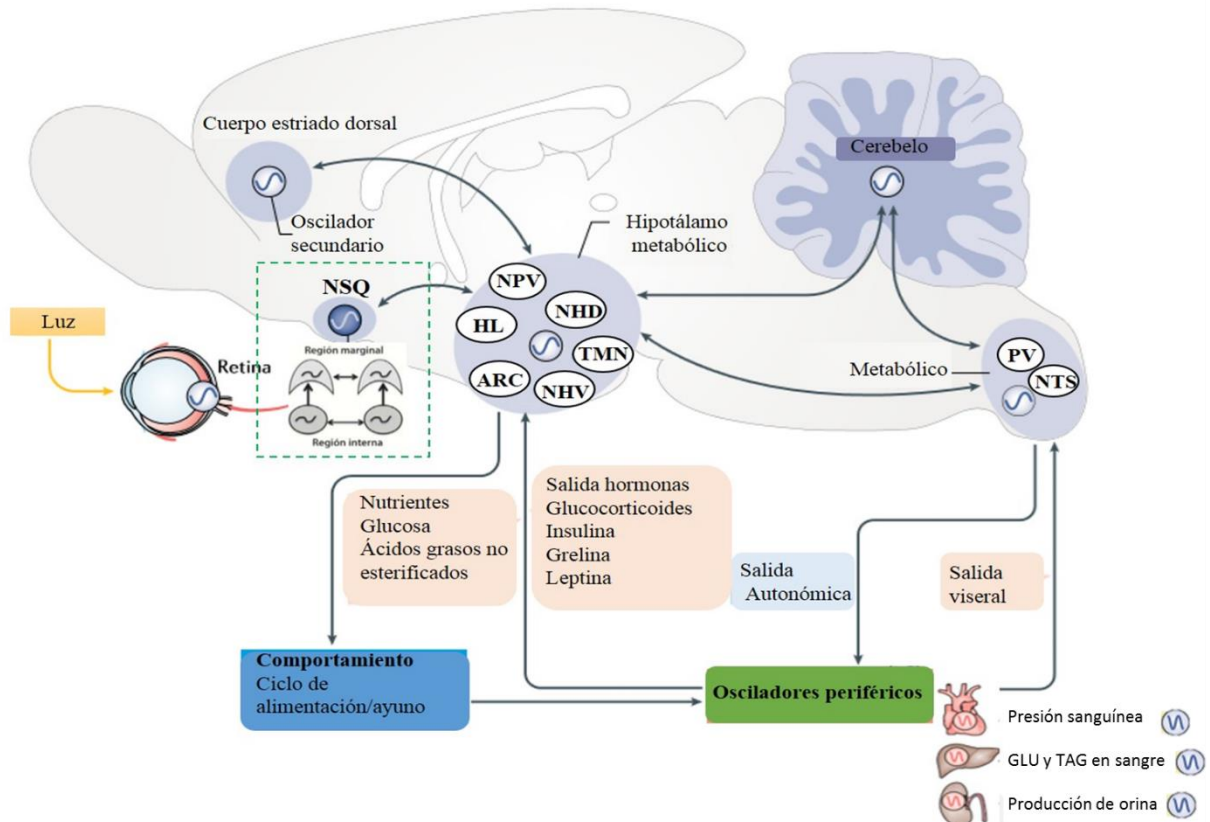


Figura 8. Imagen representativa del sistema multisilatorio del sistema circadiano y su comunicación con otros centros hipotalámicos sobre el metabolismo. El núcleo supraquiasmático (NSQ), Núcleo Arcuato (ARC), núcleo hipotalámico dorso medial (DMH), Hipotálamo lateral (HL), Núcleo Paraventricular (NPV), núcleo tuberomamilar (TMN) (Modificado de Challet 2019).

4.1 El sistema circadiano y su relación con el metabolismo de carbohidratos y lípidos

Además de las señales hormonales relacionadas con la alimentación, los nutrientes circulantes, incluida la glucosa, los ácidos grasos no esterificados y los cuerpos cetónicos, también envían señales al cerebro con la finalidad de regular el estado energético a nivel periférico. Los niveles plasmáticos de glucosa muestran variaciones diurnas y circadianas; sus niveles séricos se incrementan antes del despertar (fenómeno del alba) y su ritmicidad persiste bajo condiciones de ayuno, estas observaciones revelan un papel importante de un mecanismo circadiano endógeno en el metabolismo de la glucosa. De hecho, la ablación quirúrgica del NSQ o la manipulación genética de los componentes del reloj circadiano altera la homeostasis de la glucosa (La Fleur y cols. 1999, La Fleur y cols. 2001).

De forma similar a la glucosa, diferentes analitos asociados al metabolismo de lípidos exhiben variaciones circadianas tal es el caso de los ácidos grasos, triglicéridos, colesterol total, lipoproteínas de alta y baja densidad en diferentes especies (Escobar y cols. 1998, Kohsaka y cols. 2007, Montufar-Chaveznava y cols. 2013). La variación diurna en la síntesis de ácidos grasos está mediada por la proteína de unión a elementos reguladores de esterole-1c (Gilardi y cols. 2014), y por otras enzimas como la 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A (HMG-CoA) y colesterol 7 α -hidroxilasa (CYP7A1) quienes participan en la síntesis del colesterol y ácidos biliares, los cuales oscilan a lo largo del día. Por lo tanto, el sistema circadiano asegura que la síntesis de ácidos biliares sea más alta durante el período en que se consume la mayor cantidad de alimento. En el hígado, todos los miembros de la familia PPAR presentan variaciones diurnas, PPAR α que promueve la β -oxidación de los ácidos grasos mitocondriales a través de su interacción con el co-activador transcripcional PPAR γ y PGC-1 α (Yang y cols. 2006). PPAR promueve la utilización de ácidos grasos al comienzo de la noche (fase activa), lo que coincide con la búsqueda de alimento (Li y cols. 2012).

La regulación circadiana del metabolismo de los triglicéridos se logra a través de la expresión rítmica de varias enzimas involucradas en la biosíntesis de triglicéridos (Adamovich, y cols. 2014, Shostak y cols. 2013). Se sabe que la biosíntesis de los lípidos está regulada por las proteínas de unión a elementos reguladores del estero (SREBP), una familia de factores de transcripción de bHLH-LZ (Goldstein y cols. 2006), lo que se considera como un enlace regulador transcripcional entre SREBP y el sistema circadiano. Con lo anterior se ha demostrado que el sistema circadiano participa en la expresión temporal de diferentes enzimas y factores de transcripción están involucrados en la regulación temporal de diferentes variables metabólicas.

4.2 Alteraciones circadianas y el desarrollo de enfermedades metabólicas

Diversos estudios en modelos animales han demostrado que mutaciones del gen *Clock*, en ratones, los animales desarrollan hiperfagia, hiperglucemia, hiperlipidemia y estatois hepática y alteraciones en el ritmo de ingesta de alimento (Turek y cols. 2005). Otro componente esencial del reloj molecular en es el gen *Bmal1*, cuya eliminación conduce a un aumento de peso corporal a una edad temprana, así como a alteraciones en el metabolismo

de la glucosa, un incremento en las concentraciones de triglicéridos, ácidos grasos libres y colesterol en ratones (Rudic y cols. 2004 y Kenaway y cols. 2013). Además, ratones *knockout* en este mismo gen, estos animales presentan alteraciones metabólicas tales como cambios en la gluconeogénesis, menor capacidad de almacenamiento de grasa en el tejido adiposo, aumento en los niveles circulantes de triglicéridos, ácidos grasos libres y colesterol total, lo cual se asocia a la acumulación ectópica de grasa en el hígado y el músculo esquelético (Kondratov y cols. 2006 y Kondratova y cols. 2012, Shimba y cols. 2011). La mutación del gen *Per2* se observan niveles elevados de insulina y lípidos en plasma así como cambios en la gluconeogénesis (Schmutz y cols. 2010). En lo que respecta a ratones doble KO para *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* presentan un incremento en los niveles de glucosa en sangre (Lamia y cols. 2008, Lamia y cols. 2011). Con ello se demuestra que la maquinaria molecular del reloj circadiano juega un papel fundamental en la homeostasis energética.

Al suprimir la función de los genes reloj en otros tejidos diferentes al NSQ, se muestran diferentes alteraciones a nivel metabólico. En ratones con una delección del gen *Bmal1* específica para el músculo, muestran alteraciones en la captación de glucosa en los miocitos y un cambio en el metabolismo de los mismos (Dyar y cols. 2014, Dyar 2018 y Wada y cols. 2018). La eliminación del gen *Bmal1* en las células beta pancreáticas conduce a una reducción de la exocitosis de la insulina y estos animales desarrollan intolerancia a la glucosa e hiperglucemia (Marcheva y cols. 2010 y Perelis y cols. 2015). Adicionalmente, ratones KO para el gen *Bmal1* en el hígado, estos animales no logran exportar la glucosa almacenada en el hígado al torrente sanguíneo durante el ayuno (Lamia y cols. 2008).

Dado que los osciladores periféricos son arrastrados principalmente por señales de alimentación y ayuno, las alteraciones en el tiempo, la cantidad o la composición de la ingesta de alimentos pueden afectar la función normal del reloj. En las últimas dos décadas, diversos estudios han demostrado que no solo existe un control unidireccional del sistema metabólico por el sistema circadiano, también existe una retroalimentación por la cual el estado metabólico afecta la regulación del reloj circadiano en varios tejidos.

La ritmicidad circadiana se puede desorganizar por dos principales causas, la exposición a situaciones de desincronización como son cambios súbitos en el ciclo de luz-obscuridad, por ejemplo, el jet-lag, donde después de un viaje transmeridional los osciladores ajustan de

nuevo su fase a los cambios cíclicos ambientales como resultado de esta resincronización desaparecen los síntomas típicos del desfase de horario. Otro ejemplo son los trabajos por turnos nocturnos o rotatorios, se caracteriza por invertir los fases de actividad, condición que se sabe que produce alteraciones en la expresión del ritmo de la secreción de hormonas como cortisol y adrenalina, la temperatura corporal y el ritmo cardiaco, adicionalmente los sujetos que están bajo estos regímenes presenta alteraciones en la calidad del sueño, fatiga crónica, irritabilidad y son más propensos a desarrollo de obesidad, diabetes mellitus tipo II y ECV (Ekel-Mahan y cols. 2013 y Kumar y cols. 2015).

Estudios en modelos murinos, demuestran que la actividad forzada durante la fase de reposo produce incrementos en el peso corporal, adiposidad y tolerancia a la glucosa así como alteraciones en el perfil temporal de los genes reloj. La restricción de alimento en horarios en los que regularmente no ocurre la ingesta, reinicia por completo el funcionamiento de los osciladores periféricos y altera el balance energético (Stokkan y cols. 2001). Adicionalmente, cambiar el horario de alimentación a la fase de reposo causa alteraciones en la fase de expresión de los genes *Bmal1*, *Clock* y *Per1* en el hígado de ratas, la pérdida de la ritmicidad de algunos genes controlados por el reloj (GCR), como PPAR α y *Nampt*, lo que conlleva a un estado de desincronización dentro del propio hígado (Salgado-Delgado y cols. 2013). Otro estudio en ratones alimentados exclusivamente durante la fase de reposo causa alteraciones en la fase de expresión de los genes *Per1,2 y3* y *Cry1*, a nivel metabólico se ven alterados los genes *Dbp* y *Rev-erba*, los cuales invierten por completo su ritmo en el hígado, contrario a lo observado en el NSQ donde la ritmicidad de estos genes no se ve alterada. Lo que sugiere que las señales activadas por los alimentos actúan como *Zeitgebers* dominantes en los osciladores de los tejidos periféricos, además que el momento de alimentación puede causar un desacoplamiento del a nivel periférico (Damiola y cols. 2000).

4.3 Enfermedades metabólicas y su asociación con la ritmicidad circadiana

Las alteraciones metabólicas y la obesidad tienen un impacto en la generación y expresión de la ritmicidad circadiana. Ratas obesas Zucker las cuales cuentan con una mutación en el gen receptor de la leptina, se ha encontrado que la expresión de los ritmos circadianos de actividad, la ingesta de alimento y la temperatura corporal exhibe un avance de fase y una

disminución en la amplitud del ritmo (Fukagawa y cols. 1992). En modelos de ratones obesos, diabéticos ob/ob, se demostró que se interrumpe el mecanismo molecular de los tejidos periféricos en el hígado y tejido adiposo (Ando y cols. 2005, 2011). Además, en ratas diabéticas, la expresión del gen *Clock* se altera en el corazón, el hígado y el riñón (Oishi y cols. 2004).

Por otra parte, la ingesta de dietas altas en grasa, *ad libitum*, tiene efectos importantes en la organización temporal de roedores, los cuales incluyen cambios en la expresión de los ritmos actividad locomotora, ingesta de alimento y alteraciones en la expresión de genes reloj en el hígado y tejido adiposo (Kohsaka 2007). En ratones machos C57BL/6 el consumo de una dieta alta en grasas induce a un aumento en la masa corporal, niveles altos de triglicéridos plasmáticos y hepáticos, bajos niveles de adipocinas antiinflamatorias, alteraciones en el metabolismo de la glucosa, estatois hepática, así como una sobre expresión de proteínas lipogénicas lo cual se asocia con un decremento en la expresión de PPAR α y carnitina palmitoiltransferasa I (CPT-1) en el hígado, y una disminución de la expresión de PPAR gamma y adiponectina en el tejido adiposo blanco (Leung y cols. 2003).

Se ha demostrado que la ingesta de una dietas hipocalóricas tiene efectos en los patrones de expresión diurna de los genes *Per2* y *Cry1* en el NSQ, así como avances en la fase del ritmo en la actividad locomotora y en los niveles de expresión de ARNm de vasopresina (Mendoza y cols. 2007). Feillet y colaboradores (2006) mostraron que la alimentación hipocalórica incremento la expresión del RNAm de *Cry1* y una disminución en la expresión de *Bmal1* en el NSQ. Lo que sugiere que los genes del reloj podrían desempeñar un papel importante en la retroalimentación de información sobre el estado de los nutrientes de la dieta al NSQ. Una de las señales que posiblemente podrían estar involucrar son los niveles circulantes de AMP (Zhang y cols. 2006), lo que podría indicar que el estado energético pueden influir en alteraciones del sistema circadiano.

4.4 Malnutrición materna y alteraciones en la ritmicidad circadiana de la descendencia

En modelos animales, se ha estudiado el efecto de la exposición de la descendencia a un ambiente intrauterino metabólicamente desregulado, durante los periodos críticos del desarrollo. Por una parte, se han realizado estudios en roedores utilizando dietas isocalóricas,

en los que se ha encontrado que la desnutrición materna tiene efectos permanentes en diversos aspectos de la descendencia, que van desde bajo peso al nacer, crecimiento compensatorio durante las primeras semanas de vida y en la edad adulta exhiben alteraciones tanto a nivel del sistema nervioso como central, metabólico y conductual (Lukaszewski y cols. 2013).

La ingesta de dietas deficientes en proteínas durante la gestación tiene efectos importantes en la descendencia a nivel del transcriptoma, alterando la expresión de un grupo de genes que funciona como una red que controla el metabolismo y otros procesos celulares a nivel hipotalámico (Orozco-Solís y cols. 2010), incluyendo el funcionamiento del reloj molecular, en donde el patrón temporal de expresión de *Per1* y *Bmal1* se encuentran alterados (Orozco-Solís y cols. 2011). Por el contrario, el consumo de dietas hipercalóricas durante la gestación en la descendencia produce un aumento en el peso, hiperlipidemia e hiperglicemia así como alteraciones en la ritmicidad circadiana una disminución en la amplitud de la oscilación de los genes reloj en el tejido adiposo, hígado y páncreas (Hsieh y cols. 2010). En ratones machos C57BL / 6 de 3 a 4 semanas de edad e observaron cambios en los ritmos de glucosa, insulina, leptina, adiponectina, y corticosteroides (Barnea y cols. 2009), mientras que a nivel conductual se han mostrado alteraciones en la amplitud y en el periodo del ritmo bajo condiciones constantes así como un incremento en el consumo de alimento en el periodo de reposo (Kohsaka y cols. 2007, Mendoza y cols. 2007). Además, la exposición materna a una dieta obesogénica y posteriormente el consumo de una dieta alta en grasas postnatalmente, en la descendencia se observaron alteraciones en la expresión del ARNm de los genes *Clock*, *Bmal1*, *Rev-erba*, *Cry*, *Per*, *Ppara*, *Sirt1* en el hígado (Borengasser y cols. 2014) y presenta mayor susceptibilidad a desarrollar trastornos del comportamiento como ansiedad, depresión y déficit de atención (Sullivan y cols. 2014).

En modelos murinos se ha encontrado que el consumo de dietas altas en carbohidratos y lípidos durante la gestación, tiene efectos importantes sobre el funcionamiento del sistema circadiano de la descendencia quienes en la edad adulta exhiben importantes cambios en la temporalidad de la expresión de los genes *Per1*, *Per2*, y *Clock* en el páncreas, así como el gen *Bmal1* en el hígado (Carter y cols. 2014, Mouralidarane y cols. 2015). Por otra parte, la descendencia de madres que consumieron una dieta alta en grasas y sacarosa presentan altos

niveles de triacilglicéridos y glucógeno hepáticos, altos niveles de glucosa e insulina plasmática desarrollan esteatosis hepática (Kjaergaard y cols. 2014).

5. El conejo europeo como modelo de síndrome metabólico

El estado nutricional materno es un factor determinante para el porvenir metabólico de la descendencia, existen diversos modelos animales que han sido empleados para manipular el estado nutricional de la madre durante la gestación y poder estudiar las diferentes patologías que se desencadenan en la descendencia. Comúnmente en dichos estudios son utilizados los roedores a pesar de que estos modelos presentan serias limitaciones para el estudio del SM, ya que tienen diferencias considerables respecto a las características en el metabolismo lipídico, el sistema cardiovascular y el tipo de placenta que presentan respecto al ser humano.

En los últimos años el conejo Europeo (*Oryctolagus cuniculus*) ha generado gran interés como modelo experimental, para el estudio de los efectos a largo plazo de la administración de dietas hipercolesterolémicas, el desarrollo de hiperlipidemia y arterioesclerosis. Los conejos, al igual que los seres humanos, presentan altos niveles de apolipoproteína B y de proteína de transferencia de los ésteres de colesterol, un importante regulador de transporte reverso del colesterol (Picone y cols. 2011, Yamashita y cols. 2006), por lo que es una especie sensible a las grasas de tal forma que desarrollan patologías relacionadas con ECV (Waqar y cols. 2010). Por lo que el conejo ha sido adoptado como modelo de hiper-trigliceridemia postprandial y acumulación de grasa visceral, debido a que la distribución del tejido adiposo en los conejos parece ser más cercano a la disposición presente en el ser humano (Zhao y cols. 2007, Hue-Beauvais y cols. 2011).

Otro aspecto relevante de este modelo, es el tipo de placenta que poseen los conejos poseen una placenta hemocorial, la cual conecta directamente al corion del tejido fetal con la sangre materna. Se distingue por el número de capas que hacen la función de barrera entre el tejido materno y el tejido fetal. La placenta de los humanos posee una capa, por lo que se dice que es de tipo hemo-monocorial, el conejo posee dos capas celulares, es decir del tipo hemodicorial y es hemotricorial para las ratas y ratones, con tres capas celulares. El número de capas que separan al tejido materno del tejido fetal es considerado como un factor que puede modificar la transferencia de los nutrientes entre la madre y el feto (Furukawa y

Kuroda 2014). Por lo tanto, la anatomía y fisiología de la placenta en los conejos representa una ventaja en los estudios sobre el transporte materno *in útero* (Thornburg y cols. 2010).

En nuestro grupo de investigación, se ha implementado un modelo de sobre-nutrición materna en conejas Chinchilla, mediante la administración de una dieta desequilibrada (alta en grasas y carbohidratos: colesterol 0.1%, aceite de soya 4% y azúcar refinada 15%). El consumo de esta dieta en conejas adultas en etapa reproductiva, se asocia con un incremento en la ingesta calórica aportada por los carbohidratos y por los lípidos, respecto a las hembras alimentadas con dieta estándar. Adicionalmente, el consumo crónico de una dieta induce dislipidemia e hiperglucemia en las hembras, lo cual puede inducir un ambiente intrauterino desequilibrado para el desarrollo fetal de la descendencia (Navarrete y cols. en proceso).

II. JUSTIFICACIÓN

El SM es un importante problema de salud, en la actualidad el 53.7% de mujeres mexicanas en edad reproductiva lo presentan. Por lo tanto, resulta de suma importancia conocer el efecto del estado metabólico materno sobre la salud de sus descendientes a nivel cronostático y metabólico, a lo largo de su vida.

En nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que la ingesta calórica excesiva debida al consumo crónico de una dieta alta en grasas y carbohidratos, previo y durante la gestación, condiciona a la descendencia a exhibir alteraciones en la regulación cronostática y metabólica provocando cambios espontáneos en la expresión de diferentes patrones diurnos a nivel metabólico, fisiológicos y conductuales desde etapas tempranas de la vida, los cuales son un claro indicador de que los mecanismos de generación de la ritmicidad circadiana a nivel central o periférico podrían estar siendo alterados por la condición materna. Consideramos que dichos cambios pueden estar asociados a alteraciones en la relación de fase entre los osciladores y marcapasos circadianos. Por lo anterior el presente trabajo se enfoca en conocer los efectos de la sobre-nutrición crónica materna debido al consumo de dietas altas en grasas y carbohidratos, así como el consumo directo de la misma en etapas postnatales, en la descendencia de conejos sobre la regulación de la maquinaria molecular de osciladores circadianos a nivel central y periférico.

III. HIPÓTESIS

La sobre-nutrición materna por el consumo crónico de una dieta alta en lípidos y carbohidratos produce alteraciones en la regulación cronostática y metabólica en la descendencia. Es posible que dichas alteraciones estén asociadas a cambios en expresión de los componentes moleculares del reloj circadiano a nivel central y periférico, los cuales podrían verse exacerbados por una segunda exposición a la misma dieta en la edad adulta.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Establecer el efecto de la sobre-nutrición crónica materna por el consumo de una dieta alta en grasas y carbohidratos, así como el consumo directo de la misma (**reto alimenticio**) sobre la expresión de los componentes asociados al reloj molecular a nivel central y periférico, en la descendencia.

4.2 Objetivo específicos

En la descendencia obtenidos de hembras alimentadas con una dieta estándar (CON) y de hembras alimentadas con una dieta alta en lípidos y carbohidratos (SN), los cuales fueron expuestos en la edad adulta a un reto alimenticio:

1. Determinar el peso corporal y la ingesta de alimento, previo y posterior al reto alimenticio.
2. Caracterizar el perfil temporal metabólico.
3. Evaluar la presencia de daño hepático.
4. Determinar la expresión de los genes reloj *Per1*, *Cry1*, *Bmal1* y *Clock* en el marcapasos central (NSQ).
5. Determinar la expresión de los genes reloj *Per1*, *Cry1*, *Bmal1* y *Clock* en el oscilador periférico (hígado).

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Sujetos y alojamiento

El presente proyecto se llevó a cabo de acuerdo a los lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, sobre las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Así como los lineamientos para el cuidado y uso de animales de laboratorio contenidos en el código ético para el personal académico del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. El protocolo fue previamente revisado y aprobado por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas (permiso número 098).

5.1.1 Obtención y tratamiento de la descendencia

Para realizar dicho estudio se utilizaron un total de 48 conejos chinchilla (*Oryctolagus cuniculus*) de 440 días de edad. Estos fueron obtenidos de la colonia ubicada en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Estos animales fueron mantenidos en jaulas individuales (120 cm de largo x 60 cm de ancho x 45 cm de altura), bajo un fotoperiodo (L:D) de 12 horas luz y 12 horas oscuridad (encendido de las luces 9:00 y el apagado a las 21:00 horas), con una temperatura controlada entre $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa de 40-60%.

Los conejos con los que se trabajó provenían de dos grupos experimentales:

- **Grupo Control (CON):** Corresponden a las crías de madres alimentadas con una dieta estándar.
- **Grupo Sobre-nutrido (SN):** Crías obtenidas de madres alimentadas con una dieta desequilibrada durante la gestación, (alimento estándar suplementado con 4% de aceite de soya, 0.1% de colesterol y 15% de azúcar refinada).

Ambos grupos recibieron agua y alimento estándar *ad libitum* durante todo el experimento (Figura 9).

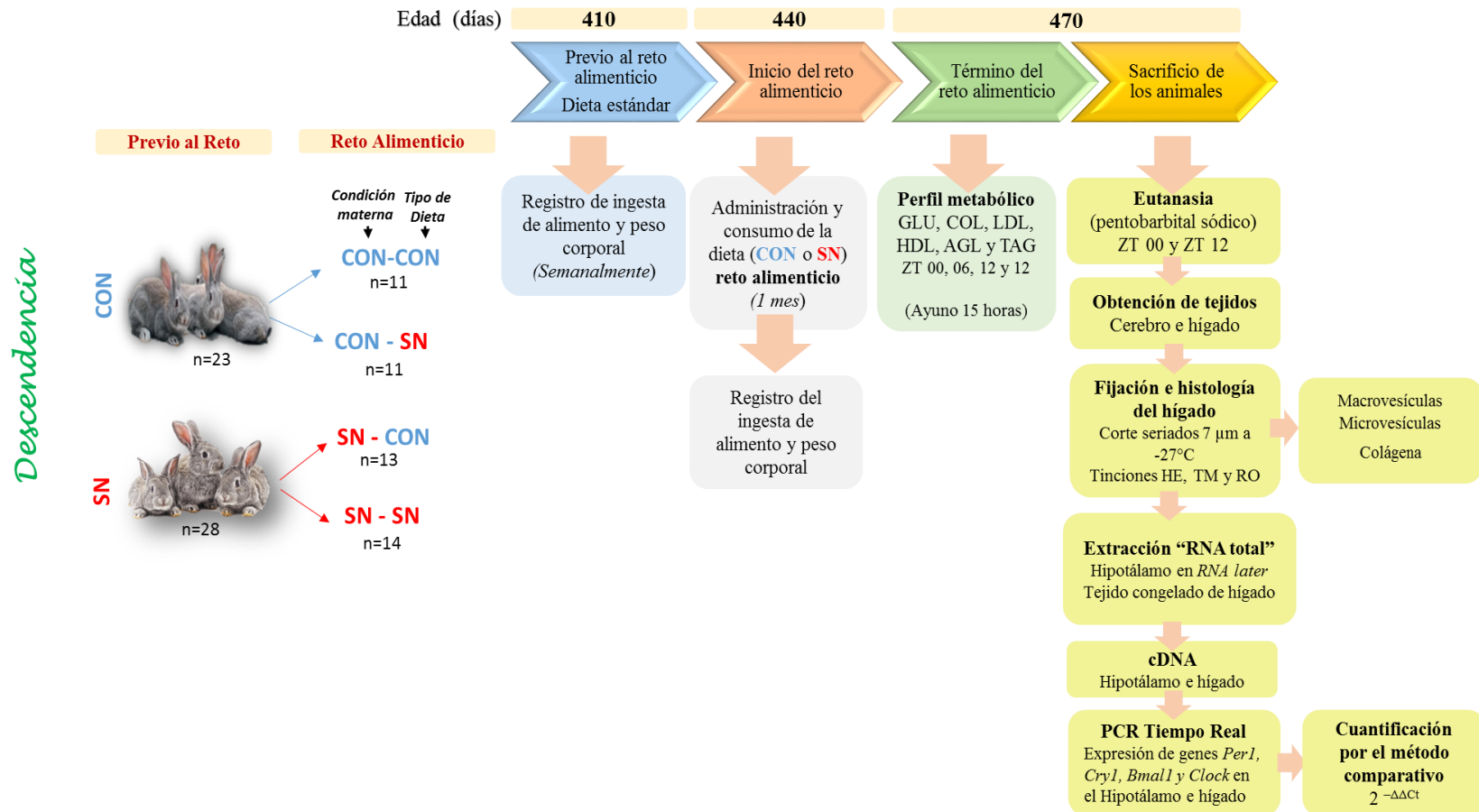


Figura 9. Esquema representativo del protocolo de alimentación y manipulaciones experimentales realizadas en la descendencia de conejos Chinchilla. A los 410 días los animales estaban divididos en dos grupos: **CON** (animales obtenidos de madres que consumieron una dieta estándar previo y durante la gestación) y el grupo **SN** (animales de obtenidos de madres que consumieron una dieta alta en grasa y carbohidratos). Ambos grupos desde el destete hasta los 410 días de edad consumieron un alimento **CON**. A los 440 días de edad ambos grupos de animales se sometieron a un reto alimenticio los cuales se subdividieron en 4 grupos: El grupo **CON-CON** (condición materna: **CON**; tipo de dieta durante el reto: **CON**), **CON-SN** (condición materna: **CON**; tipo de dieta durante el reto: **SN**), **SN-CON** (condición materna: **SN**; tipo de dieta durante el reto: **CON**) y el **SN-SN** (condición materna: **SN**; tipo de dieta durante el reto: **SN**). Las letras **CON** representan el consumo de alimento estándar y **SN** representa el consumo de alimento alto en grasas y carbohidratos. Se muestran las manipulaciones experimentales realizadas en este estudio.

5.1.2 Tratamiento nutricional con alimento alto en grasas y carbohidratos consumido por la descendencia

A los 440 días de edad los conejos se sometieron a un reto metabólico durante un mes, el cual consistió en proporcionarles una dieta con alimento estándar (CON) o alto en grasas y carbohidratos (SN). Para tal motivo los sujetos de ambos grupos (CON y SN) se subdividieron en 4 grupos experimentales (Tabla 4). La primera condición representa la dieta que recibió la madre durante la gestación (condición materna), y la segunda representa la dieta que consumieron postnatalmente (reto alimenticio).

Tabla 4. Grupos experimentales y tratamiento nutricional de la descendencia.

<i>Grupos experimentales</i>	<i>Condición materna</i>	<i>Reto alimenticio</i>	<i>Abreviaturas del grupo</i>
Control-Control	Control	Control	CON-CON
Control- Sobrenutrido	Control	Sobre-nutrido	CON-SN
Sobrenutrido-Control	Sobre-nutrido	Control	SN-CON
Sobrenutrido- Sobrenutrido	Sobre-nutrido	Sobre-nutrido	SN-SN

Todos los animales recibieron agua y alimento *ad libitum* durante todo el experimento (Figura 10).

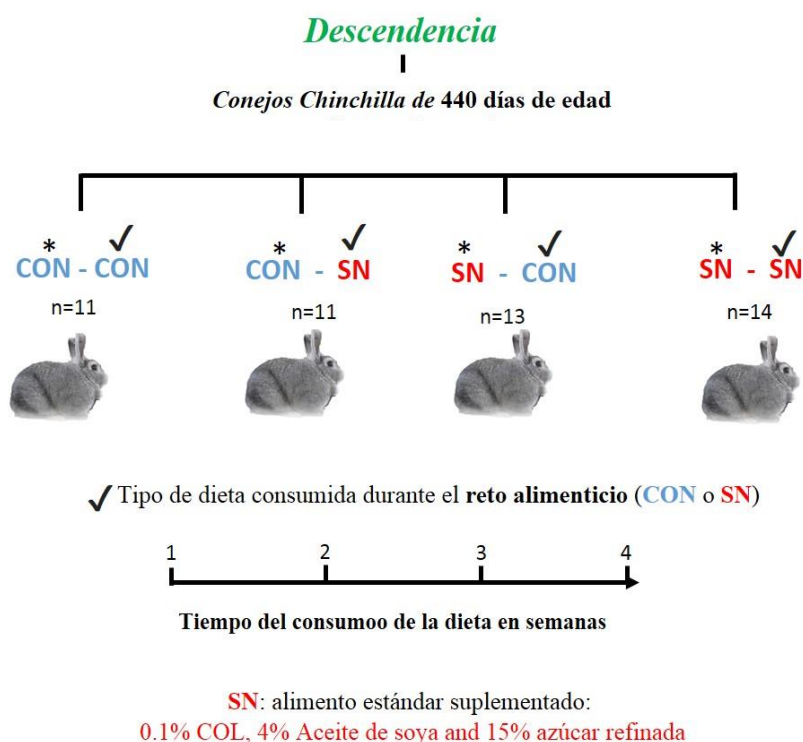


Figura 10. Esquema representativo del tratamiento nutricional que recibió la descendencia durante el reto alimenticio. El grupo **CON-CON** (condición materna: **CON**; tipo de dieta durante el reto: **CON**), **CON-SN** (condición materna: **CON**; tipo de dieta durante el reto: **SN**), **SN-CON** (condición materna: **SN**; tipo de dieta durante el reto: **CON**) y **SN-SN** (condición materna: **SN**; tipo de dieta durante el reto: **SN**). El * representa el tipo de dieta que consumió la madre previo y durante la gestación (condición materna) y la ✓ representa el tipo de dieta consumida durante el reto alimenticio.

A diferencia de lo que ocurre en roedores, no existe una dieta comercial suplementada para conejos, por tal motivo, nos dimos a la tarea de elaborar la dieta que le fue administrada a los grupos (**CON-SN** y **SN-SN**). La composición nutricional de cada tipo de dieta se muestra en la Tabla 5.

Para tal efecto, los pelets del alimento estándar fueron pulverizados con ayuda de un molino marca (TORREY M-22-RW-1, México), después el alimento fue suplemento con 0.1% colesterol, 4% aceite de soya y 15% de azúcar refinada, posteriormente el alimento fue peletizado y secado a temperatura ambiente.

Tabla 5. Contenido nutricional de las dietas (por 100g de alimento) administradas a las madres pie de cría.

Composición	Dieta estándar	Dieta estándar suplementada
Humedad	5.61%	12.80%
Proteína cruda	15.73%	11.22%
Lípidos	3.83%	5.58%
Minerales Totales (Cenizas)	11.56%	7.58%
Fibra Cruda	15.39%	10.21%
Carbohidratos	47.87%	52.61%
Energía Metabolizable Kcal/Kg	2542.57	2609.15

5.2 Determinación de metabolitos en suero de la descendencia

Con la finalidad de caracterizar el patrón diurno metabólico de la descendencia a los 440 días de edad, fueron determinados los niveles séricos de glucosa (GLU), ácidos grasos no esterificados (AGL), triglicéridos (TAG), colesterol total (COL), colesterol de alta y baja densidad (HDL y LDL) y glicerol (GLI).

Para tal efecto los animales fueron sometidos a un ayuno de 15 horas, posteriormente las muestras fueron obtenidas cada 6 horas en los siguientes horarios 9:00, 15:00, 21:00 y 3:00 (los cuales corresponden a la hora del sincronizador a ZT 00, ZT 06, ZT 12 y ZT 18, respectivamente). Para tal motivo, los animales se colocaron en un cepo de manta para impedir su movilidad, en la arteria central de la oreja se les implanto un catéter (SURFLASH I.V con punzocat amarillo 24G^{X(3/4)} de 19 mm (THERMO, Japón) y la sangre fue colectada en un tubo Vacutainer de 3 ml. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 3,500 rpm, durante 15 min y el suero fue colectado en tubos eppendorf de 0.5 ml, los cuales fueron almacenadas a -70 °C para su posterior análisis por colorimetría (Kits Randox®, USA).

5.3 Obtención y procesamiento de tejidos de los animales

Los animales fueron sacrificados a los 470 días de edad, en los siguientes horarios a las 9:00 y 21:00 horas, las cuales corresponden a la hora del sincronizador en ZT 00 y ZT 12, respectivamente. Los animales fueron colocados en un cepo de manta para impedir su movilidad, fueron expuestos a una dosis de 3 mL de sevoflurano inhalado (Abbott, México) y en la vena marginal de la oreja izquierda se les inyectó una sobredosis 30 mg/kg de pentobarbital (Pisabental®, Pisa Agropecuaria, México). Posteriormente, los animales fueron decapitados con ayuda de una guillotina e inmediatamente se obtuvo el cerebro. Se realizó un corte longitudinal dividiéndolo en los dos hemisferios, la mitad del cerebro se colocó en 2-metilbutano (J.T. Baker®, USA) y se mantuvo a -20°C, posteriormente, con ayuda de un microscopio esteroscópico, se realizó un corte en forma de pirámide que contenía el hipotálamo anterior e inmediatamente fue colocado en tubos de 1.5 ml conservados en RNAlater, respecto al hígado se pesó e inmediatamente se colocó en nitrógeno líquido y fue disecado finalmente ambos tejidos fueron almacenados a -70 °C hasta su uso.

5.3.1 Marcadores bioquímicos de daño hepático y análisis histológico del hígado

Con la finalidad de determinar el efecto sobre-nutrición crónica materna por el consumo de dietas alta en grasas y carbohidratos, así como el consumo directo de la misma (**reto alimenticio**) en los cuatro grupos bajo estudio, a los 440 días de edad se evaluaron los niveles séricos de la gamma glutamil transferasa (GGT), bilirubina (BIL), aspartato amino transferasa (ASL) y alanina aminotransferasa (ALT), mediante colorimetría.

Con la finalidad de determinar esteatosis hepática, se realizó un análisis histológico de este tejido. Para tal efecto, un bloque de a aproximadamente 2.5 x 3 cm de hígado fue expuesto a un tren de fijación, iniciando con formalina al 4%, durante 2 días, seguido de concentraciones crecientes de sacarosa (10%, 20% y 30%), durante 2 días en cada concentración, posteriormente, los hígados se congelaron a -20 °C. Finalmente, se realizaron 4 cortes seriados de 7 µm de grosor del lóbulo principal, los cuales fueron realizados con un criostato (Microm HM520, International GmbH, Alemania), a -27 °C.

Para la identificación de estructurales locales (hepatocitos, espacios sinusoidales y núcleos hepáticos), presencia de macrovesículas y satelitosis, se realizó la tinción de hematoxilina

eosina (HE). Mientras que para identificar gotas lipídicas, se realizó la tinción de ojo oleoso (RO). Para identificar presencia de colágena, se llevó a cabo la tinción tricromica de Masson (TM). Todas estas tinciones fueron realizadas mediante procedimientos estándar. Para realizar la evaluación histológica, las secciones fueron digitalizadas con un microscopio de campo claro (Olympus BX51, Life Science Solutions, USA) acoplado a una cámara Réflex (EOS Rebel T5i, Canon®, USA).

En el caso de las secciones teñidas con HE, se utilizó una magnificación de 4x para identificar macrovesículas, y 20x para presencia de inflamación. En el caso del RO se utilizó una magnificación de 4x para la identificación de microvesículas. Finalmente para TM se obtuvieron imágenes con una magnificación 20x para identificar colágena. Fueron digitalizadas tres secciones por sujeto en cada tinción, para ello cada corte se subdividió en área superior e inferior y en cada área se localizaron las tres zonas del acino hepático (1, 2 y 3), se utilizó como punto de referencia la vena central.

5.4 Extracción RNA total

5.4.1 Extracción RNA total de hipotálamo

La extracción del RNA total del hipotálamo del cerebro de conejos machos, se realizó mediante el kit Direct-zol™ RNA MiniPrep Plus (Zymo Research, USA) siguiendo las especificaciones del proveedor. Inicialmente, la muestra fue lisada con un homogenizador (TissueRuptor, Qiagen, USA) y solución TRIZOL Reagent®. La muestra se centrifugó con la finalidad de separar los restos celulares de la fase acuosa, se recuperó cuidadosamente el sobrenadante, y se le adicionó un volumen de etanol al 100% y se mezcló por inversión. Para eliminar el DNA genómico, la muestra fue tratada con DNAsa I (RNase-Free, DNase Set, Qiagen, USA) durante 20 minutos a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, se lavó dos veces con el buffer del kit RNA PreWash, para asegurar la eliminación completa del buffer de lavado se utilizó el Wash Buffer. Finalmente, el RNA total se eluyó con agua libre de RNAsas.

Con el fin de verificar el grado de integridad del RNA total obtenido, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1 % con TBE 1x, teñido con SYBER green. La concentración y pureza del RNA obtenida con una relación A260/280, fueron cuantificadas

mediante el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA). Los resultados se pueden consultar en el apartado de Anexos A.

5.4.2 Extracción RNA total de hígado

La extracción del RNA total del hígado de conejos machos se realizó mediante el kit RNeasy® Mini Kit Quick-Start (Qiagen, USA), a partir de 30 mg de tejido congelado a -70 °C, siguiendo las especificaciones del proveedor. Inicialmente, la muestra fue lisada con un homogenizador y solución RLT + mercaptoetanol. La muestra se mantuvo en temperatura ambiente 20 minutos y centrifugó con la finalidad de separar los restos celulares de la fase acuosa, se recuperó cuidadosamente el sobrenadante y se le adicionó un volumen de etanol al 70% el cual fue mezclado por inversión. Posteriormente, se recuperó 700 µl de la muestra y se colocó en las columnas RNeasy Mini. Para eliminar el DNA genómico, la muestra fue tratada con DNase I (Qiagen, USA) durante 20 minutos a TA. Transcurrido ese tiempo, se lavó una vez con la solución del kit RW1, y dos veces con Buffer RPE para asegurar la eliminación completa del buffer de lavado. Finalmente, el RNA total se eluyó con agua libre de RNAsas.

Con el fin de verificar el grado de integridad del RNA total obtenido, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1 % con TBE 1x, teñido con SYBER Green. La concentración y pureza del RNA de la misma forma antes mencionada. Los resultados se pueden consultar en el apartado de Anexos A.

5.5 Síntesis de cDNA para hipotálamo e hígado.

Transcripción Reversa: la síntesis de cDNA se realizó a partir de 1 µg de RNA, utilizando la enzima transcriptasa reversa (Sigma, Roch, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor. Fue utilizado: 1µl de Oligo DT, 1µl de Random Primer, 2 µl dNTP's, 4 µl Buffer RT [5x] y 0.5 µl de RNase out. El cDNA fueron almacenadas a -20 °C hasta su uso.

5.6 Estandarización de la qRT-PCR

Se utilizaron sondas Taqman marcadas con FAM, las cuales fueron diseñadas por Applied Biosystem de secuencias específicas para los genes endógenos (*Tbp*, *Gapdh*, *Hprt*, *Tub*, *H2afv* y *Pppia*) y para los genes blanco o de interés *Bmall*, *Clock*, *Per1* y *Cry1* con la

referencia a la especie *Oryctolagus cuniculus*. La descripción detallada de las secuencias se puede consultar en la parte de Anexos B.

El volumen de la reacción total fue de 10 μ L, utilizando para ello 10 μ L de Master Mix (2x), 1 μ L de cada ensayo [10mM], después de las curvas de validación se determinó utilizar 10 ng de cDNA como templado y por último 4 μ L de agua grado biología molecular.

La expresión de todos los genes fue cuantificada por el método de comparación relativa de Ct. Para ello, se calculó la fase exponencial de la amplificación de la fluorescencia del reportero. Se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para calcular los cambios relativos en la expresión de cada gen. Las condiciones de amplificación utilizadas en todas las corridas fueron: 50 °C durante 2 minutos, 95 °C durante 10 minutos, 45 ciclos a 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto, y finalmente 25 °C durante 10 minutos. Cada ensayo se realizó por triplicado. Los datos fueron obtenidos de un ciclador de PCR Tiempo real Rotor-Gene Q (Qiagen, USA), el programa utilizado para la obtención de los datos fue Q-Rex Software, Copyright ©2010 (Qiagen GmbH, USA).

5.6.1 Estandarización de la PCR tiempo real por el método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ en hipotálamo

Para poder aplicar este método fue necesario primero validar las eficiencias de amplificación de las sondas utilizadas, para ello, se realizó una curva estándar a partir de 5 diluciones de cDNA: 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 y 1:3125. Los valores del Ct que se obtuvieron a partir de la amplificación se graficaron para realizar una regresión semi-logarítmica. La regresión cumplió sus dos parámetros necesarios:

Valor de la pendiente -3.1 a -3.58

Índice de correlación (R^2) de 0.99

Con ello se asegura la eficiencia del 100% de los ensayos durante la reacción. En la Tabla 6 podemos observar los valores correspondientes a la pendiente y los índices de correlación para cada uno de los genes evaluados en este trabajo.

Las curvas de expresión y eficiencia para cada uno de los genes utilizados en este estudio se encuentran en la parte de anexos C.

Tabla 6. Curvas de eficiencia, valor de la pendiente y R².

Nombre del gen	Valor de la pendiente	R ²	Eficiencia
<i>Gapdh</i>	-3.42	0.99	0.96
<i>Hprt</i>	-3.56	0.99	0.91
<i>Ppia</i>	-3.58	0.99	0.95
<i>H2afv</i>	-3.38	0.99	0.98
<i>β-actina</i>	-3.57	0.96	0.91
<i>Tbp</i>	-3.36	0.99	0.98
<i>Tub</i>	-3.58	0.99	0.90
<i>Per1</i>	-3.48	0.99	0.94
<i>Cry 1</i>	-3.36	0.99	0.98
<i>Bmal 1</i>	-3.39	0.99	0.97
<i>Clock</i>	-3.55	0.99	0.92

Posteriormente, con la finalidad de validar la normalización en la expresión de todos los genes endógenos (*Gapdh*, *Hprt*, *Pppia*, *H2afv*, *β-actina*, *Tbp* y *Tub*) respecto a cada gen blanco (*Per1*, *Cry1*, *Bmal1* y *Clock*) en cada una de las diluciones (1:5, 1:25, 1:125, 1:625 y 1:3125), se realizó una regresión lineal, la cual se obtuvo a partir del Log de la concentración de cada dilución respecto a la diferencia del promedio de la expresión del Ct del gen endógeno y el promedio de la expresión del Ct del gen blanco. La regresión cumplió con el siguiente parámetro:

Valor de la pendiente: -0.1 a 0.1

En la Tabla 7 podemos observar los valores correspondientes a la pendiente para cada uno de los genes bajo estudio. Las curvas de normalización se encuentran en la parte de Anexos D.

Tabla 7. Curvas de normalización. Valores de la pendiente de los genes endógenos vs genes blanco.

Gen endógeno	<i>Per1</i>	<i>Cry1</i>	<i>Bmal1</i>	<i>Clock</i>	Diluciones
	m	m	M	M	
<i>Hprt</i>	0.09	-0.1	-0.02	0.03	1:5 a 1:625
<i>H2afv</i>	-0.01	-0.10	0.005	-0.08	1:5 a 1:312
<i>Ppia</i>	0.1	0.11	0.002	0.06	1:5 a 1:625
<i>Tbp</i>	-0.11	-0.007	NF	NF	1:5 a 1:125
<i>Tub</i>	0.09	0.11	-0.15	NF	1:5 a 1:125
<i>Gapdh</i>	NF	NF	-0.03	0.08	1:25 a 1:312
<i>B-Act</i>	NF	NF	NF	0.02	1:5 a 1:125

NF: Valor de la pendiente fuera del rango establecido

Los genes *Tbp*, *Tub*, *Gapdh* y *B-Act* mostraron un valor de la pendiente fuera del rango permitido. Por lo tanto, se descartaron como posibles genes de referencia.

Una vez normalizados los genes y obtenidas las diferentes diluciones en las que se encontró el mejor rango dinámico. Se procedió analizar la estabilidad de los genes endógenos (*Hprt*, *Ppia* y *H2afv*) obtenidos como los mejores genes de referencia mediante el programa *NormFinder*, el cual utiliza un modelo de análisis de varianza en los datos de expresión, lo que permite hacer una evaluación comparando los niveles de expresión en las distintas condiciones (CON-CON, CON-SN, SN-CON y SN-SN) y los diferentes tiempos (ZT00 y ZT 12).

El objetivo de *NormFinder* es la identificación del mejor gen de referencia con una variación entre los grupos lo más cercana a cero como sea posible (Andersen y cols. 2004).

En este estudio se utilizó como gen de referencia a *Ppia* para el hipotálamo. Los resultados obtenidos por *NormFinder* se muestran en la parte de Anexos E.

5.6.2 Estandarización de la PCR tiempo real por el método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ en el hígado

Una vez validadas las eficiencias de amplificación de los genes blancos y endógenos, así como el rango dinámico de trabajo en el hipotálamo. En el hígado solo fue necesario seleccionar la dilución óptima dentro del rango dinámico ya establecido. Para ello se probaron las diluciones, antes mencionadas, en todos los genes endógenos y blancos de interés. La dilución de cDNA con la que se trabajó fue 1:25. Posteriormente, el resto de los genes endógenos y blancos de interés se evaluaron comparando los niveles de expresión en las distintas condiciones (CON-CON, CON-SN, SN-CON y SN-SN) y en los tiempos (ZT 00 y ZT 12). Finalmente, se procedió a analizar la estabilidad de los genes endógenos (*Hprt*, *Ppia* y *H2afv*) y se obtuvo el mejor gen de referencia mediante el programa *NormFinder*. Para este caso el mejor gen de referencia fue *H2afv*. Los resultados obtenidos por el *NormFinder* se muestran en la parte de Anexos F.

5.7 Análisis cuantitativo de la expresión génica por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ en hipotálamo e hígado.

Con la finalidad de calcular los cambios relativos de la expresión del RNAm de los genes de la maquinaria molecular del reloj circadiano en el hipotálamo y en el hígado se utilizó el método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, de la siguiente manera.

1.- Se calcula el primer $\Delta Ct = Ct$ (gen de interés de la muestra) - Ct (gen referencia utilizado como normalizador), donde Ct (muestra) y Ct (normalizador) es el ciclo al cual la muestra y el normalizador respectivamente alcanzan el nivel de umbral de fluorescencia en el ensayo de PCR en Tiempo Real.

2.- Se calcula el $\Delta\Delta Ct$: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (muestra de interés) - ΔCt (calibrador).

Se utiliza la muestra control (no tratado) como calibrador. En este caso, el $\Delta\Delta Ct$ del calibrador es 0 y su expresión relativa 2^0 es igual a 1, por definición.

3.- Finalmente para realizar el cálculo en la expresión relativa del RNAm se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Con el fin de determinar el efecto de la sobre-nutrición materna y el consumo directo de la misma sobre la expresión de los genes de la maquinaria del reloj molecular (*Bmal1*, *Clock*, *Cry1* y *Per1*) en cada una de las condiciones bajo estudio entre dos puntos del ciclo luz/obscuridad (ZT 00 y ZT 12) en ambos tejidos. Los datos fueron analizados mediante una ANOVA de dos vías seguida de una prueba post hoc de Fisher.

5.8 Análisis de datos del perfil metabólico en suero

Con la finalidad de identificar cambios a lo largo del día en los niveles séricos de los diferentes metabolitos, estos se evaluaron usando una ANOVA de una vía.

Para determinar una oscilación de los diferentes metabolitos en suero, con un periodo de 24 horas se realizó un ajuste COSINOR, del cual se obtuvieron la acrofase, el mesor, la amplitud, el porcentaje de ritmicidad. El análisis ajusta los datos a una función cosenosoidal mediante la expresión matemática de mínimos cuadrados.

Para evaluar si las variables bajo estudio (GLU, COL, LDL, HDL, AGL y TAG) presentan una oscilación rítmica, se tomaron en cuenta tres criterios:

- 1.- Valor de significancia menor a 0.05, obtenido a partir de la ANOVA de una vía
- 2.- Porcentaje de ritmicidad mayor al 50%, obtenido a partir del análisis COSINOR
- 3.- Valor de significancia menor a 0.05, obtenido a partir del análisis COSINOR

Se consideró rítmico al cumplirse dos de los tres criterios mencionados anteriormente.

Con el fin de determinar el efecto de la sobre-nutrición materna y el consumo directo de la misma en los niveles séricos de cada metabolito entre los grupos en los diferentes puntos temporales del ciclo luz/obscuridad, los datos fueron analizados mediante una ANOVA de dos vías, seguida de una prueba post hoc Bonferroni/Dunn.

Todos los datos fueron analizados mediante el paquete estadístico StatView (SAS, Estados Unidos).

VI. RESULTADOS

6.1 Peso corporal previo y posterior al reto alimenticio

En cuanto al efecto de la sobre-nutrición crónica materna por el consumo de dietas alta en grasas y carbohidratos, así como el consumo directo de la misma (**reto alimenticio**) sobre el peso corporal, el análisis de varianza solo mostró diferencias significativas en la interacción (Grupo: $F_{(3,353)}=1.8, p=0.1$; Reto: $F_{(1,353)}=23.3, p=0.11$; Interacción: $F_{(3,353)}=3.6, p=<0.0001$). Previo y posterior al reto alimenticio, los animales de los cuatro grupos bajo estudio mostraron una tendencia similar en el peso corporal (Figura 11).

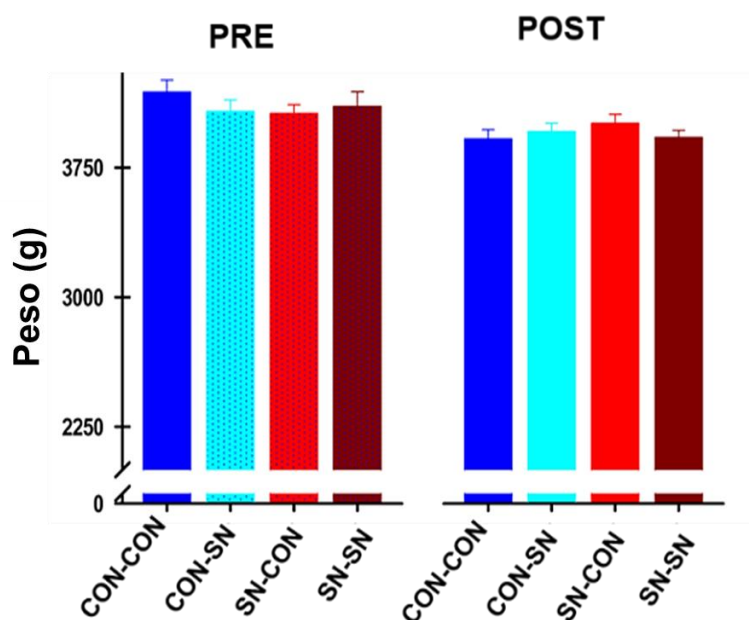


Figura 11. Promedio del peso corporal en gramos de conejos Chinchilla (*Oryctolagus cuniculus*) en edad adulta. Previo y posterior al reto alimenticio. Las barras azules representan a los animales de madres que consumieron una dieta estándar durante la gestación y postnatalmente consumieron alimento estándar (CON-CON), las barras verdes representan a los animales obtenidos de madres que consumieron una dieta estándar durante la gestación y postnatalmente consumieron la dieta desbalanceada (CON-SN), las barras rojas representan a los animales obtenidos de madres que consumieron una dieta desbalanceada durante la gestación y postnatalmente consumieron una dieta estándar (SN-CON) y las barras color rojo oscuro representan a los animales obtenidos de madres que consumieron una dieta desbalanceada durante la gestación y postnatalmente tuvieron una segunda exposición a la dieta desbalanceada (SN-SN). Los valores están representados como medias \pm E.E.

6.2 Ingesta de alimento

Respecto a la ingesta de alimento, previo al reto alimenticio, el análisis de varianza mostró diferencias significativas entre las fases del ciclo y la interacción entre los factores (Grupo: $F_{(3,236)}=1.6$, $p=0.1$; Fase: $F_{(1,236)}=170.3$ $p<0.0001$; Interacción: $F_{(3,236)}=7$, $p<0.0001$). Durante la fase de luz, los animales de los cuatro grupos bajo estudio consumieron una cantidad similar de alimento que va de 47.7 a 57.4 gramos. En la fase oscura, los animales de todos los grupos mostraron un incremento significativo en la ingesta de alimento del 34%-103%, en relación a lo consumido durante la fase de luz. Es de notar que los animales de los grupos CON-SN, SN-CON y SN-SN ingirieron significativamente menos alimento en comparación a los animales del grupo CON-CON durante esta misma fase (Tabla 8; Figura 12A).

Posterior al reto alimenticio se observaron cambios significativos en el consumo de alimento entre los cuatro grupos bajo estudio, en ambas fases del ciclo y la interacción de los factores (Grupo: $F_{(3,490)}=7.3$, $p<0.0001$; Fase: $F_{(1,490)}=88.2$ $p<0.0001$; Interacción: $F_{(3,490)}=3.7$, $p=0.01$). En la fase de luz, los animales de los cuatro grupos consumieron una cantidad similar de alimento entre el 56 a 63.5 gramos (Tabla 8; Figura 14B). Mientras que en la fase oscura, los animales de los cuatro grupos mostraron un incremento significativo en la ingesta de alimento de un 28%-82%, en relación a la fase de luz (Tabla 8; Figura 12B).

En cuanto al efecto de la sobre-nutrición materna aunado al reto alimenticio sobre el consumo de alimento en la fase de luz, la ANOVA mostró un efecto significativo de la segunda exposición a la dieta desbalanceada (Grupo: $F_{(3,353)}=2.1$, $p=0.1$; Reto: $F_{(1,353)}=4.9$ $p=0.02$; Interacción: $F_{(3,353)}=0.1$, $p=0.4$). Los animales del grupo CON-SN mostraron un incremento significativo en el consumo de alimento en la fase de luz en relación al consumo previo al reto en esta misma fase del ciclo (Figura 12 A y B). Durante la fase oscura, fueron evidentes cambios asociados a los grupos (Grupo: $F_{(3,353)}=7.4$, $p<0.0001$; Reto: $F_{(1,353)}=0.001$ $p=0.9$; Interacción: $F_{(3,490)}=0.4$, $p=0.7$). Los animales de los grupos CON-SN, SN-CON y SN-SN mostraron una disminución significativa en el consumo de alimento en comparación con los animales del grupo CON-CON en esta misma fase (Figura 12 A y B).

Tabla 8. Ingesta de alimento previo y posterior al reto alimenticio en conejos adultos.

	Previo al reto			Posterior al reto		
	<i>Fase de Luz</i>	<i>Fase Oscura</i>	<i>P</i>	<i>Fase de Luz</i>	<i>Fase oscura</i>	<i>p</i>
CON-CON	48.8±2.9	99.3±4.9*	<0.0001	56±2.9	102±4.4*	<0.0001
CON-SN	47.7±2.3	84.6±2.9*	<0.0001	60.4±3.8	79.1±4.6*	<0.0001
SN-CON	57.4±2.6	77.1±3.5*	<0.0001	58.1±3.4	80±3.2*	<0.0001
SN-SN	57.4±3.6	80.6±04.7*	<0.0001	63.5±3.5	81.3±3.9*	<0.0001

Los *muestran diferencias significativas entre la fase oscura vs a la fase de luz de cada grupo bajo estudio.

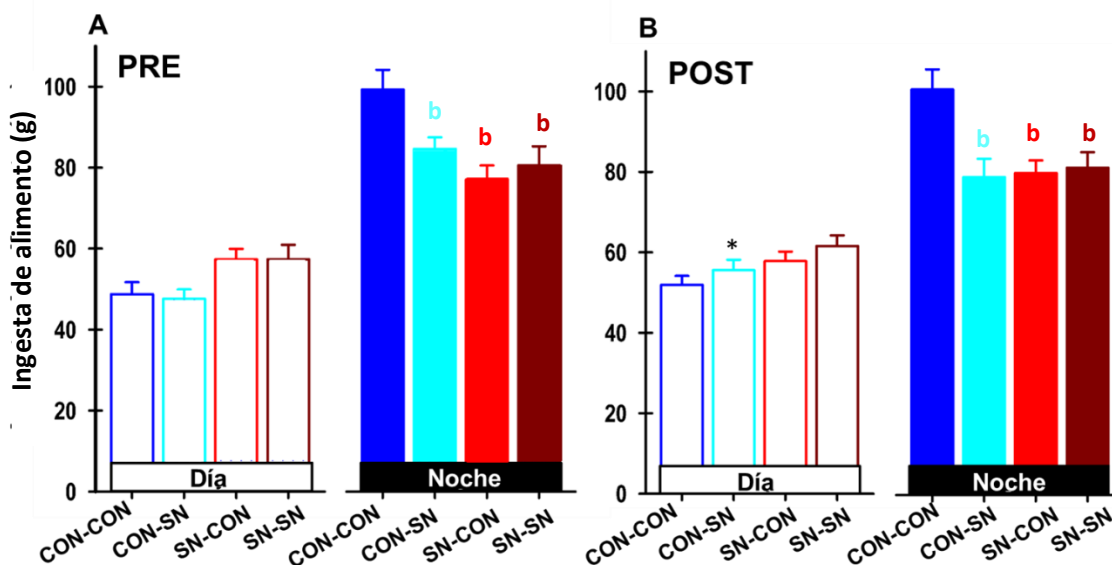


Figura 12. Promedio de la ingesta de alimento en gramos de conejos Chinchilla en la edad adulta durante el día y la noche. (A) Previo (B) Posterior al reto alimenticio. Las barras azules representan a los animales de madres que consumieron una dieta estándar durante la gestación y postnatalmente consumieron alimento estándar (CON-CON), las barras verdes representan a los animales nacidos de madres que consumieron una dieta estándar durante la gestación y postnatalmente consumieron la dieta desbalanceada (CON-SN), las barras rojas representan a los animales obtenidos de madres que consumieron una dieta desbalanceada durante la gestación y postnatalmente consumieron una dieta estándar (SN-CON) y las barras rojo oscuro representan a los animales obtenidos de madres que consumieron una dieta desbalanceada durante la gestación y postnatalmente tuvieron una segunda exposición a la dieta desbalanceada (SN-SN). Las letras representan diferencias significativas entre los grupos en la misma fase vs al grupo CON-CON ($p < 0.05$). Los * muestran diferencias significativas entre los mismo grupos previo y posterior al reto alimenticio en la misma fase del ciclo ($p < 0.0001$). Los valores están representados como medias \pm E.E.

6.2.1 Ingesta de kilocalorías aportadas por los carbohidratos

En relación a las kilocalorías aportadas por los carbohidratos (kcal/carbohidratos), previo al reto alimenticio, el análisis de varianza mostró cambios significativos en la fase y la interacción de los factores (Grupo: $F_{(3,236)}=1.6$, $p=0.1$; Fase: $F_{(1,236)}= 170.3$ $p<0.0001$; Interacción: $F_{(3,236)}=7$, $p<0.0001$). En la fase de luz los animales de los cuatro grupos bajo estudio consumieron una cantidad similar de alimento que va de 60.8 a 71.5 de kcal/carbohidratos. En la fase oscura, los animales de todos los grupos incrementaron su consumo un 35% a un 104% en relación a las kcal/carbohidratos consumidas, en relación a la fase de luz. Es de notar que en esta misma fase, los animales de los grupos CON-SN, SN-CON y SN-SN consumieron del 19% a 23% menos kcal/carbohidratos en comparación al grupo CON-CON (Tabla 9; Figura 13A).

Posterior al reto alimenticio, el análisis de varianza mostró cambios significativos en la ingesta de kcal/carbohidratos entre los grupos, las fases del ciclo y la interacción entre ambos factores (Grupo: $F_{(3,490)}=7.3$, $p<0.0001$; Fase: $F_{(1,490)}= 88.2$ $p<0.0001$; Interacción: $F_{(3,490)}=3.7$, $p=0.01$). En la fase de luz, los animales de los grupos CON-CON y SN-CON ingirieron una cantidad similar de kcal/carbohidratos consumidas. En contraste, con los grupos CON-SN y SN-SN presentaron un incremento significativo en la ingesta de kcal/carbohidratos (34% al 44%, respectivamente) en relación al grupo CON-CON. Como era de esperarse en la fase oscura, los animales de todos los grupos incrementaron el consumo de kcal/carbohidratos en relación a la fase de luz. En esta misma fase, los animales del grupo SN-CON mostraron un decremento significativo en el consumo de kcal/carbohidratos del 21% en comparación al grupo CON-CON (Tabla 9; Figura 13B).

Tabla 9. Consumo de kcal aportadas por los carbohidratos previo y posterior al reto alimenticio en conejos adultos.

	Previo al reto			Posterior al reto		
	Fase de luz	Fase oscura	P	Fase de luz	Fase oscura	P
CON-CON	60.8±3.7	123.8±6.1*	<0.001	66.5±3.4	125.7±6.2*	<0.001
CON-SN	59.4±2.9	105.5±3.6*	<0.001	89.4±5.9	118.5±6.6*	0.0002
SN-CON	71.5±3.2	96.1±4.3*	<0.001	72.4±4.2	99.8±3.9*	0.0002
SN-SN	71.5±4.5	100.5±5.9*	<0.001	95.7±5.3	121.9±5.9*	0.0002

Los * representan diferencias significativas entre la fase de luz vs a la fase oscura previo y posterior al reto alimenticio.

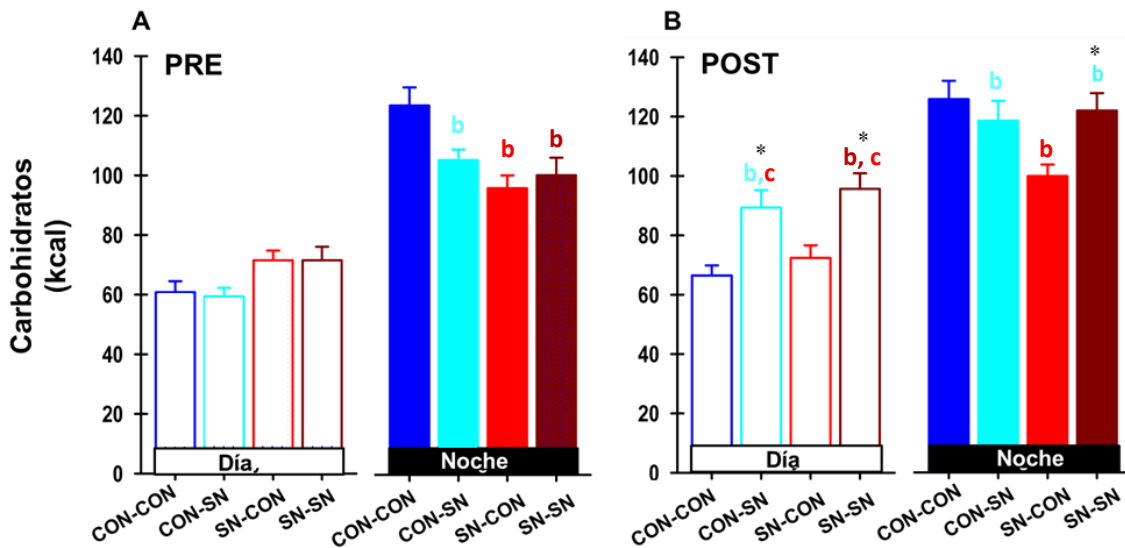


Figura 13. Promedio de la ingesta de kilocalorías aportada por carbohidratos en conejos Chinchilla en la edad adulta durante el día y la noche. (A) Previo (B) Posterior al reto alimenticio. Las barras azules representan a los animales de madres que consumieron una dieta estándar durante la gestación y postnatalmente consumieron alimento estándar (CON-CON), las barras verdes representan a los animales nacidos de madres que consumieron una dieta estándar durante la gestación y postnatalmente consumieron la dieta desbalanceada (CON-SN), las barras rojas representan a los animales obtenidos de madres que consumieron una dieta desbalanceada durante la gestación y postnatalmente consumieron una dieta estándar (SN-CON) y las barras rojo oscuro representan a los animales obtenidos de madres que consumieron una dieta desbalanceada durante la gestación y postnatalmente tuvieron una segunda exposición a la dieta desbalanceada (SN-SN). Las letras representan diferencias significativas entre los grupos en la misma fase vs al grupo CON-CON ($p < 0.05$). Los * muestran diferencias significativas entre los mismo grupos previo y posterior al reto alimenticio en la misma fase del ciclo ($p < 0.0001$). Los valores están representados como medias \pm E.E.

En cuanto al efecto de la sobre-nutrición materna aunado al reto alimenticio sobre la ingesta de kcal/carbohidratos durante la fase de luz, la ANOVA mostró un efecto significativo entre los grupos de estudio, el reto alimenticio y la interacción entre ambos factores (Grupo: $F_{(3,353)}=4.2$, $p<0.005$; Reto: $F_{(1,353)}=15.7$, $p<0.0001$; Interacción: $F_{(3,353)}=3.7$, $p=0.01$). Posterior al reto, los animales del grupo CON-SN y SN-SN, mostraron un incremento significativo del consumo de kcal/carbohidratos (50% y 34%, respectivamente), en relación a las consumidas previo al reto (Figura 13A y B). Durante la fase oscura, la ANOVA mostró diferencias significativas entre los grupos bajo estudio y el reto alimenticio (Grupo: $F_{(3,353)}=7.4$, $p<0.0001$; Reto: $F_{(1,353)}=0.001$ $p=NS$; Interacción: $F_{(3,490)}=0.4$, $p=NS$). Únicamente los animales del grupo SN-SN exhibieron un incremento significativo en la ingesta de kcal/carbohidratos en relación a los consumidos previo al reto durante la misma fase (Figura 13A y B).

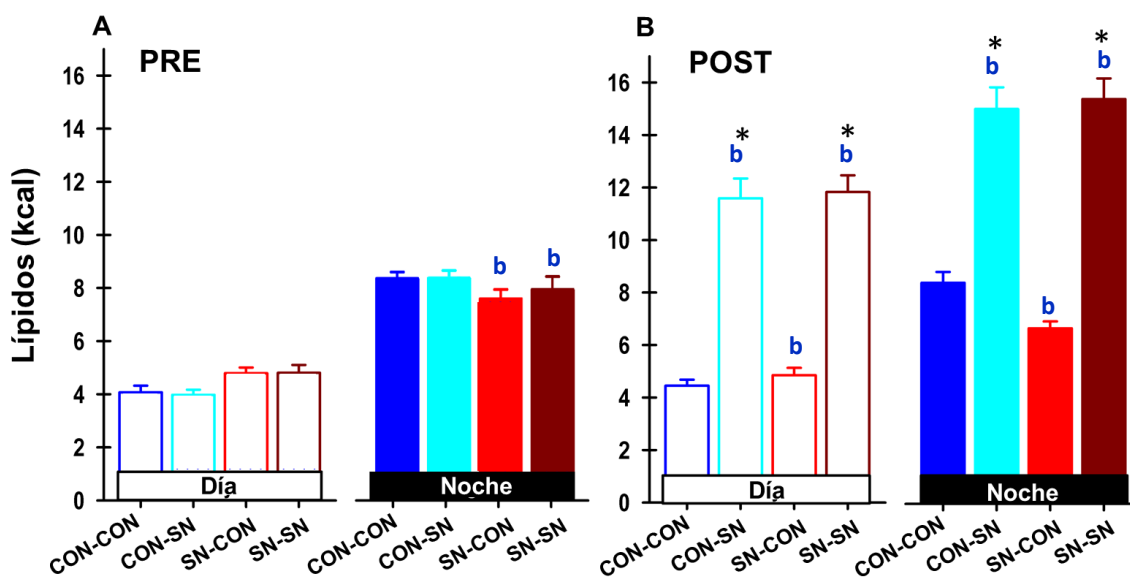
6.2.2 Ingesta de kilocalorías aportadas por los lípidos

En relación a las kilocalorías aportadas por los lípidos (kcal/lípidos), previo al reto alimenticio, el análisis de varianza mostró diferencias significativas en las fases del ciclo y la interacción (Grupo: $F_{(3,236)}=1.6$, $p=0.18$; Fase: $F_{(1,236)}=170.2$ $p<0.0001$; Interacción: $F_{(3,236)}=7.1$, $p<0.0001$). Durante la fase de luz, los animales de los cuatro grupos bajo estudio mostraron una tendencia similar de 4 a 4.8 de kcal/lípidos. En la fase oscura, los animales de todos los grupos presentaron un incremento significativo en el consumo de un 40% a un 104% de kcal/lípidos, en relación a la fase de luz. Es de notar que en esta misma fase, los animales del grupos SN-CON y SN-SN mostraron un decremento significativo del (22% y 19%, respectivamente) de kcal/lípidos, en comparación con el grupo CON-CON (Tabla 10; Figura 14A).

Tabla 10. Kilocalorías aportadas por los lípidos previo y posterior al reto alimenticio.

	Previo al reto			Posterior al reto		
	Fase de Luz	Fase oscura	<i>p</i>	Fase de Luz	Fase oscura	<i>P</i>
CON-CON	4.1±0.2	8.3±0.4*	<0.0001	4.7±0.2	8.5±0.4*	<0.0001
CON-SN	4.0±0.8	7.1±0.2*	<0.0001	11.6±0.8	15.0±0.8*	<0.0001
SN-CON	4.8±0.3	6.4±0.3*	<0.0001	4.8±0.3	6.7±0.3*	<0.0001
SN-SN	4.8±0.6	6.7±0.4*	<0.0001	11.8±0.3	15.4±0.8*	<0.0001

Los* muestra diferencias significativas de cada uno de los grupos durante la fase de luz vs a la fase oscura previo y posterior al reto alimenticio.



Posterior al reto alimenticio, el análisis de varianza mostró cambios significativos en las kcal/lípidos consumidas, entre los grupos bajo estudio y las fases del ciclo (Grupo: $F_{(3,490)}=105.5$, $p<0.0001$; Fase: $F_{(1,490)}=58.6$ $p<0.0001$; Interacción: $F_{(3,490)}=1.2$, $p=0.2$). En la fase de luz, los animales de los grupos CON-SN, SN-CON y SN-SN exhibieron un incremento significativo en la ingesta de kcal/lípidos entre el 148%-157%, en comparación al grupo CON-CON. Los animales de todos los grupos incrementaron significativamente el consumo de kcal/lípidos en la fase oscura de un 30% a un 82%, en relación a la fase de luz. En esta misma fase, los animales del grupo CON-SN y SN-SN mostraron un incremento significativo en la ingesta de kcal/lípidos del (77% y 81%, respectivamente), en comparación al grupo CON-CON. En contraste, el grupo SN-CON mostró decremento significativo en el consumo de kcal/lípidos en comparación al grupo CON-CON (Tabla 10; Figura 14B). En la fase oscura, los animales de los todos los grupos incrementaron el consumo (de kcal/lípidos en relación a la fase de luz. En esta misma fase, los animales de los grupos CON-SN y SN-SN mostraron un incremento significativo en el consumo de kcal/lípidos del 77% y 81% en comparación al grupo CON-CON. En contraste con los animales del grupo SN-CON mostraron un decremento significativo en el consumo de kcal/lípidos del 79% en comparación al grupo CON-CON (Tabla 9; Figura 13B).

En cuanto al efecto de la sobre-nutrición materna aunado con el reto alimenticio en relación al consumo de kcal/lípidos durante la fase de luz, la ANOVA de dos vías mostró un efecto significativo entre los grupos, el reto alimenticio y la interacción entre ambos factores (Grupo: $F_{(3,353)}=25.1$, $p<0.0001$; Reto: $F_{(1,353)}=85.3$, $p<0.0001$; Interacción: $F_{(3,353)}=26.4$, $p<0.0001$). Posterior al reto, los animales de los grupos CON-SN y SN-SN mostraron un incremento significativo en el consumo kcal/lípidos (190% y 146%, respectivamente) en relación a las consumidas previo al reto en esta misma fase del ciclo (Figura 14A y B). De igual forma en la fase oscura, la ANOVA mostró efectos significativos entre los grupos, el reto alimenticio y la interacción entre los factores (Grupo: $F_{(3,353)}=23.5$, $p<0.0001$; reto: $F_{(1,353)}=77.9$, $p<0.001$; interacción: $F_{(3,353)}=24.5$, $p<0.0001$). Los animales de los grupos CON-SN y SN-SN exhibieron un incremento significativo en la ingesta de kcal/lípidos (111% y 130%, respectivamente), en relación a los consumidos previo al reto en la misma fase del ciclo (Figura 14A y B).

6.3 Perfil Temporal Metabólico posterior al reto alimenticio

En relación a los niveles séricos de GLU, la ANOVA mostró diferencias significativas entre los grupos y el tiempo (Grupo: $F_{(3,104)}=12.2$, $p<0.0001$; ZT: $F_{(3,104)}=2.7$ $p=0.04$; Interacción: $F_{(9,140)}=1.2$, $p=0.3$). El análisis COSINOR arrojó datos significativos sobre la presencia de una fluctuación de 24 horas en el grupo CON-CON (Tabla 11), en donde los niveles séricos de GLU se incrementaron paulatinamente durante la fase de luz alcanzando su punto máximo (acrofase) en ZT 12. Posterior a este momento los niveles de GLU disminuyeron significativamente y el nadir se observó aproximadamente en ZT 24 (Figura 15). El grupo CON-SN mostró un avance del ritmo de GLU en donde la acrofase se presenta en ZT 08 y el nadir en ZT 18 por lo que el ritmo exhibió un avance de 4 horas y 11 minutos, en comparación al grupo CON-CON. En lo que respecta al grupo SN-CON mostró la acrofase del ritmo de este metabolito en ZT 06 y el nadir en ZT 18, por lo que el ritmo exhibió un avance de 6 horas 28 minutos respecto al grupo CON-CON. Es de notar que el grupo SN-SN el cual no exhibió variaciones dentro del rango circadiano (Tabla 11; Figura 15). En cuanto al efecto de la sobre-nutrición materna aunado a una segunda exposición a la dieta desbalanceada en el promedio diario de GLU, se observó un incremento significativo en los grupos CON-SN y SN-SN respecto al grupo CON-CON posterior al reto alimenticio.

Tabla 11. Resultados del análisis COSINOR en el perfil temporal glucémico y lipídico de conejos adultos Chinchilla, se muestran los valores del mesor, la acrofase (horas), el porcentaje de ritmicidad y el valor de la probabilidad para un ritmo de 24 horas. Los símbolos NS: valores no significativos, NR: no rítmico y $\Delta\phi$: adelantos (+) y retrasos de fase (-).

Variable	Grupo	Mesor	Acrofase (horas)	% de Ritmicidad	P	$\Delta\phi$ (horas)
GLU	CON-CON	127	12:31	72.18	0.03	+04:11
	CON-SN	149	08:20	60.56	0.007	
	SN-CON	157	06:03	74.04	<0.001	+06:28
	SN-SN	134	NR	20.78	NS	SC
COL	CON-CON	54	15:05	70.16	0.04	+04:03
	CON-SN	137	11:12	63.74	0.03	
	SN-CON	47	16:52	84.51	0.01	-01:47
	SN-SN	144	NR	65.05	NS	SC
LDL	CON-CON	9	14:39	85.7	0.05	+08:39
	CON-SN	52	06:00	73.93	0.033	
	SN-CON	7	15:03	92.22	0.003	-01:04
	SN-SN	41	NR	56.93	NS	SC
HDL	CON-CON	30	22:23	96.6	<0.001	+19:18
	CON-SN	28	03:45	82.57	0.01	
	SN-CON	30	12:25	94.89	0.02	+10:38
	SN-SN	29	NR	59.38	NS	SC
AGL	CON-CON	22	20:03	74.82	0.03	+19:16
	CON-SN	23	1:27	89.9	0.05	
	SN-CON	26	15:28	95.97	0.0008	+05:05
	SN-SN	24	NR	50.07	NS	SC
TAG	CON-CON	56	00:56	96.02	<0.001	-15:12
	CON-SN	55	15:28	98.1	0.001	
	SN-CON	59	16:27	74.1	0.07	-16:11
	SN-SN	55	NR	60.00	NS	SC

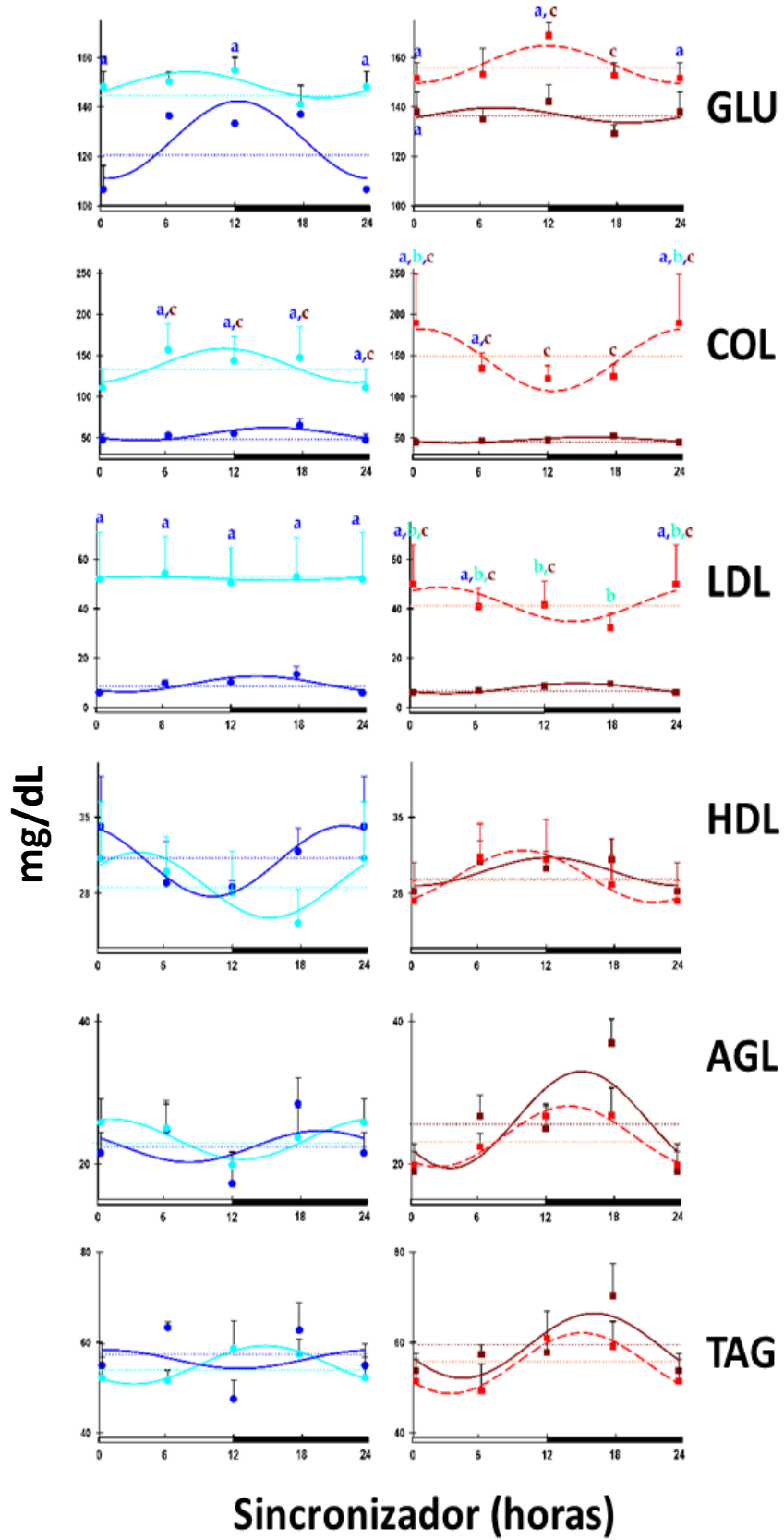


Figura 15. Perfil Temporal Metabólico de los niveles séricos de Glucosa (GLU), Colesterol (COL), Lipoproteínas de Baja Densidad (LDL), Lipoproteínas de alta densidad (HDL), Ácidos grasos libres (AGL) y Triglicéridos (TAG) en conejos Chinchilla en la edad adulta durante el día y la noche posterior al reto alimenticio. Los círculos y curvas azul marino representan a los animales de madres que consumieron una dieta estándar durante la gestación y postnatalmente consumieron alimento estándar (CON-CON), círculos y curvas azul cielo representan a los animales nacidos de madres que consumieron una dieta estándar durante la gestación y postnatalmente consumieron la dieta desbalanceada (CON-SN), los cuadros y curvas rojo oscuro representan a los animales obtenidos de madres que consumieron una dieta desbalanceada durante la gestación y postnatalmente consumieron una dieta estándar (SN-CON) y los cuadros rojos representan a los animales obtenidos de madres que consumieron una dieta desbalanceada durante la gestación y postnatalmente tuvieron una segunda exposición a la dieta desbalanceada (SN-SN). Las letras representan diferencias significativas entre los grupos vs al grupo CON-CON ($p < 0.05$). Las líneas punteadas representan el mesor. Las curvas representan el ajuste a un análisis COSINOR. Las curvas discontinuas representan pérdida de la ritmicidad de 24 horas. Los valores están representados como medias \pm E.E.

En relación a los niveles séricos de COL, la ANOVA mostró diferencias significativas entre los grupos de estudio (Grupo: $F_{(3,84)} = 21.8$; $p < 0.001$; ZT: $F_{(3,84)} = 0.06$; $p = 0.9$; Interacción: $F_{(9,84)} = 0.98$, $p = 0.4$). El análisis COSINOR arrojó datos significativos sobre la presencia de una fluctuación de 24 horas (Tabla 11), en donde los niveles séricos de COL del grupo CON-CON la concentración más baja se observó al inicio de la fase de luz en ZT 00; posterior se incrementan durante la fase oscura alcanzando su acrofase en ZT 15; posterior a este momento los niveles de este metabolito disminuyeron exhibiendo su nadir alrededor de ZT 24 (Figura 15). El grupo CON-SN la acrofase del ritmo ocurrió en ZT 11 y el nadir en ZT 24, por lo que el ritmo exhibió un avance de 4 horas y 11 minutos en comparación al grupo CON-CON. En lo que respecta al grupo SN-CON, la acrofase del COL se observó en ZT 16 y el nadir en ZT 24, por lo que el ritmo exhibió un retraso de 1 hora 47 minutos respecto al grupo CON-CON. Es de notar que el grupo SN-SN no exhibió variaciones dentro del rango circadiano (Tabla 11; Figura 15). En cuanto al efecto de la sobre-nutrición materna aunado a una segunda exposición a la dieta desbalanceada produjo un incremento significativo en el promedio diario de COL en los grupos CON-SN y SN-SN respecto al grupo CON-CON, posterior al reto alimenticio.

Respecto a los niveles séricos de LDL, la ANOVA mostró diferencias significativas entre los grupos (Grupo: $F_{(3,83)}=15.67$; $p<0.001$; ZT: $F_{(3,83)}=0.01$; $p=0.99$; Interacción: $F_{(9,83)}=0.02$, $p=0.99$). El análisis COSINOR arrojó datos significativos sobre la presencia de una fluctuación de 24 horas en el grupo CON-CON (Tabla 11), en donde los niveles séricos de LDL son bajos durante la fase de luz e incrementan al inicio de la fase oscura alcanzando su acrofase en ZT 14; posterior a este momento se observó el nadir alrededor de ZT 24 (Figura 15). El grupo CON-SN mostró la acrofase de este metabolito en ZT 06 y el nadir en ZT 24, por lo que el ritmo exhibió un adelanto de 8 horas y 39 minutos en comparación al grupo CON-CON. En lo que respecta al grupo SN-CON, la acrofase se observó en ZT 15 y el nadir en ZT 00, por lo que el ritmo exhibió un retraso de 1 hora 04 minutos respecto al grupo CON-CON. Es de notar que el grupo SN-SN no exhibió ritmicidad dentro del rango circadiano (Tabla 11; Figura 15). En cuanto al efecto de la sobre-nutrición materna aunado a una segunda exposición a la dieta desbalanceada produjo un incremento significativo en el promedio de LDL de los grupos CON-SN y SN-SN, respecto al grupo CON-CON.

Respecto a los niveles séricos de HDL, la ANOVA no mostró diferencias significativas entre los grupos, el tiempo y la interacción entre ambos factores (Grupo: $F_{(3,86)}=0.25$; $p=0.8$; ZT: $F_{(3,86)}=0.08$; $p=0.9$; Interacción: $F_{(9,86)}=0.48$, $p=0.8$). El análisis COSINOR arrojó datos significativos sobre la presencia de una fluctuación de 24 horas en el grupo CON-CON (Tabla 11), en donde los niveles de HDL disminuyen paulatinamente durante la fase de luz cuyo nadir se observó en ZT 11; posterior a este momento los niveles de HDL incrementan paulatinamente alcanzando su acrofase en ZT 22 (Figura 15). El grupo CON-SN mostró la acrofase de este metabolito en ZT 03 y el nadir en ZT 15 por lo que el ritmo exhibió un avance de 19 horas y 18 minutos en comparación al grupo CON-CON. En lo que respecta al grupo SN-CON, la acrofase se observó en ZT 12 y el nadir en ZT 24 por lo que el ritmo exhibió un avance de 10 horas 38 minutos respecto al grupo CON-CON. Es de notar que el grupo SN-SN no exhibió ritmicidad dentro del rango circadiano (Tabla 11; Figura 15). En cuanto al efecto de la sobre-nutrición materna aunado a una segunda exposición a la dieta desbalanceada, en el promedio diario de HDL no se observaron diferencias significativas en los cuatro grupos bajo estudio, posterior al reto alimenticio.

Respecto a los niveles séricos de AGL, la ANOVA mostró diferencias significativas en el tiempo (Grupo: $F_{(3,90)}= 1.01$; $p=0.3$; ZT: $F_{(3,90)}=3.57$; $p=0.01$; Interacción: $F_{(9,90)}= 1.59$, $p=0.1$). El análisis COSINOR arrojó datos significativos sobre la presencia de una fluctuación de 24 horas en el grupo CON-CON (Tabla 11), en donde los niveles de AGL son bajos durante la fase de luz y se van incrementando alcanzando su acrofase en ZT 20; posterior a este momento sus niveles disminuyen mostrando su nadir en ZT 07 (Figura 15). El grupo CON-SN la acrofase del ritmo de AGL se observó en ZT 01 y el nadir en ZT 12, por lo que el ritmo exhibió un avance de 19 horas y 16 minutos, mostrándose en completa antifase en relación al grupo CON-CON. En lo que respecta al grupo SN-CON la acrofase de los AGL se observó en ZT 15 y el nadir en ZT 04, por lo que el ritmo exhibió un avance de 5 horas 28 minutos respecto al grupo CON-CON. Es de notar que el grupo SN-SN no exhibió variaciones dentro del rango circadiano (Tabla 11; Figura 15). En cuanto al efecto de la sobre-nutrición materna aunado a una segunda exposición a la dieta desbalanceada, en el promedio diario de AGL no se observaron diferencias significativas en los cuatro grupos bajo estudio, posterior al reto alimenticio.

Respecto a los niveles séricos de TAG, la ANOVA no mostró diferencias significativas entre los grupos, el tiempo y la interacción entre ambos factores (Grupo: $F_{(3,90)}= 0.77$; $p=0.5$; ZT: $F_{(3,90)}= 1.99$; $p=0.1$; Interacción: $F_{(9,90)}= 0.85$, $p=0.5$). El análisis COSINOR arrojó datos significativos sobre la presencia de una fluctuación de 24 horas en el grupo CON-CON (Tabla 11), en donde los niveles de TAG van disminuyendo en el transcurso del día y justo en la transición al ciclo de oscuridad incrementan alcanzando la acrofase al inicio de la fase de luz en ZT 00; posterior a este momento los niveles de este metabolito disminuyen exhibiendo su nadir alrededor de ZT 12 (Figura 15). El grupo CON-SN la acrofase del ritmo se observó en ZT 15 y el nadir en ZT 24 por lo que el ritmo exhibió un retraso de 15 horas y 28 minutos, mostrándose en completa antifase en relación al grupo CON-CON. En lo que respecta al grupo SN-CON, la acrofase de TAG se observó en ZT 16 y el nadir en ZT 04, por lo que el ritmo exhibió un retraso de 16 horas 27 minutos, mostrándose en completa antifase respecto al grupo CON-CON. Es de notar que el grupo SN-SN no exhibió ritmicidad dentro del rango circadiano (Tabla 11; Figura 15). En cuanto al efecto de la sobre-nutrición materna aunado a una segunda exposición a la dieta desbalanceada, en el promedio diario de TAG no

se observaron diferencias significativas en los cuatro grupos bajo estudio, posterior al reto alimenticio.

6.4 Marcadores bioquímicos en el hígado

En cuanto al efecto de la sobre-nutrición materna aunado con el reto alimenticio sobre la función hepática, no encontramos diferencias significativas entre los cuatro grupos bajo estudio en los niveles séricos de los marcadores de daño hepático (Tabla 12).

Tabla 12. Parámetros bioquímicos de daño hepático en suero.

	CON-CON	CON-SN	SN-CON	SN-SN	<i>P</i>
<i>Marcadores de daño hepático</i>					
GGT	5±0	5.5±1	4.5±2	6.3±0.8	0.7
BIL TOTAL	6.4±0.7	7.2±0.4	8.6±0.5	7.2±0.3	0.1
BIL CONG	0.9±0.1	1±2	1.1±0.2	1.5±0.6	0.7
AST	26.6±8.3	20±3.4	40.8±11.6	15±1.7	0.1
ALT	38.3±8.8	38.3±4.4	32.5±8.0	30±2.6	0.6
ALBUMINA	46.6±7.2	50.8±1.5	50.8±3	47.7±2.0	0.7

6.4.1 Análisis histológico en el hígado

En cuanto al efecto de la sobre-nutrición materna aunado al reto alimenticio sobre la estructura histológica hepática, se observaron cambios significativos en la presencia de macrovesículas, en las tres zonas del acino hepático, (zona 1: Grupo: $F_{(3,45)}=3.9$; $p=0.014$, zona 2: Grupo: $F_{(3,45)}=7.1$; $p=0.0005$ y en la zona 3: Grupo: $F_{(3,45)}=3.6$; $p=0.02$). El grupo SN-

SN presentó un incremento significativo de macrovesículas en las tres zonas acinares en comparación con el grupo CON-CON (Figura 16 A y B).

En cuanto a la presencia de microvesículas, el análisis de varianza mostró cambios significativos en las tres zonas del acino hepático, (zona 1: Grupo: $F_{(3,45)}=4.2$; $p=0.009$, zona 2: Grupo: $F_{(3,45)}=9.1$; $p<0.0001$ y en la zona 3: Grupo: $F_{(3,45)}=11.9$; $p<0.0001$). En donde el grupo CON-SN presentó un incremento significativo de microvesículas en la zona 1 acinar en comparación al CON-CON. El grupo SN-SN exhibió un incremento significativo en la presencia de microvesículas en las tres zonas acinares respecto al CON-CON (Figura 16 A y B).

En cuanto a la presencia de fibras de colágena, el análisis de varianza no mostró diferencias significativas entre los grupos, en las tres zonas del acino hepático (Zona1: Grupo: $F_{(3,45)}=2.4$; $p=0.8$, Zona 2: Grupo: $F_{(3,45)}=1.7$; $p=0.9$ y Zona 3: Grupo: $F_{(3,45)}=1.6$; $p=0.18$) (Figura 16 A y B).

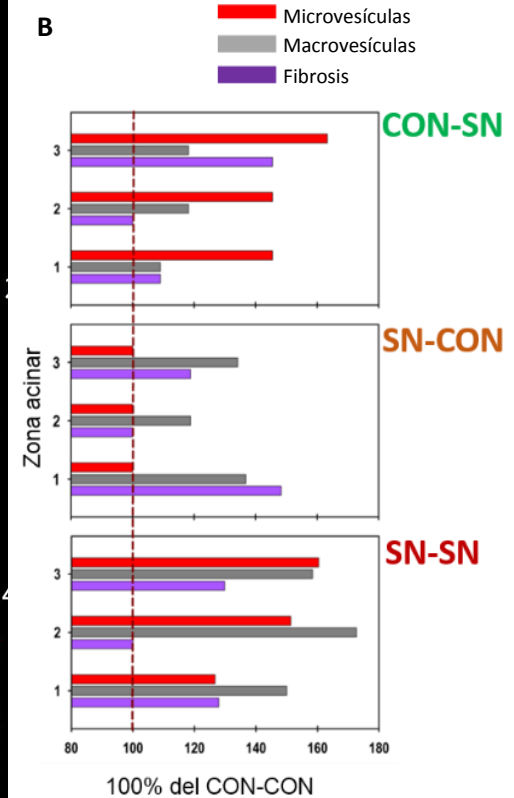
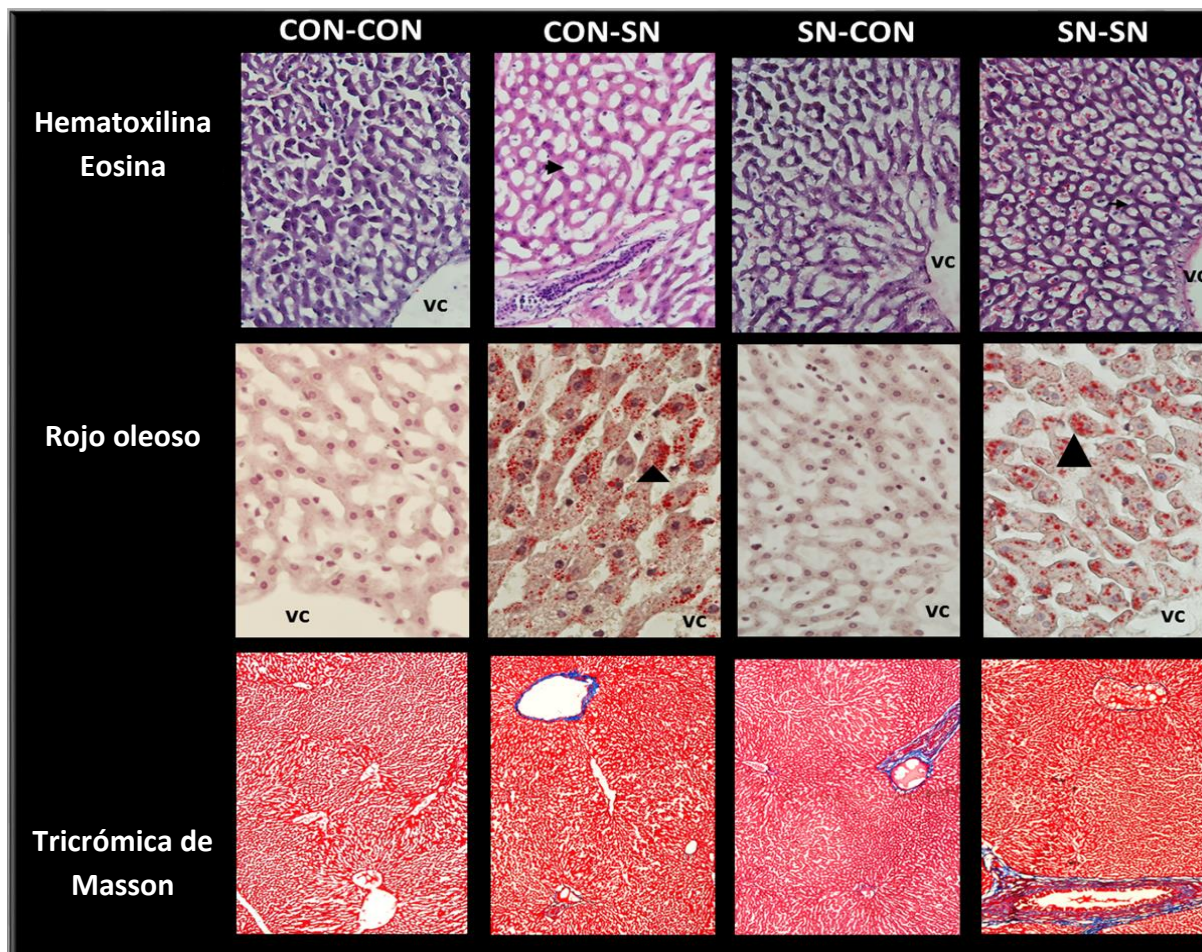


Figura 16. Imágenes representativas de cortes histológicos de hígado (7µm) de conejos Chinchilla en edad adulta posterior al reto alimenticio. A) La columna superior muestra cortes histológicos teñidos con Hematoxilina y Eosina (200x), la columna 2 representa cortes histológicos teñidos con Rojo Oleoso (200x) y la columna inferior representa cortes histológicos teñidos con Tricrómica de Masson (40x) para los grupos CON-CON (animales de madres que consumieron una dieta estándar durante la gestación y postnatalmente consumieron alimento estándar), CON-SN (animales nacidos de madres que consumieron una dieta estándar durante la gestación y postnatalmente consumieron la dieta desbalanceada), SN-CON (animales obtenidos de madres que consumieron una dieta desbalanceada durante la gestación y postnatalmente consumieron una dieta estándar) y el grupo SN-SN (animales obtenidos de madres que consumieron una dieta desbalanceada durante la gestación y postnatalmente tuvieron una segunda exposición a la dieta desbalanceada). Las flechas indican la presencia de macrovesículas, los triángulos negros señalan la presencia de microvesículas y en color azul la presencia de colágena. Para mayor información consultar el Anexo G: Células hepáticas. B) Gráfica del porcentaje de microvesículas (barras: color rojo), macrovesículas (barras: grises) y fibrosis (barras moradas) en cada grupo de estudio, donde 100% corresponde al grupo CON-CON representado por la línea punteada.

6.5 Expresión de genes reloj en el hipotálamo e hígado

En cuanto al efecto de la sobre-nutrición materna aunado al reto alimenticio sobre la expresión de los genes *Clock* y *Bmal1* en el hipotálamo, la ANOVA no mostró diferencias significativas entre los cuatro grupos bajo estudio, las fase del ciclo y la interacción entre los factores (*Clock*: Grupo: $F_{(3,21)}=1.7$, $p=0.19$; Reto: $F_{(1,21)}=0.8$, $p=0.37$; Interacción: $F_{(3,21)}=5.5$, $p=0.5$) y (*Bmal1*: Grupo: $F_{(3,20)}=1.3$, $p=0.2$; ZT: $F_{(1,20)}=2.7$, $p=0.1$; Interacción: $F_{(3,20)}=2.4$, $p=0.1$) (Tabla 13; Figura 17).

En lo que respecta a la expresión del gen *Per1* en el hipotálamo el análisis de varianza mostró cambios significativos asociados a la fase del ciclo (Grupo: $F_{(3,19)}=1.6$, $p=0.2$; ZT: $F_{(1,19)}=4.3$, $p=0.05$; Interacción: $F_{(3,19)}=1.0$, $p=0.4$). En cuanto a la expresión del gen *Per1* en el grupo CON-CON, no mostró variaciones significativa en los niveles de expresión de este gen en ambas fases del ciclo (Tabla 13; Figura 17). Durante la fase de luz, los cuatro grupos bajo estudio mostraron niveles de expresión similares. Mientras que en la fase oscura todos los grupos mostraron una tendencia similar. Es de notar que en esta misma fase, el grupo SN-CON mostró un decremento significativo en los niveles de expresión, en relación a la fase de luz (Tabla 13; Figura 17).

En relación a la expresión del gen *Cry1* en el hipotálamo, la ANOVA mostró efectos significativos asociados a la fase del ciclo (Grupo: $F_{(3,21)}=1.2$, $p=0.3$; ZT: $F_{(1,21)}=6.6$, $p=0.01$; Interacción: $F_{(3,21)}=1.8$, $p=0.1$). En el grupo CON-CON la expresión del gen *Cry1* fue similar en ambas fases del ciclo (Figura 17). Durante la fase de luz, los grupos CON-SN y SN-CON mostraron niveles de expresión similares. Contrario a lo observado en el grupo SN-SN el cual mostró un incremento significativo en la expresión de *Cry1* (Tabla 13; Figura 17). En la fase oscura, todos los grupos mostraron una tendencia similar en los niveles de expresión en comparación al grupo CON-CON. Es de notar que en esta misma fase, el grupo CON-SN mostró un incremento significativo en los niveles de expresión de *Cry1* en relación a la fase de luz (Tabla 13; Figura 17).

Tabla 13. Expresión de los genes reloj en el hipotálamo e hígado.

HIPOTÁLAMO								
Grupo	<i>Clock</i>		<i>Bmal1</i>		<i>Per1</i>		<i>Cry1</i>	
	ZT 00	ZT 12	ZT 00	ZT 12	ZT 00	ZT 12	ZT 00	ZT 12
CON-CON	1.0±0	0.9±0.3	1.0±0	1.4±0.3	1.0±0	0.4±0.2	1.0±0	1.1±0.3
CON-SN	0.7±0.3	2.8±0.5	1±0.3	1.3±0.2	0.3±0.1	0.3±0.2	0.7±0.1	1.8±0.5 *
SN-CON	1.3±0.5	0.8±0.4	0.6±0.2	1.9±0.8	1.3±1	0.2±0.2 *	0.7±0.1	1±0.2
SN-SN	1.5±0.1	1.0±0.1	0.9±0.2	0.6±0.1	0.3±0.2	0.1±0.02	0.8±0.1	1±0.2

HÍGADO								
Grupo	<i>Clock</i>		<i>Bmal1</i>		<i>Per1</i>		<i>Cry1</i>	
	ZT 00	ZT 12	ZT 00	ZT 12	ZT 00	ZT 12	ZT 00	ZT 12
CON-CON	1.0±0	0.5±0.1	1.0±0	0.4±0.1*	1.0±0	0.4±0	1.0±0	2.8±0.4*
CON-SN	2.1±0.1 ^a	1.5±0.2 ^a	0.8±0.1 ^a	0.5±0.2	2.1±0.2 ^a	0.5±0.1	1.2±0.1	2.5±0.1*
SN-CON	1.2±0.6	0.6±0.1*	1.2±0.1	0.4±0.1*	2.4±0.5 ^a	1.9±0.4 ^a	1.8±0.3	1.8±0.3
SN-SN	2.3±0.3^a	0.6±0.1*	0.4±0.2 ^a	0.3±0.1	0.4±0.1^a	2±0.2^{a*}	2.8±0.5 ^a	2.0±0.3

Las letras representan diferencias significativas $p < 0.005$ vs al grupo CON-CON en la misma fase.

Los * representan variaciones significativas sobre los niveles de expresión de los genes a lo largo del día ($p < 0.001$).

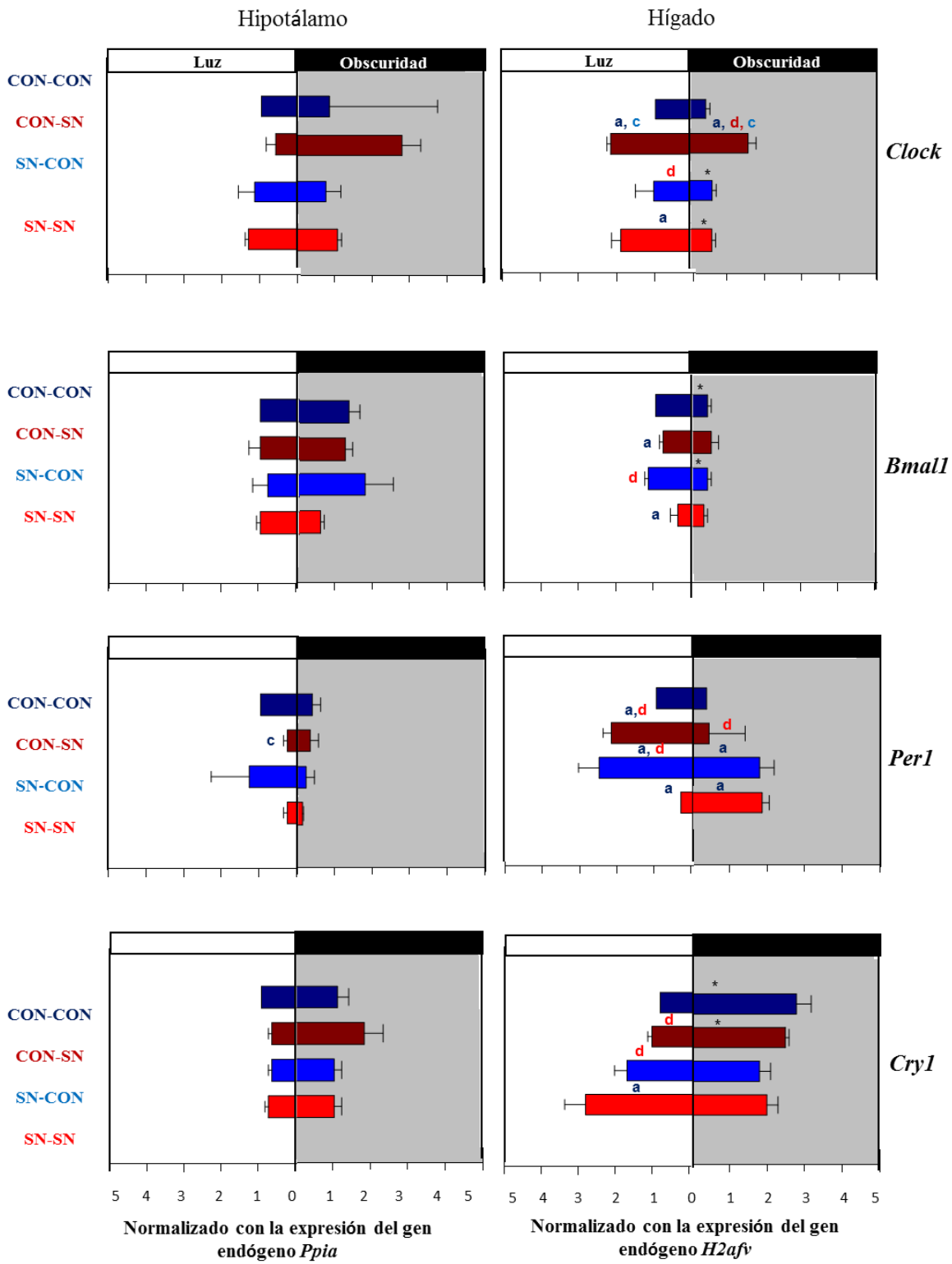


Figura 17. Expresión de los genes reloj (*Clock*, *Bmal*, *Per1* y *Cry1*) en hipotálamo e hígado en conejos Chinchilla en la edad adulta durante el día y la noche posterior al reto alimenticio. La expresión de los genes reloj en el hipotálamo fueron normalizados con el gen *Ppia* y en el hígado fueron normalizados con el gen *H2afv*. En la fase de luz las barras azules marino representan a los animales de madres que consumieron una dieta estándar durante la gestación y postnatalmente consumieron alimento estándar (CON-CON), las barras rojo oscuro representan a los animales nacidos de madres que consumieron una dieta estándar durante la gestación y postnatalmente consumieron la dieta desbalanceada (CON-SN), las barras color azul a los animales obtenidos de madres que consumieron una dieta desbalanceada durante la gestación y postnatalmente consumieron una dieta estándar (SN-CON), y las barras color rojo a los animales obtenidos de madres que consumieron una dieta desbalanceada durante la gestación y postnatalmente tuvieron una segunda exposición a la dieta desbalanceada (SN-SN). Los experimentos se realizaron por triplicado y fueron analizados por una ANOVA de dos vías y una post hoc de Fisher. Las letras representan diferencias significativas de los grupos vs al grupo CON-CON ($p < 0.05$). Los valores están representados como medias \pm E.E.

En cuanto al efecto de la sobre-nutrición materna aunado al reto alimenticio sobre la expresión del gen *Clock* en el hígado, la ANOVA mostró diferencias significativas entre los grupos, las fases del ciclo y la interacción entre ambos factores (Grupo: $F_{(3,22)}=13.1$, $p < 0.0001$; ZT: $F_{(1,22)}=39.6$, $p < 0.0001$; Interacción: $F_{(3,22)}=5.5$, $p=0.005$). La expresión del gen *Clock* en el grupo CON-CON no mostro variaciones en los niveles de expresión en ambas fases del ciclo (Figura 17). En la fase de luz, los grupos CON-SN y el SN-SN mostraron un incremento significativo en la expresión de este gen en relación al grupo CON-CON. Es de notar que en esta misma fase los grupos SN-CON y SN-SN mostraron variaciones en la expresión de *Clock* a lo largo del día, en donde la expresión de este gen disminuyó en esta fase del ciclo. Mientras que en la fase oscura, el grupo CON-SN mostró un incremento significativo en su expresión en relación con el grupo CON-CON (Tabla 13; Figura 17).

Respecto a la expresión de gen *Bmal1* en el hígado, la ANOVA mostró efectos significativos entre los cuatro grupos bajo estudio y las fases del ciclo (Grupo: $F_{(3,21)}=3.2$, $p=0.04$; ZT: $F_{(1,21)}=26.6$, $p < 0.0001$; Interacción: $F_{(3,21)}=2.3$, $p=0.10$). Durante la fase de luz, la expresión del gen *Bmal1* en el grupo CON-CON mostró un incremento significativo y en la fase oscura la expresión de este gen disminuyó (Figura 17). Durante la fase de luz, el grupo CON-SN y SN-SN mostraron una disminución significativo en la expresión de este gen, en relación al grupo CON-CON. En la fase oscura, todos los grupos bajo estudio mostraron una tendencia similar en los niveles de expresión de *Bmal1* (Tabla 13; Figura 17).

En cuanto a la expresión del gen *Per1* el análisis de varianza mostró cambios significativos entre los grupos y la interacción (Grupo: $F_{(3,20)}=7.8$, $p=0.001$; ZT: $F_{(1,20)}=1.8$, $p=0.19$; Interacción: $F_{(3,20)}=9.5$, $p<0.0001$). En el grupo CON-CON, los niveles de expresión de este gen no mostraron variaciones en ambas fases del ciclo (Figura 17). Durante la fase de luz, los grupos CON-SN y SN-CON mostraron un incremento significativo en la expresión de este gen, en relación al grupo CON-CON. En contraste, con el grupo SN-SN presentó un decremento significativo en la expresión de este gen, en relación al grupo CON-CON (Tabla 13; Figura 17).

En lo que respecta al gen *Cry1* la ANOVA mostró efectos significativos entre los grupos, las fases del ciclo y la interacción entre ambos factores (Grupo: $F_{(3,22)}=1.5$, $p=0.23$; ZT: $F_{(1,22)}=1.80$, $p=0.01$; Interacción: $F_{(3,22)}=6.41$, $p=0.002$). Durante la fase de luz, en el grupo CON-CON, la expresión del gen *Cry1* mostro un decremento significativo y en la fase oscura incremento significativamente su expresión (Figura 17). Durante la fase de luz, el grupo SN-SN presentó un incremento significativo en los niveles de expresión de este gen, en comparación al CON-CON. En la fase oscura todos los grupos bajo estudio mostraron niveles de expresión similares (Tabla 13; Figura 17).

VII. DISCUSIÓN

Nuestros resultados demuestran que la sobre-nutrición materna por el consumo de una dieta alta en grasas y carbohidratos, previo y durante la gestación produce alteraciones en la regulación cronostática y metabólica de la descendencia en la edad adulta. Estas alteraciones están asociadas a cambios en la expresión de la maquinaria molecular del reloj circadiano en el hígado, los cuales se ven exacerbadas por una segunda exposición a la dieta desbalanceada.

La descendencia de hembras sobre-nutridas mostraron una significativa disminución del consumo de alimento durante la fase activa sin cambios en el peso corporal. Contrario a lo observado en roedores, en donde madres expuestas a una dieta desequilibrada durante la gestación y la lactancia mostraron cambios en los patrones de alimentación (hiperfagia), en la actividad locomotora y desarrollo de obesidad en la descendencia (Ong y cols. 2012, Englund-Ögge y cols. 2014). En este estudio a pesar de que los animales mostraron bajo peso al nacer y un crecimiento compensatorio durante el desarrollo postnatal temprano; en la edad adulta desarrollaron hiporexia. Una de las consecuencias de la malnutrición materna es el bajo peso al nacimiento, lo cual se relaciona con incrementos en las concentraciones de serotonina (5-HT) en el hipotálamo, en donde la cinética de la unión del L-Trp a la albúmina se modifica durante el desarrollo hasta la edad adulta (Hernández y cols. 2015). La serotonina influye en la ingesta alimentaria por mecanismos neurobioquímicos y, a su vez, la ingesta alimentaria influye en el sistema serotoninérgico, alterando la disponibilidad de triptófano y, en consecuencia, el grado de síntesis de la serotonina. El neurotransmisor actúa sobre los núcleos de control del apetito, disminuyendo el hambre y la ingesta de alimentos (Rodríguez y Gutiérrez 2018). Posiblemente las modificaciones estructurales del complejo proteico de la T5-H como los mecanismos en la aceleración de la síntesis del neurotransmisor en el cerebro podrían explicar este comportamiento en estos animales.

Diversos trabajos han reportado la influencia del estado nutricional materno y el desarrollo de enfermedades metabólicas en la edad adulta de la descendencia (Desai y cols. 2014, Vicker y cols. 2000). Sin embargo, ninguno de estos estudios ha caracterizado el efecto de la sobre-nutrición materna sobre el perfil temporal de los diferentes analitos en la descendencia de conejos en la edad adulta. Por lo tanto, en el presente estudio los niveles séricos de GLU,

COL, HDL, LDL, AGL y TAG en el grupo testigo (CON-CON) exhiben ritmicidad circadiana. En contraste con los animales obtenidos de madres sobre-nutridas y recibieron una dieta estándar postnatalmente, mostraron marcados cambios de fase en el patrón rítmico de todos los metabolitos bajo estudio. Lo cual es un claro indicador que el control de fase de los ritmos puede verse afectada por la programación metabólica *in útero*. Los cambios más conspicuos fueron observados en los sujetos obtenidos de hembras sobre-nutridas y que postnatalmente recibieron la misma dieta que la madre (grupo SN-SN) los cuales mostraron pérdida de la ritmicidad circadiana en todas las variables, metabólicas analizadas, lo cual guarda una estrecha relación con los cambios observados a nivel molecular.

En lo relativo a la expresión de los genes reloj en el hipotálamo, fue de llamar la atención que los animales del grupo CON-CON, no presentaron variaciones a lo largo del día en la expresión de los genes *Clock*, *Bmal1*, *Per1* y *Cry1*. En cuanto a la expresión del gen *Clock* fue similar a lo reportado en otros trabajos (Caldelas y cols. 2007, Cunningham y cols. 2016). Contrario a lo reportado en otros estudios, en donde patrón temporal del gen *Bmal1* es baja durante el día y alta durante la noche y los ritmos de expresión de los genes *Per1* y *Cry1* se encuentra en antifase en relación a *Bmal1* (Bonaconsa y cols. 2014, Koshaka y cols. 2007, Caldelas y cols. 2007). Estas diferencias de nuestro estudio con otros trabajos, posiblemente se deben a las muestras obtenidas, ya que solo muestreamos dos puntos temporales (ZT 00 y ZT 12) del ciclo y las fases de expresión de estos genes evidentemente no corresponden a la acrofase y al nadir.

En cuanto a la sobre-nutrición materna no tuvo un impacto en la expresión de los genes reloj en el hipotálamo de la descendencia de conejos adultos, similar a lo reportado en otros estudios (Orozco-Solís y cols. 2011). Lo que sugiere que los componentes de la maquinaria molecular del reloj en el marcapasos central no son susceptible a ser alterado por el estado nutricional materno.

Respecto a la expresión de los genes reloj en el hígado de los animales del grupo CON-CON, se observó que el gen *Bmal1* incremento durante el día y una disminuyó en la fase oscura, mostrándose en antifase con relación a los genes *Cry1* y *Per1*. Estos resultados son similares a los reportados en otros estudios (Cunningham y cols. 2016, Rivas-Latre y cols. 2018). Encontramos que el consumo de una dieta hiperglucémica e hiperlipídica previo y durante la

gestación induce cambios en la expresión de los genes *Clock*, *Bmal1* y *Per1* en el hígado de la descendencia. Similar a lo reportado por Orozco-Solís y colaboradores (2011), en donde el consumo de dietas bajas en proteína durante la gestación produjo cambios en la fase de expresión de *Per1* y *Clock* en el hígado de la descendencia. Otros estudios han demostrado que el consumo de una dieta alta en grasas durante la gestación repercute en la expresión de genes reloj en el hígado de la descendencia (Sutter y cols. 2011, Borengasser y cols. 2014 y Bruce y cols. 2016) Además, se ha asociado a la obesidad materna con cambios en la metilación del ADN de los genes del reloj *Clock*, *Bmal1* y *Per2* (Ramos-López y cols. 2018, Mansego y cols. 2017, Martínez y cols. 2014). Nuestros resultados sugieren que los cambios en la expresión de los genes reloj en el hígado de la descendencia podrían deberse a cambios epigenéticos provocados por la sobre-nutrición materna.

El sistema circadiano regula procesos clave relacionados con la homeostasis energética y el metabolismo, la ingesta de alimentos la adecuada utilización de glucosa y lípidos a lo largo del día (Engin 2017). Por lo tanto, las alteraciones del funcionamiento de la maquinaria molecular del reloj circadiano en un oscilador periférico (hígado) pueden conducir a cambios en la temporalidad de las variables metabólicas donde los mecanismos epigenéticos pueden estar involucrados (Samblas cols. 2018; Samblas et cols. 2016; Milagro cols. 2012).

En cuanto al consumo directo de una dieta alta en grasas y carbohidratos en la edad adulta, indujo la disrupción en el patrón de alimentación diurno debido al incremento en la cantidad de alimento consumido (mayor ingesta calórica) durante la fase de reposo de los animales. Se han reportado hallazgos similares en roedores donde el consumo de dietas altas en grasa produce cambios en los patrones conductuales de alimentación (Kohsaka y cols. 2007, Diaz-Urbina y cols. 2018). Esto se ha asociado con alteraciones en la regulación del apetito (hipotálamo) y homeostasis energética (Desai y cols. 2016, Cleal y cols. 2019). En condiciones normales, la hormona de la leptina secretada de los adipocitos regula directamente los niveles de los neuropéptidos orexigénos, involucrados con un mayor consumo de alimento, como son el neuropéptido Y (NPY) y la proteína relacionada con agouti (AgRP), de la misma manera regula los anorexígenos como la proopiomelanocortina (POMC) y el péptido regulador de la transcripción de la cocaína y anfetamina (CART) para inhibir la ingesta de alimentos e incrementar el gasto de energía mediante receptores

específicos para la leptina (OB-Rb). Roedores alimentados con una dieta alta en grasas exhibieron una disminución en los niveles de expresión de AGRP y NPY y un incremento en el ARNm de POMC y CART (Koshaka y cols. 2007, Cleal y cols. 2019). Thaler y colaboradores (2012) mostraron una disminución en el número de neurona POMC en el hipotálamo por el consumo de una dieta alta en grasas. Dadas estas evidencias se podría explicar este cambio en el patrón de alimentación en estos animales.

De forma paralela a los cambios en el patrón de alimentación, estos animales desarrollaron hiperglucemia, colesterolemia y altos niveles de lipoproteínas de baja densidad, además de cambios en la fase de los ritmos de GLU, COL, LDL, HDL, AGL y TAG. Es importante destacar, que este es el primer estudio del efecto del consumo directo de una dieta alta en grasas y carbohidratos sobre los cambios en el perfil temporal de las variables metabólicas en conejos adultos. Hallazgos similares han sido reportados en otros modelos animales, en ratones el consumo de una dieta alta en grasas provocó cambios en la acrofase del ritmo de TAG y AGL (Oshi y cols. 2006).

Los cambios en la temporalidad de estas variables metabólicas han sido asociadas a alteraciones en la maquinaria molecular del reloj circadiano, en este trabajo observamos que la expresión de los genes reloj en el hígado es susceptible a ser alterada por el consumo directo de una dieta desbalanceada, la cual altera la fase de expresión del gen *Cry1* en el hígado de conejos adultos, sin observarse cambios en la expresión de los genes reloj en el hipotálamo. Estudios en modelos animales con mutaciones en el gen *Clock* desarrollan sobrepeso y resistencia a la insulina (Turek y cols. 2005), mutaciones en el gen *Bmal1* se asocia con alteraciones en la adipogénesis (Shimba cols. 2005 y Wang cols. 2006). Por lo tanto alteraciones en la maquinaria del reloj molecular se han asociado con el desarrollo de alteraciones metabólicas.

Nuestros datos coinciden con las observaciones realizadas por Sherman y colaboradores (2012), en donde el consumo de una dieta alta en grasas en ratones provoca cambios en el comportamiento alimenticio y alteraciones metabólicas las cuales se correlacionan con cambios en la expresión de genes reloj en el hígado y tejido adiposo (Koshaka y cols. 2006, Barnea y cols. 2009, 2010). El hígado participa en la regulación temporal de carbohidratos y en el metabolismo de lípidos en coordinación con otros osciladores periféricos, en

consecuencia el NSQ controla los ritmos de alimentación/ayuno con la finalidad de mantener los niveles fisiológicos de glucosa y lípidos en sangre (Kalsbeek y cols. 2014). Se ha demostrado que los genes reloj en el hígado participan en la coordinación de la gluconeogénesis inducida por el glucagón regulando así la concentración de AMPc (Zhang y cols. 2016). Se ha mostrado que la interacción de *Cry1* con la subunidad reguladora del receptor de glucagón inhibe la acumulación de cAMP hepático durante la fase activa produce la activación del factor de transcripción CREB. Además, *Bmal1* regula la expresión del gen *Pgc1 α* , que es un co-activador en la transcripción gluconeogénica. De esta manera los genes reloj controlan estos mecanismos con la finalidad de mantener los niveles fisiológicos de glucosa (Ekel-Mahan y cols. 2013, Bass y cols. 2012, Mukherji y cols. 2019). Lo que nos hace suponer que las alteraciones en la expresión del gen *Cry1* en este oscilador periférico, probablemente este alterando la gluconeogénesis provocando hiperglucemia en estos animales, se necesitan más estudios para confirmar esta hipótesis. En conjunto estos resultados sugieren que los nutrientes que se obtienen de la dieta alteran la maquinaria molecular del reloj circadiano estos cambios inducidos por el exceso de nutrientes pueden estar participando como sensores metabólicos (receptores nucleares, factores de transcripción, co-activadores o por medio del metabolismo intermedio) los cuales interactúan con las asas de retroalimentación positivas y negativas de los genes reloj. Además, el estado redox celular y el estado energético son propiedades del metabolismo y cambian a lo largo del día en función del estado nutricional y también podrían ejercer una importante influencia en el funcionamiento del reloj molecular.

Es importante mencionar que un limitado número de estudios publicados indagan el efecto del estado nutricional materno aunado al consumo de dietas desbalanceadas postnatalmente en la descendencia (Cleal y cols. 2019, Desai y cols. 2014, Howie y cols. 2009). Este trabajo es el primero estudio que evalúa la influencia de una sobre-nutrición materna por el consumo de una dieta alta en grasas y carbohidratos previo y durante la gestación aunada a una segunda exposición a la dieta desbalanceada en la descendencia de conejos en la edad adulta.

En cuanto a los animales obtenidos de madres sobre-nutridas y que en la edad adulta fueron alimentados con una dieta desbalanceada, mostraron un incremento en el consumo calórico en ambas fases del ciclo, el cual está dado por el consumo directo de la dieta postnatal

independientemente de la condición materna. A pesar de este comportamiento los animales no desarrollaron obesidad. Hallazgos en la literatura demuestran que el consumo de una dieta desbalanceada durante la gestación y la lactancia aunado a la ingesta de una dieta alta en grasas postnatalmente en la descendencia no tiene efectos en el peso corporal (Howie y cols. 2009, Sheen y cols. 2018). Contrario a lo observado por Cleal y colaboradores (2019), en donde demuestran que la obesidad materna independientemente del tipo de alimentación consumido posterior al destete en la descendencia, desarrollan obesidad. Las diferencias observadas en este trabajo en comparación con otros estudios se podrían explicar por la composición de la dieta, así como el tiempo de exposición a la misma, el momento de la manipulación y la susceptibilidad específica del modelo a desarrollar obesidad.

En cuanto a los cambios metabólicos, estos animales exhibieron una marcada hiperglucemia, colesterolemia, un incremento sustancial en los niveles de LDL así como a nivel histológico el hígado mostró una mayor acumulación de microvesículas. Por otra parte, en estos animales se observó una disrupción circadiana (pérdida de la ritmicidad de 24 horas) de todas las variables metabólicas.

A lo largo de este trabajo se ha evidenciado que la sobre-nutrición materna provoca una desregulación en la temporalidad de estas variables metabólicas en la descendencia, y el consumo directo de una dieta alta en grasas y carbohidratos influye en los niveles séricos de estos analitos. Aunado a lo anterior, nuestros resultados son un claro indicador que la combinación de la sobre-nutrición materna y el consumo directo de una dieta alta en grasas y carbohidratos en la edad adulta provoca una disrupción circadiana acompañada de cambios en los puntos de regulación en estas variables metabólicas, estas alteraciones ocurren antes de que los animales desarrollen SM. Posiblemente con mayor tiempo a la exposición a la dieta desbalanceada se podrían observar cambios en el peso corporal y el diagnóstico de SM.

En cuanto a la maquinaria molecular del reloj circadiano en el hígado, se observaron cambios en los niveles de expresión de los genes *Clock*, *Per1* y *Bmal1* en la descendencia, los cuales están asociadas a la sobre-nutrición materna y a la exposición al consumo de una dieta desbalanceada en la edad adulta. Sin embargo, estos cambios no explican completamente la disrupción del ritmo de las variables metabólicas observadas en este trabajo. Se ha demostrado que la restricción de alimento o los factores del estilo de vida (privación del

sueño o turnos nocturnos) generan alteraciones en patrones conductuales de alimentación lo que conlleva al desarrollo de obesidad (Damiola y cols. 2000, Pendergast y cols. 2013). El consumo de una dieta alta en grasas provoca pérdida de oscilaciones en los metabolitos séricos (Abbondante y cols. 2016), la eliminación específica del gen *Bmal1* en el tejido adiposo se ha asociado con una disminución en los ácidos grasos polinsaturados y polinsaturados no esterificados los cuales se relacionan con el incremento del peso corporal (Pachos y cols. 2012). Se considera que alteraciones circadianas guardan una estrecha relación con el desarrollo de enfermedades metabólicas, esto se ha asociado por la pérdida de la coordinación circadiana (acoplamiento) entre los tejidos periféricos (West y cols. 2015, Ekel-Mahan y cols. 2019). Por lo que resulta relevante realizar un estudio más extenso de la expresión de los genes reloj en otros osciladores periféricos, tales como el tejido adiposo, páncreas y músculo, órganos que están directamente involucrados en la regulación del metabolismo, lo que nos ayudaría a comprender mejor la disrupción de la ritmicidad circadiana en estas variables metabólicas.

VII. CONCLUSION

El consumo crónico de una dieta alta en grasa y carbohidratos previa y durante la gestación produce alteraciones en la regulación metabólica y cronostática de la descendencia en la edad adulta. Estas alteraciones están asociadas a cambios en la expresión de los genes *Clock*, *Bmal1* y *Per1* en el hígado.

Los cambios en el comportamiento alimenticio, en la regulación metabólica y cronostática así como los cambios en la expresión de *Cry1* son el resultado del consumo directo de la dieta desbalanceada.

Por lo que la maquinaria del reloj molecular en el hígado responde diferencialmente a estímulos como la sobre-nutrición materna y al consumo directo de una dieta alta en grasas y carbohidratos.

VIII. PERSPECTIVAS

Sería de gran relevancia determinar el papel que desempeña el impacto nutricional materno y el consumo de una dieta alta en grasas y carbohidratos como uno de los factores para inducir alteraciones en el acoplamiento del reloj circadiano en otros osciladores periféricos, como son: músculo, tejido adiposo, corazón, intestino entre otros. Por lo tanto, una mejor comprensión de estos efectos de los factores estudiados en este trabajo sobre las alteraciones en la maquinaria molecular del sistema circadiano en los diferentes osciladores periféricos es de suma importancia, debido a que son indispensables estudios integrativos a nivel fisiológico y molecular lo cual podrán proporcionar una mayor comprensión de lo que puede estar sucediendo en el individuo.

Con base a nuestros resultados sería indispensable el estudio de los efectos en los cambios de expresión de los genes asociados directamente entre el metabolismo y el sistema circadiano como podrían ser AMPK, SIRT1, PPAR, ROR con la finalidad de comprender y poder detallar los mecanismos o posibles vías que podrían estar relacionadas y verse comprometidas por el consumo directa de la dieta, la programación *in útero* aunado con la ingesta de una dieta desbalanceada postnatalmente.

Como ya hemos demostrado las alteraciones en el metabolismo de glucosa y lípidos y la disrupción circadiana están asociados con alteraciones en la maquinaria molecular del reloj circadiano lo que está relacionado con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, sin embargo la disbiosis intestinal también podría estar jugando un papel fundamental en la susceptibilidad de desarrollar enfermedades metabólicas en la edad adulta. En el intestino se controlan funciones fisiológicas como la digestión y absorción de alimentos, y el vaciado gástrico, funciones reguladas por los genes del reloj (Hussain y Pan 2015). Por lo tanto, el estudio de los ritmos en la abundancia y tipo de microbiana intestinal podría ser considerado un campo de estudio fundamental para este trabajo.

IX. REFERENCIAS

- Abe M, Herzog D, Yamazaki S. 2002. Circadian rhythms in isolated brain regions. *Brain*. 22: 350–356
- Andersen C, Jensen T y Orntoft T. 2004. Normalización de los datos cuantitativos en tiempo real de la transcripción inversa-PCR: un enfoque de estimación de varianza basado en el modelo para identificar genes adecuados para la normalización, aplicado a conjuntos de datos de cáncer de vejiga y colon. *Cáncer*. 64: 5245–5250.
- Abrahamson E y Moore R. 2006. Lesions of suprachiasmatic nucleus efferents selectively affect restactivity rhythm. *Molecular and cellular endocrinology*. 252: 46–56
- Abbondante S, Eckel-Mahan K, Cegli K, Baldi P y Sassone-Cors B. 2016. Comparative circadian metabolomics reveal differential effects of nutritional challenge in the serum and liver. *The journal of biological chemistry*. 291: 2812–2828
- Adamovich Y, Aviram R y Asher G. 2015. The emerging roles of lipids in circadian control. *Biochimica biophysical*. 1851: 1017–1025.
- Adamovich, Y, Rousso-Noori Z, Zwihaft A, Neufeld-Cohen M, Golik J, Kraut-Cohen M, Wang X, y Asher G. 2014. Circadian clocks and feeding time regulate the oscillations and levels of hepatic triglycerides. *Cell metabolism*. 19: 319–330.
- Aguilar-Roblero R. 1993. Teorías básicas de los ritmos biológicos. *Psiquis*. 6: 121-132.
- Alfaradhi M, y Ozanne E. 2011. Developmental programming in response to maternal overnutrition. *Frontiers in genetics*. 2: 27.
- Ando H, Kumazaki M, Motosugi Y, Ushijima K, Maekawa T, Ishikawa J. 2011. Impairment of peripheral circadian clocks precedes metabolic abnormalities in ob/ob mice. *Endocrinology*. 152: 1347-13554.
- Ando H, Yanagihara H, Hayashi Y. 2005. Rhythmic messenger ribonucleic acid expression of clock genes and adipocytokines in mouse visceral adipose tissue. *Endocrinology*. 146: 5631–5636

Aschoff J. 1981. Handbook of behavioral neurobiology. Volume 4. Biological rhythms. Plenum Press, New York. 345: 563.

Asher G, Gatfield M, Stratmann H, Reinke C, Dibner F, Kreppel R, Mostoslavsky FW y Schibler U. 2008. SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation. Cell. 134: 317–328

Balsalobre A, Brown S, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk, C, Reichardt M, Schutz G y Schibler U. 2000. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. Science 289: 2344-2347.

Balsalobre, A. 2002, Clock genes in mammalian peripheral tissues. Cell tissue research 309: 193-199

Barker DJ, Hales C, Fall H y Osmond C. 1992. Type 2 (non- insulin dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. Endocrinology. 36: 62–67.

Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B y Simmonds J. 1989. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. Lancet. 8663: 577-580.

Barnea M, Madar Z y Froy O. 2009. High-fat diet delays and fasting advances the circadian expression of adiponectin signaling components in mouse liver. Endocrinology. 150: 161-8.

Bartell PA, Miranda-Anaya M y Menaker M. 2004. Period and phase control in a multioscillatory circadian system (*Iguana iguana*). Journal of biological rhythms. 19: 47-57.

Bass J y Takahashi JS. 2010. Circadian integration of metabolism and energetics. Science. 330: 1349-54.

Bass J. 2012. Circadian topology of metabolism. Nature. 491: 348–356.

Bell-Pedersen D, Cassone VM, Earnest J, Golden S, Hardin E, Thomas L y Zoran J. 2005. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. Nature Reviews Drug Discovery. 54: 1–13.

Berson, M, Dunn A y Takao M. 2002. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*. 295: 1070-1073.

Bodosi B, Gardi J, Hajdu I, Szentirmai E Obal F y Krueger JM. 2004. Rhythms of ghrelin, leptin, and sleep in rats: Effects of the normal diurnal cycle, restricted feeding, and sleep deprivation. *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 287: 1071-1079.

Borengasser SJ, Kang P, Faske J, Gomez-Acevedo H, Blackburn ML, Badger TM, Shankar K. 2014. High fat diet and in utero exposure to maternal obesity disrupts circadian rhythm and leads to metabolic programming of liver in rat offspring. *PLoS One*.9: e84209.

Bonaconsa M, Malpeli G, Montaruli A, Carandente F, Grassi-Zucconi G, Bentivoglio M. 2014. Differential modulation of clock gene expression in the suprachiasmatic nucleus, liver and heart of aged mice. *Experimental Gerontology*. 55: 70–79.

Buhr D, Yoo H, Takahashi, J. 2010. Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. *Science*. 330: 379-385.

Buijs R, León-Mercado L, Guzmán-Ruiz M, Guerrero-Vargas NN, Romo-Nava F, Buijs RM. 2016. The Circadian System: A Regulatory Feedback Network of Periphery and Brain., *Physiology*. 31: 170–81.

Buijs R y Kalsbeek A. 2001. Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nature reviews. Neuroscience*. 2: 521–6.

Buijs R, Van Eden C, Goncharuk V y Kalsbeek. 2003. A. The biological clock tunes the organs of the body: timing by hormones and the autonomic nervous system. *Journal Endocrinology*. 177: 17–26.

Burt J, Alberto C, Parsons M, Hirasawa M. 2010. Local network regulation of orexin neurons in the lateral hypothalamus. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 301: R572 LP-R580.

Bruce K, Szczepankiewicz D, Sihota, K, Ravindraanandan, M, Thomas H, Lillycrop K, Burdge G, Hanson M, Byrne C, Cagampang F.2016. Altered cellular redox status, sirtuin

abundance and clock gene expression in a mouse model of developmentally primed NASH. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1861: 584–593.

Caldelas I, Gonzalez B, Montúfar-Chaveznava R, Hudson R. 2009. Endogenous clock gene expression in the suprachiasmatic nuclei of previsual newborn rabbits is entrained by nursing. *Developmental Neurobiology*. 69: 47-59.

Caldelas I, Tejadilla D, Gonzalez B, Montúfar R, Hudson R. 2007. Diurnal pattern of clock gene expression in the hypothalamus of the newborn rabbit. *Neuroscience*. 144: 395-401

Caldelas I. 2000. Mecanismos implicados en el acoplamiento de los osciladores circadianos. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.

Canto C, Gerhart-Hines J, Feige M, Lagouge L, Noriega JC, Milne PJ, Elliott P, Puigserver y Auwerx J. 2009. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*. 458: 1056–1060.

Carninali D, Jorda C, Sanchez-Barcelo E. 1994. Ritmos biológicos. Ed. Lit. Universidad de Cantabria. 6128211

Carter R, Muralidarane A, Soeda J, Shuvra Ray, Pombo J, Ruma Saraswati, Novelli M, Fusai G, Rappa F, Saracino C, Paziienza V, Poston L, Paul D. Taylor Manlio. 2014. Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease Pathogenesis: A Role for Developmental Programming and Altered Circadian Rhythms. *PLoS One*. 9: e89505.

Challet E, Caldelas I, Graff C y Pévet P. 2003. Synchronization of the molecular clockwork by light- and foodrelated cues in mammals. *Biological Chemistry*. 384: 711–719

Challet E. 2019. The circadian regulation of food intake. *Nature Reviews Endocrinology*. 15: 393-405.

Cunningham P, Ahern A, Smith L, Da Silva Santos C, Wager T y Bechtold D. 2016. Targeting of the circadian clock via CK1 δ/ϵ to improve glucose homeostasis in obesity. *Nature*. 378: 1-10

Chou T, Scammell T, Gooley J, Gaus S, Saper C y Lu J. 2003. Critical Role of Dorsomedial Hypothalamic Nucleus in a Wide Range of Behavioral Circadian Rhythms. *The Journal of Neuroscience*. 10691: LP-10702.

Cleal J, Jasmin L. Shearer, Hugh Thomas, Jack Plume, Louise Gregory, James N. Shepard, Kerry L. Spiers-Fitzgerald, Ravi Mani, Lewis R, Lillycrop K, Hanson A, Byrne D y Cagampang R. 2019. Maternal Obesity during Pregnancy Alters Daily Activity and Feeding Cycles, and Hypothalamic Clock Gene Expression in Adult Male Mouse Offspring. *International Journal Molecular Sciences*. 5408: 1-19

Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann, B, Fleury-Olela F. y Schibler U. 2000. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Development*. 14: 2950-2961.

Davidson A, Castañón C y Stephan F. 2004. Daily oscillations in liver function: Diurnal vs circadian rhythmicity. *Liver International*. 24: 179-186

Desai M, Seekatz A, Koropatkin N, Kamada N, Hickey C, Wolter M, Pudlo N, Kitamoto S, Terrapon N. 2016. A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell*. 67: 1339-1353.

Desai M, Jellyman K, Han G, Beall M, Lane H y Ross G. 2014. Rat maternal obesity and high-fat diet program offspring metabolic syndrome. 211: 237.

Desforges M, Greenwood SL, Glazier JD, Westwood M, Sibley CP. 2010. The contribution of SNAT1 to system A amino acid transporter activity in human placental trophoblast. *Biochem Biophys Res Commun*. 398: 130 –134.

Deurveilher S y Semba K. 2005. Indirect projections from the suprachiasmatic nucleus to major arousal-promoting cell groups in rat: implications for the circadian control of behavioural state. *Neuroscience*. 130: 165–83.

Dibner C, Schibler U y Albrecht U. 2010. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Physiology*. 72: 517–49.

Drucker-Colín R, Aguilar-Roblero R, García-Hernández F, Fernández-Cancino F, Rattoni FB. 1984. Fetal suprachiasmatic nucleus transplants: diurnal rhythm recovery of lesioned rats. *Brain Research*. 311: 353–357.

Dyar A, Ciciliot S y Wright E. 2014. Muscle insulin sensitivity and glucose metabolism are controlled by the intrinsic muscle clock. *Molecular Metabolism*. 3: 29–41.

Dyar A. 2018. Atlas of circadian metabolism reveals system-wide coordination and communication between clocks. *Cell*. 174: 1571–1585

Eckel-Mahan L, Patel R, Sara de Mateo, Orozco-Solís R, Dilag-Penilla A, Kenneth A, Badi P y Sassone-Corsi P. 2013. Reprogramming of the circadian clock by nutritional challenge. *Cell*. 155: 1464–1478.

Escobar C Díaz-Muñoz M, Encinas F, Aguilar-Roblero R. 1998, Persistence of metabolic rhythmicity during fasting and its entrainment by restricted feeding schedules in rats. *American Journal of Physiology*. 274: R1309-1316.

Engin A. 2017. Circadian Rhythms in Diet-Induced Obesity. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 960: 19-52.

Farnanell F, Shende R, Neuendorff N, Allen C y Earnest J. 2011. Immortalized cell lines for realtime analysis of circadian pacemaker and peripheral oscillator properties. *The European Journal of Neuroscience*. 33: 1533–1540.

Feillet A, Jürgen A, Ripperger, Magnone C, Abdul Dullo y Challet E. 2006. Lack of food anticipation in *Per2* mutant mice. *Current Biology*. 16: 2016–2022

Fontaine G, Dubois Y, Duguay T, Helledie N, Vu-Dac P, Gervois F, Soncin S, Mandrup C, Fruchart J, Fruchart-Najib y Staels J. 2003. The orphan nuclear receptor Rev-Erbalpha is a peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma target gene and promotes PPARgamma-induced adipocyte differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*. 278: 37672–37680

Freedman S, Lucas J, Soni, B, von Schantz M, Munoz M, David-Gray Z, Foster R. 1999. Regulation of mammalian circadian behavior by nonrod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science*. 284: 502-504

Froy O. 2007. The relationship between nutrition and circadian rhythms in mammals. *Front Neuroendocrinol*. 28: 61-71.

Fukagawa K, Sakata T, Yoshimatsu H, Fujimoto K, Uchimura K y Asano C. 1992. Advance shift of feeding circadian rhythm induced by obesity progression in Zucker rats. *Am. J. Physiol*. 263: R1169-R1175.

Galtier F, Raingeard I y Renard E. 2008. Optimizing the outcome of pregnancy in obese women: from pregestational to long-term management. *Diabete Metabolism*. 34: 19-25.

García-García E, Llata-Romero M, Kaufer-Horwitz M, Tusié-Luna T, Calzada-León R, Vázquez-Velázquez V, Barquera-Cervera S, Caballero-Romo AJ, Orozco L, Velásquez-Fernández D, Rosas-Peralta M, Barriguete-Meléndez A, Zacarías-Castillo R. y Sotelo-Morales J. 2008. La obesidad y el síndrome metabólico como problema de salud de pública: una reflexión. *Salud Pública Mexicana*. 50: 530-547.

Gilardi F, Migliavacca E, Naldi A, Baruchet M, Cnella D, Le Martelot G, Guex N y Desvergne B. 2014. Genomewide analysis of SREBP1 activity around the clock reveals its combined dependency on nutrient and circadian signals. *PLoS Genet*. 10: E1004155.

Glazier D, Cetin I, Perugino G, Ronzoni S, Grey M, Mahendran D, Marconi M, Pardi G y Sibley P. 1997. Association between the activity of the system A amino acid transporter in the microvillous plasma membrane of the human placenta and severity of fetal compromise in intrauterine growth restriction. *Pediatric Research*. 42: 514 –519.

Gluckman P y Hanson M. 2014. The developmental origins of health and disease: Brief History of the Approach and Current Focus on Epigenetic Mechanisms an overview. *Seminars in Reproductive Medicine*. 27: 358–368.

Gluckman y Hanson A. 2008. *Developmental Origins of Health and Disease: New Insights*. 102: 90-93

Godfrey M y Barker J. 2000. Fetal nutrition and adult disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 71: 1344S-1352S.

Goldstein L, Russell A y De Bose-Boyd. 2006. Protein Sensors for Membrane Sterols. *Cell*. 124: 35-46.

Granados F, Salazar J, Vergara A, Escandón C, Vega G, y Aguilar R. 1995. Los ritmos circádicos en mamíferos: conceptos, implicaciones y bases biológicas. En J.

Green D y Gillette R. 1982. Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Research*. 245: 198-200.

Gruart A, Escobar C y Aguilar-Roblero R. 2002. Los relojes que gobiernan la vida. Colección Ciencia para todos. México.

Guilding C y Piggins H. 2007. Challenging the omnipotence of the supraquiasmatic timekeeper: are circadian oscillators present throughout the mammalian brain?. *Eur J. Neurosci*. 25: 3195-3216.

Guillaumond F, Dardente H, Giguere V, Cermakian N. 2005. Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *Journal Biology Rhythms* 20: 391-403.

Gustafsson J. 2009. Neonatal energy substrate production. *Indian Journal of Medical Research*. 130: 618e623.

Gwinner E y Brandstätter R. 2001. Complex bird clocks. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 356: 1801-1810

Halberg F, Halberg E, Barnum C y Bittner J. 1959. Physiologic 24-hour periodicity in human beings and mice, the lighting regimen and daily routine. *Photoperiodism and related phenomena in plants and animals*. 55: 803-878

Hannibal J. 2002. Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell Tissue Research*. 309: 73-88

Hastings M y Herzog E. 2004. Clock genes, oscillators, and cellular networks in the suprachiasmatic nuclei. *Journal of biological rhythms*. 19: 400–13.

Hastings M, Brancaccio M y Maywood E. 2014. Circadian pacemaking in cells and circuits of the suprachiasmatic nucleus. *Journal of Neuroendocrinology*. 26: 2–10.

Helm B y Stevenson T. 2014. Circannual Rhythms: History, Present Challenges, Future Directions. In: *Annual, Lunar, and Tidal Clocks: Patterns and Mechanisms of Nature's Enigmatic Rhythms* (eds Numata H, Helm B): 203–225.

Hernandez-Higareda S, Pérez-Pérez A, Balderas-Peña L, Martínez-Herrera B, Salcedo-Rocha A, Ramirez-Conchas R. 2016. Maternal metabolic diseases related to pre-pregnancy overweight and obesity in Mexican women with high risk pregnancy. *Cir*.85: 292-298.

Hernández R, Manjarrez G, Chagoya G. 2014. Newborn humans and rats malnourished in utero: free plasma L-tryptophan, neutral amino acids and brain serotonin synthesis. *Brain Research*. 2: 488:1-13.

Herzog ED. 2007. Neurons and networks in daily rhythms. *Nature reviews. Neuroscience*. 8: 790–802.

Hirayama J, Chen L, Guarente y Sassone C. 2008. The NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. *Cell*. 134: 329–340.

Hsieh M, Yang H, Tseng L, Hwang C y Shieh K. 2010. Abnormal expressions of circadian-clock and circadian clock-controlled genes in the livers and kidneys of long-term, high-fatdiet-treated mice. *International Journal of Obesity*. 34: 227–239.

Howie G, Sloboda D, Kamal T y Vickers M. 2009. Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. *Journal Physiology* 587: 905–915

Hue-Beauvais C, Chavatte-Palmer P, Aujean E, Dahirel M, Laigre P, Péchoux C, Bouet S, Devinoy E, Charlier M. 2011. An obesogenic diet started before puberty leads to abnormal mammary gland development during pregnancy in the rabbit. *Indian Journal of Medical Research*. 240: 347-56.

Huypens P, Sass S, Wu M, Dyckhoff D, Tschö PM, Theis F, Marschall S, Hrabe de Angelis M, y Beckers J. 2016. Epigenetic germline inheritance of diet-induced obesity and insulin resistance. *Nature Genetics*. 48: 497–499.

Inouye S y Kawamura H. 1979. Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic “island” containing the suprachiasmatic nucleus. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. 76: 5962-5966.

Instituto Nacional de Salud Pública Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (2012): Resultados Nacionales. <http://ensanut.insp.mx/>.

Jimenez-Chillaron J, Hernandez-Valencia M, Reamer C, Fisher S, Joszi A, Hirshman M, Oge A, Walrond S, Przybyla R, Boozer C. 2005. Beta-cell secretory dysfunction in the pathogenesis of low birth weight-associated diabetes: a murine model. *Diabetes* 54: 702–711.

Jimenez-Chillaron J, Isganaitis E, Charalambous M, Gesta S, PentinatPelegrin T, Faucette RR, Otis JP, Chow A, Diaz R, Ferguson-Smith A y Patti ME. 2009. Intergenerational transmission of glucose intolerance and obesity by in utero undernutrition in mice. *Diabetes* 58: 460–468.

Jordan S y Lamia K. 2013. AMPK at the crossroads of circadian clocks and metabolism. *Molecular and Cellular Endocrinology* 366: 163–169.

Kaati, G, Bygren, LO, y Edvinsson S. 2002. Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents’ and grandparents’ slow growth period. *European Journal of Human Genetics*. 10: 682–688.

Kalsbeek A, la Fleur S, Folletos E. 2014. Circadian control of glucose metabolism. *Mol Metabolism*. 3: 372-83.

Kassi E, Pervanidou P, Kaltsas G y Chrousos G. 2011. Metabolic syndrome: definitions and controversies. *BMC medicine*. 9: 48.

Kennaway J, Varcoe J, Voultisios A, Boden J. 2013. Global Loss of Bmal1 Expression Alters Adipose Tissue Hormones, Gene Expression and Glucose Metabolism. *Plos One*.

King J. 2006. Maternal obesity, metabolism, and pregnancy outcomes. *Annual Review of Nutrition*. 26: 271e291.

Kirk S, Samuelsson A, Argenton M, Dhonye H, Kalamatianos T, Poston L. 2009. Maternal Obesity Induced by Diet in Rats Permanently Influences Central Processes Regulating Food Intake in Offspring. *PLoS ONE* 4: e5870.

Kjaergaard M, Nilsson A, Rosendal M, Nielsen y Raun K. 2014. Maternal chocolate and sucrose soft drink intake induces hepatic steatosis in rat offspring associated with altered lipid gene expression profile. *Acta Physiological*. 210: 142–153.

Klein D. 2004. The 2004 Aschoff / Pittendrigh Lecture : Theory of the Origin on the Pineal Gland — A Tale of Conflict and Resolution. *Health (San Francisco)*. 19: 264–279.

Ko C y Takahashi J. 2006. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human Molecular Genetics*. 15: R271-77.

Kohsaka A, Laposky A, Ramsey K, Estrada C, Joshu C, Kobayashi Y. 2007. High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice. *Cell. Metabolism*. 6: 414-421.

Kondratov R, Kondratova A, Gorbacheva V, Vykhovanets O y Antoch M. 2006. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. *Genes & Development*. 20: 1868-1873

Kondratova A y Kondratov R. 2012. The circadian clock and pathology of the ageing brain. *Nature Reviews Neuroscience*. 13: 325–335

Konopka R y Benzer S. 1971. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 68: 2112–6.

Korf H y Von Gall C. 2013. Circadian Physiology. In: *Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical*. 65: 1813–1845.

Krechowec S, Vickers M, Gertler A y Breier B. 2006. Prenatal influences on leptin sensitivity and susceptibility to diet-induced obesity. *Journal of Endocrinology*. 3: 189355–363.

- Krout K, Kawano J, Mettenleiter T y Loewy A. 2002. CNS inputs to the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neuroscience*.110: 73–92.
- Kuhlman S, Mackey S, Duffy J. 2007. Biological rhythms workshop I: Introduction to chronobiology. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*.72: 1–6.
- Kumar J, Challet E y Kalsbeek A. 2015. Circadian rhythms in glucose and lipid metabolism in nocturnal and diurnal mammals. *Molecular Cell Endocrinology*. 1:74-88.
- La Fleur S, Kalsbeek A, Wortel J, Buijs R. 1999. A suprachiasmatic nucleus generated rhythm in basal glucose concentrations. *Journal Neuroendocrinoly*. 11: 643-652
- La Fleur S, Kalsbeek A, Wortel J, Fekkes M, Buijjs R. 2001. A daily rhythm in glucose tolerance: a role for the suprachiasmatic nucleus.*Molecular Metabolism*. 50: 1237-43
- Lamia K, Papp S, Yu R, Barish G, Uhlenhaut N, Jonker J, Downes M y Evan R. 2011. Cryptochromes mediate rhythmic repression of the glucocorticoid receptor. *Nature*. 480: 552-556
- Lamia K, Sachdeva U, DiTacchio L, Williams E, Alvarez J, Egan D y Evans R. 2009. AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. *Science (New York, N.Y.)*. 326: 437–440.
- Lamia K, Storch K y Weitz C. 2008. Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105: 15172–15177
- Leddy M, Power M y Schulkin J. 2008. The impact of maternal obesity on maternal and fetal health. *Reviews in Obstetrics and Gynecology*. 1: 170e178.
- Leone T, Lehman B, Finck P, Schaeffer A, Wende S, Boudina M, Courtois D, Wozniak N, Sambandam C, Bernal-Mizrachi Z, Chen J, Holloszy D, Medeiros R, Schmidt J, Saffitz E, Abel C, Semenkovich D y Kelly A. 2005. PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: Muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biology* 3: e101

Li M, Li C y Wang Z. 2012. The role of circadian clocks in metabolic disease. *Yale Journal of Biology and Medicine*. 85: 387–401.

Liu C, Li S y Liu T. 2007. Transcriptional coactivator PGC-1alpha integrates the mammalian clock and energy metabolism. *Nature*. 447: 477–481

Lorenzo C, Okoloise M, Williams K, Stern M, Haffner S. 2007. The metabolic syndrome as a predictor of type 2 diabetes: Heart study. *Diabetes Care*. 26: 3153-3119.

Lukaszewski M, Eberlé D, Vieau D y Breton C. 2013. Nutritional manipulations in the perinatal period program adipose tissue in offspring. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 305: E1195–E1207

Magnusson A, Waterman I, Wennergren M, Jansson T y Powell TL. 2004. Triglyceride hydrolase activities and expression of fatty acid binding proteins in the human placenta in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction and diabetes. *Journal Endocrinology Metabolism*. 89: 4607– 4614.

Mansego M, Garcia-Lacarte M, Milagro F, Marti A, Martinez J. 2017. DNA methylation of miRNA coding sequences putatively associated with childhood obesity. *Pediatric Obesity*. 12: 19–27.

Martínez J, Milagro F, Claycombe K, Schalinske K. 2014. Epigenetics in adipose tissue, obesity, weight loss, and diabetes. *Nutrition*. 5: 71–81

Makkar A, Mishima T, Chang G, Scifres C y Sadovsky Y. 2014. Fatty acid binding protein-4 is expressed in the mouse placental labyrinth, yet is dispensable for placental triglyceride accumulation and fetal growth. *Placenta* 35: 802–807.

Mukherji A, Kobiita A. y Chambon, P. 2019. Shifting the feeding of mice to the rest phase creates metabolic alterations, which, on their own, shift the peripheral circadian clocks by 12 hours. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 112: E6683–E6690.

Marcheva B, Ramsey K y Buhr E. 2010. Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature*. 466: 627–631.

Mendoza J y Challet E. 2009. Brain Clocks: From the Suprachiasmatic Nuclei to a Cerebral Network. *The Neuroscientist*. 15: 477-488

Mendoza J. 2007. Circadian clocks: setting time by food. *Journal of Neuroendocrinology*, 19(2): 127-137.

Mendoza, J, Pevet, P y Challet, E. 2007. Circadian and photic regulation of clock and clock-controlled proteins in the suprachiasmatic nuclei of calorie-restricted mice. *European Journal of Neuroscience*. 25: 3691-3701.

Milagro F, Gómez-Abellán P, Campión J, Martínez J, Ordovás J, Garaulet M. 2014. CLOCK, PER2 and BMAL1 DNA methylation: association with obesity and metabolic syndrome characteristics and monounsaturated fat intake. *Chronobiology International*. 29: 1180-94.

Montúfar-Chaveznava R, Trejo-Muñoz L, Hernández-Campos O, Navarrete E, Caldelas I. 2013. Maternal olfactory cues synchronize the circadian system of artificially raised newborn rabbits. *PloS one*. 8: e74048.

Montúfar-Chaveznava R, Trejo-Muñoz L, Hernández-Campos O, Navarrete E, Caldelas I. (2013). Maternal olfactory cues synchronize the circadian system of artificially raised newborn rabbits. *PloS one*. 8: e74048.

Moore R y Eichler V. 1972. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Research*. 42: 201–206.

Moore R, Speh J y Leak R. 2002. Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell and tissue research*. 309: 89–98.

Moore R. 2013. The suprachiasmatic nucleus and the circadian timing system, 1a edn, Vol. 119. Elsevier Inc. 45: 1-28.

Moore-Ede M, Sulzman F y Fuller C. 1982. The clocks that time us: physiology of the circadian timing system. Harvard University Press. 3: 464.

Morin L. 2013. Neuroanatomy of the extended circadian rhythm system. *Experimental Neurology*. 243: 4–20.

Morre R y Lenn N. 1972. A retinohypothalamic projection in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*. 146: 1-14.

Mouralidarane A, Soeda J, Sugden D, Bocianowska A, Carter R, Ray S, Saraswati R, Cordero P, Novelli M, Fusai G, Vinciguerra M, Poston L, Taylor PD, Oben JA. 2015. Maternal obesity programs offspring non-alcoholic fatty liver disease through disruption of 24-h rhythms in mice. *International Journal of Obesity*. 39: 1339-48.

Nakahata YM, Kaluzova B, Grimaldi B, Sahar J, Hirayama J, Chen LP, Guarente y Sassone-Corsi. 2008. The NAD⁺ dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK mediated chromatin remodeling and circadian control. *Cell*. 134: 329-340.

Nakahata Y, Kaluzova B, Grimaldi S, Sahar, Oishi K, Sakamoto K, Okada T, Nagase T, Ishida N. 1998a. Antiphase circadian expression between BMAL1 and period homologue mRNA in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues of rats. *Biochemical Biophysics*. 253: 199-203.

Ohta H, Honma S, Abe H, Honma K. 2003. Periodic absence of nursing mothers phase-shifts circadian rhythms of clock genes in the suprachiasmatic nucleus of rat pups. *European Journal of Neuroscience*. 17: 1628-1634.

Oishi K, Kasamatsu M, Ishida N. 2004. Gene- and tissue-specific alterations of circadian clock gene expression in streptozotocin-induced diabetic mice under restricted feeding. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 317: 330-334.

Oishi K, Atsumi G, Sugiyama S, Kodomaria I, Kasamatsu M, Machida K, Ishida N. 2006. Disrupted fat absorption attenuates obesity induced by a high-fat diet in Clock mutant mice. *Elsevier B.V FEBS Letters*. 580: 127–130.

Oishi K, Sakamoto K, Okada T, Nagase T, Ishida N. 1998. Antiphase circadian expression between BMAL1 and period homologue mRNA in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissue of rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 253: 199-203.

Oishi K, Sakamoto K, Okada T, Nagase T, Ishida N. 1998b. Humoral signals mediate the circadian expression of rat period homologue (rPer2) mRNA in peripheral tissues. *Neuroscience Lett.* 256: 117-119.

Olaiz-Fernández G, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Rojas R, Villalpando-Hernández S, Hernández-Avila M, Sepúlveda-Amor J. 2006. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición Cuernavaca México: Instituto Nacional de Salud Pública.

Orozco-Solís R, Matos RJ, Guzmán-Quevedo O, Lopes de Souza S, Bihouée A, Houlgatte R. 2010. Nutritional programming in the rat is linked to long lasting changes in nutrient sensing and energy homeostasis in the hypothalamus. *PLoS One.* 5: e13537.

Orozco-Solis R, Matos RJ, Lopes de Souza S, Grit I, Kaeffer B, Manhaes de Castro R, Bolaños-Jimenez F. 2011. Perinatal nutrient restriction induces long-lasting alterations in the circadian expression pattern of genes regulating food intake and energy metabolism. *International Journal Obesity (London).* 35: 990-1000.

Ong Z. 2012. Maternal "junk-food" feeding of rat dams alters food choices and development of the mesolimbic reward pathway in the offspring. *The FASEB Journal.* 25: 2167-2179.

Paschos G, Ibrahim S, Song W, Kunieda T, Grant G, Reyes T, Bradfield C, Vaughan C, Eiden M, Masoodi M, Griffin J, Wang F, Lawson J, Fitzgerald G. 2012. Obesity in mice with adipocyte-specific deletion of clock component Arntl. *Nature Medicine.* 18: 1768-77.

Perelis M, Marcheva B, Ramsey KM, Schipma MJ, Hutchison AL, Taguchi A y Bass, J. 2015. Pancreatic β cell enhancers regulate rhythmic transcription of genes controlling insulin secretion. *Science (New York, N.Y.)* 350: 4250.

Pendergast J, Braneky K, Yang W, Ellacott K, Niswender K, Yamazaki S. 2013. High-fat diet acutely affects circadian organisation and eating behavior. *European Journal of Neuroscience.* 37: 1350-6.

Picone O, Laigre P, Fortun-Lamothe L, Archilla, Peynot N, Ponter A, Berthelot V, Gordier G y Chavette-Palmer P. 2011. Hyperlipidic hypercholesterolemic diet in prepubertal rabbits

affects gene expression in to embryo, restrictsfetal growth and increases offspring susceptibility to obesity. *Theriogenology*. 75: 287-289.

Pittendrigh C y Caldarola P. 1973. General homeostasis of the frequency of circadian oscillations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 70: 2697–2701

Pittendrigh CS. 1960. Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 25: 159-84.

Pittendrigh CS. 1981a. Circadian Systems: General Perspective. In: *Handbook of behavioral neurobiology*. Volume 4. Biological rhythms, Vol. 4 (ed Aschoff J), pp. 57–80. Plenum Press, New York.

Pittendrigh CS. 1981b. Circadian Systems: Entrainment. In: *Handbook of behavioral neurobiology*. Vol. Biological rhythms (ed Aschoff J), pp. 95-124. Plenum Press, New York.

Ralph M, Foster R, Davis F y Menaker M. 1990. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*. 247: 975–978.

Ramos-Lopez O, Riezu-Boj J, Milagro I, Martinez A. 2018. Circadian gene methylation profiles are associated with obesity, metabolic disturbances and carbohydrate intake. *Journal Chronobiology International. The Journal of Biological and Medical Rhythm Research*. 35: 969-981.

Reppert S y Weaver D. 2002. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*. 418: 935–941.

Richter C. 1967. Sleep and activity: their relation to the 24-hour clock. *Proc. Assoc. Res. Nervous and Mental Diseases*. 45: 8-27.

Ribas-Latre A, Fekry B, Kwok C, Baumgartner C, Shivshankar S, Kai Sun, Zheng Chen, Eckel-Mahan K.2019. Rosiglitazone reverses high fat diet-induced changes in BMAL1 function in muscle, fat, and liver tissue in mice. *International Journal of Obesity*. 43: 567–580

Rodriguez J y Gutierrez M. 2018. Nutrición prenatal y su efecto en el desarrollo. Academia Nacional de Medicina de México (ANMM).

Rudic R, McNamara P, Curtis A, Boston R, Panda S y Hogenesch, J. 2004. BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, In review are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biol.* 2: e377.

Salazar-Juárez A, Escobar C y Aguilar-Roblero R. 2002. Anterior paraventricular thalamus modulates lightinduced phase shifts in circadian rhythmicity in rats. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology.* 283: R897–R904.

Sales M, Ferguson-Smith C y Mary-Elizabeth P. 2017. Epigenetic Mechanisms of Transmission of Metabolic Disease across Generations. *Cell Metabolism.* 25: 559-571.

Salgado-Delgado R, Saderi N, Basualdo C, Guerrero-Vargas N, Escobar C y Buijs R. 2013. Shift work or food intake during the rest phase promotes metabolic disruption and desynchrony of liver genes in male rats. *PLoS One.* 8: e60052.

Saper C, Lu J, Chou T y Gooley J. 2005. The hypothalamic integrator for circadian rhythms. *Trends in neurosciences.* 28: 152–7.

Saper C. 2013. The central circadian timing system. *Current Opinion in Neurobiology.* 23: 747–751.

Furukawa S y Kuroda Y. 2014. A Comparison of the Histological Structure of the Placenta in Experimental Animals. *Journal Toxicol Pathology.* 27: 11–18.

Schmutz I, Ripperger J, Baeriswyl-Aebischer S y Albrecht U. 2010. The mammalian clock component PERIOD2 coordinates circadian output by interaction with nuclear receptors. *Genes & Development.* 24: 345–357

Samblas M, Milagro F, Mansego M, Marti A, Martinez J. 2018. PTPRS and PER3 methylation levels are associated with childhood obesity: Results from a genome-wide methylation analysis. *Pediatric Obesity.* 13: 149–58.

Samblas M, Milagro F, Gómez-Abellán P, Martínez J, Garaulet M. 2016. Methylation on the circadian gene *BMAL1* is associated with the effects of a weight loss intervention on serum lipid levels. *Journal Biology Rhythms*. 31: 308–17.

Schwartz W y Daan S. 2017. Origins: A Brief Account of the Ancestry of Circadian Biology. In: *Biological Timekeeping: Clocks, Rhythms and Behaviour* (ed Kumar V). Springer India, New Delhi. 45: 654-675

Schwartz W y Gainer H. 1977. Suprachiasmatic nucleus: use of ¹⁴C-labeled deoxyglucose uptake as a functional marker. *Science*. 197: 1089 LP-1091.

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 y 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.

Shostak A, Meyer-Kovac J y Oster H. 2013. Circadian regulation of lipid mobilization in white adipose tissues *Diabetes*. 62: 2195–2203.

Sibley C, Glazier J y D'souza A. 1997. Placental transporter activity and expression in relation to fetal growth. *Experimental. Physiol.* 82: 389-402.

Silver R, Lehman M, Gibson M, Gladstone W, Bittman E. 1990. Dispersed cell suspensions of fetal SCN restore circadian rhythmicity in SCN-lesioned adult hamsters. *Brain Research*. 525: 45–58.

Soto-Estrada G, Moreno-Altamirano L y Diaz P. 2016. Panorama epidemiológico de México, principales causas de morbilidad y mortalidad. *Rev. Fac. Med. (Méx.)*. 59: 8:22.

Stephan F y Zucker I. 1972. Circadian Rhythms in Drinking Behavior and Locomotor Activity of Rats Are Eliminated by Hypothalamic Lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 69: 1583–1586.

Sheen J, Yu H, Tain Y. 2018. Combined maternal and postnatal high-fat diet leads to metabolic syndrome and is effectively reversed by resveratrol: a multiple-organ study. *Science*. 8: 5607.

Stokkan K, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y y Menaker M. 2001. Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science*. 291: 490–493.

Sullivan E y Grove K. 2010. Metabolic imprinting in obesity. *Forum Nutrition*. 63: 186e194

Sullivan E, Elizabeth K, Nousen A y Katherine A. 2014. Maternal high fat diet consumption during the perinatal period programs offspring behavior. *Physioly Behavory*. 123: 236-42.

Suter M, Bocoock P, Showalter L, Hu M, Shope C, McKnight R, Grove K, Lane R, Aagaard-Tillery K. 2011. Epigenomics: Maternal high-fat diet exposure in utero disrupts peripheral circadian gene expression in nonhuman primates. *FASEB Journal*. 25: 714–726

Takahashi J, Hong H-K, Ko CH y McDearmon E. 2008. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nature Reviews Genetics*. 9: 764-775.

Takahashi JS. 2016. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nature Reviews Genetics*. 18: 164–179

Thaler P, Yi X, Schur A, Guyenet J, Hwang H, Dietrich O, Zhao X, Sarruf A, Izgur, V, y Maravilla R. 2012. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *Journal Clinical Investigation*. 122: 778

Thornburg K, Shannon J, Thuillier P y Mitchell S. 2010. In Utero Life and Epigenetic Predisposition for Disease. *Genetic* 71: 57-78.

Turek F, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E. 2005. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science*. 308: 1043-1045.

Vickers M, Clayton Z, Yap C y Sloboda D. 2011. Maternal fructose intake during pregnancy and lactation alters placental growth and leads to sex-specific changes in fetal and neonatal endocrine function. *Endocrinology*. 152: 1378-1387.

Visiedo F, Bugatto F y Sanchez V. 2013. High glucose levels reduce fatty acid oxidation and increase triglyceride accumulation in human placenta. *American Journal Physiological Endocrinology Metabolism*. 305: E205eE212

Vrang N, Mrosovsky N, Mikkelsen J. 2003. Afferent projections to the hamster intergeniculate leaflet demonstrated by retrograde and anterograde tracing. *Brain research bulletin*. 59: 267–88.

Wada T, Ichihashi Y, Suzuki E, Kosuge Y, Ishige K, Uchiyama T, Makishima M7, Nakao R, Oishi K, Shimba S. 2018. Deletion of *Bmal1* Prevents Diet-Induced Ectopic Fat Accumulation by Controlling Oxidative Capacity in the Skeletal Muscle. *International Journal Molecular Science*. 18: 2813

Wakar A, Koike T, Yu Y, Inoe , Aoki T, Liu E, Fan. 2010. High-fat without excess calories induces metabolic disorders and enhances atherosclerosis in rabbit. *Atherosclerosis* 213: 148-155.

Watts A, Swanson L, Sanchez-Watts G. 1987. Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: I. Studies using anterograde transport of *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*. 258: 204–229.

Weaver D. 1998. The suprachiasmatic nucleus: a 25-year retrospective. *Journal Biological Rhythms*. 13: 100-112

Webb A y Oates A. 2016. Timing by rhythms: Daily clocks and developmental rulers. *Development Growth & Differentiation*. 58: 43–58.

Weber R. 1983. Organization of the human circadian system: Internal Interaction. In: *Circadian Rhythms in Psychiatry*, Wher TA, Goodwin FK, (eds), Boxwood Press, Pacific Grove, CA, USA: 17-32.

Welsh D, Logothetis D, Meister M, Reppert S. 1995. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron*, 14: 697-706

Welsh D, Takahashi J, Kay S. 2010. Suprachiasmatic Nucleus: Cell Autonomy and Network Properties. *Annual Review of Physiology*. 72: 551–577

West A y Bechtold D. 2015. The cost of circadian desynchrony: evidence, insights and open questions. *Bioessays*. 37: 777–88.

- Yamashita S, Iwai K, Akimoto T, Sugawara J, Kono I. 2006. Effects of music during exercise on RPE, heart rate and the autonomic nervous system. *J Sports Med Phys Fitness*. 46: 425-30.
- Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M y Tei H. 2000. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*. 288: 682–685.
- Yang X, Downes M y Yu RT. 2006. Nuclear receptor expression links the circadian clock to metabolism. *Cell*. 126: 801–810.
- Yang X, Downes M, Yu RT, Bookout AL, He W y Straume, M. 2006. Nuclear receptor expression links the circadian clock to metabolism. *Cell*. 126: 801-770.
- Yoo S, Yamazaki S, owrey P, Shimomura K, Ko H, Buhr E y Tkahashi J. 2004. PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. 101: 5339–5346.
- Zambrano E y Nathanielsz PW. 2013. Mechanisms by which maternal obesity programs offspring for obesity: evidence from animal studies. *Neutral Reviews*. 71(suppl 1): S42eS54.
- Zambrano E, Ibáñez C, Martínez-Samayoa PM, Lomas-Soria C, Durand-Carbajal M, Rodríguez-González GL. 2016. Maternal Obesity: Lifelong Metabolic Outcomes for Offspring from Poor Developmental Trajectories During the Perinatal Period. 47 :1-12.
- Zhang L, Kolaj M y Renaud L. 2006. Suprachiasmatic nucleus communicates with anterior thalamic paraventricular nucleus neurons via rapid glutamatergic and gabaergic neurotransmission: Statedependent response patterns observed *in vitro*. *Neuroscience*. 141: 2059–2066.
- Zhao S, Chu Y, Zhang C, Lin Y, Xu K, Yang P, Fan J, Liu E. 2007. Diet-induced central obesity and insulin resistance in rabbits. *Journal of animal Physiology and Animal Nutrition* 92: 105-111

Zhang R., Lahens N, Ballance H, Hughes E, y Hogenesch, J. 2016. A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.* 111: 16219–16224

Zimmet P, George M, Albertib M y Serrano RT. 2005. A New International Diabetes Federation Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome: the Rationale and the Results. *Cardiology.* 12: 1371-1376

Zylka M, Shearman L, Weaver D y Reppert S. 1998. Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron Cell Press.* 20: 1103-111.

X. GLOSARIO DE TÉRMINOS

SM	Síndrome metabólico
DM II	Diabetes mellitus tipo II
ECV	Enfermedades cardiovasculares
ENT	Enfermedades no transmisibles
ATP	Panel de expertos sobre detección, evaluación y tratamiento de la hipercolesterolemia en adultos
AGL	Ácidos grasos libres
RI	Resistencia a la insulina
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
LPL	Lipoproteína lipasa
TAG	Triacilglicéridos
PCR	Proteína c reactiva
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
CPT-I	Canitina palmitoltransferasa
IL-1	Interleusina-1
IL-6	Interleucina-6
NSQ	Núcleo supraquiasmático
QO	Quiasma óptico
III V	Tercer ventrículo
NQSvl	Región ventromedial

VIP	Polipeptido vasoactivo intestinal
GRP	Péptido liberador de la gastrina
AVP	Argenina vasopresina
GABA	Acido gamma-aminobutírico
TRH	Tracto retino hipotalámico
CK1 ϵ	Casein cinasa-1 epsilon
CK1 δ	Casein cinasa-1 delta
CCG	Genes controlados por el reloj
AMPK	Proteína quinasa activada por monofosfato de adenina
TGH	Tracto geniculo hipotalámico
IGL	Hojuela intergeniculada
NPY	Neuropeptido Y
MR	Núcleo medial de rafé
PVT	Núcleo paraventricular del tálamo
DMH	Núcleo dorsomedial del hipotálamo
MSPVZ	Área supraventricular medial
POA	Área preóptica
BST	Núcleo del lecho de la estría terminal
ZI	Zona incierta
PT	Núcleo paratenial
RE	Núcleo reuniens

SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
ARC	Núcleo arcuato
HL	Hipotálamo lateral
TMN	Núcleo tuberomamilar
HMG-CoA	3-hidroxi-3metil-glutaril coenzima A
CYP7A1	Colesterol 7 α -hidroxilasa
SREBP	Proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides
GLU	Glucosa
COL	Colesterol total
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
GLI	Glicerol
GGT	Gamma glutamil transferasa
BIL	Bilirrubina
ASL	Aspartato amino transferasa
RO	Rojo oleoso
TM	Tricromica de masson
HE	Hematoxilina eosina
LD	Luz-obscuridad
SIRT1	Sirtuina1

PGC-1 α	Coactivador de PPAR gamma de tipo 1alfa
ARNm	Ácido ribonucleico (mensajero)

XI. ANEXOS

Anexo A. Extracción de RNA Total de hipotálamo

Se realizaron extracciones de RNA total de hipotálamo de conejos machos adultos en los diferentes grupos de estudio (CON-CON, CON-SN, SN-CON y SN-SN) (Figura 14). Las bandas de RNA ribosomal 28S y 18S muestran la integridad del RNA, no se observan bandas de DNA genómico.

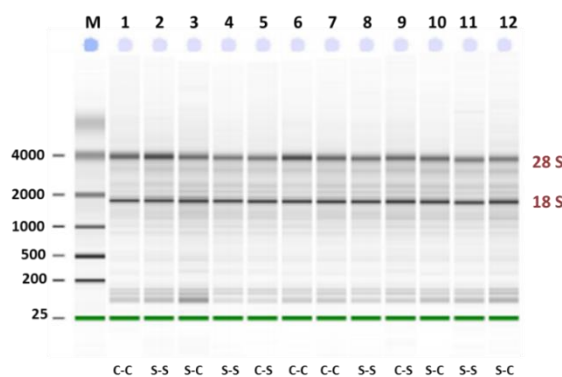


Figura 18. Gel de Agarosa se muestra la integridad del RNA Total del hipotálamo, de conejos machos de 470 días de edad, después del reto alimenticio. Se distinguen las bandas pertenecientes del RNA ribosomal correspondientes a las subunidades 28 S y 18 S. Se demuestra que está libre de contaminación de DNA genómico. La letra **M** representa el marcador molecular. Además, se muestra que está libre de DNA genómico.

Extracción de RNA total en hígado

Se realizaron extracciones de RNA total de hipotálamo de conejos machos adultos en los diferentes grupos de estudio (CON-CON, CON-SN, SN-CON y SN-SN) (Figura 16). Las bandas de RNA ribosomal 28S y 18S muestran la integridad del RNA, no se observan bandas de DNA genómico.

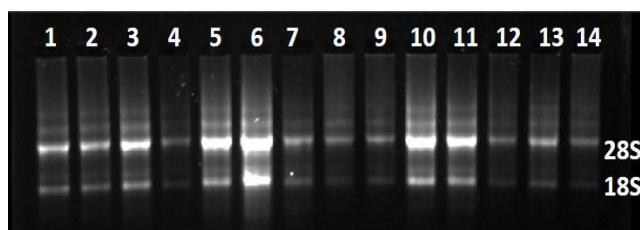


Figura 19. Gel de Agarosa se muestra la integridad del RNA de hígado de crías machos de 470 días de edad, después del reto alimenticio. Se distinguen las bandas pertenecientes del RNA ribosomal correspondientes a las subunidades 28 S y 18 S. Se demuestra que está libre de contaminación de DNA genómico. La letra **M** representa el marcador molecular. Además, se muestra que está libre de DNA genómico.

Síntesis de cDNA de hipotálamo

Después de la transcripción reversa, se realizó la síntesis de *cDNA* de hipotálamo de conejos machos, por medio de la amplificación de un gen endógeno, para este trabajo se utilizó el gen β -*Actina*. Se corroboró la obtención de *cDNA* utilizando durante la reacción de PCR punto final y se observó en un gel de agarosa la presencia de β -*Actina*.

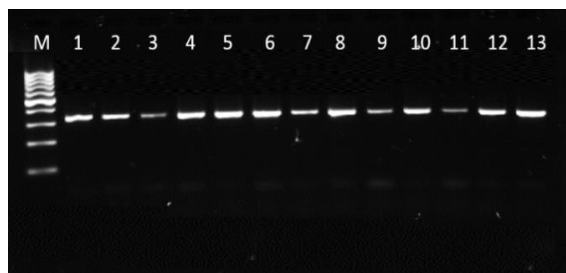


Figura 20. Gel representativo de la síntesis de cDNA, de hipotálamo. Gel de Agarosa 2%, se observa una sola banda correspondiente al gen endógeno β -*Actina*. Con un peso molecular de 332 pb. La letra **M** representa el marcador molecular de 100 pb.

Síntesis de cDNA en Hígado

Después de la transcripción reversa, se realizó la síntesis de *cDNA* de hígado de conejos machos, por medio de la amplificación de un gen endógeno, para este trabajo se utilizó el gen β -*Actina*. Se corroboró la obtención de *cDNA* utilizando durante la reacción de PCR punto final y se observó en un gel de agarosa la presencia de β -*Actina*.

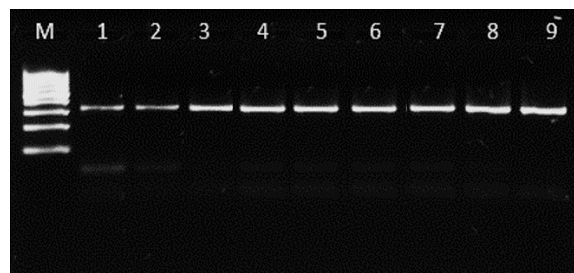


Figura 21. Gel representativo de la síntesis de cDNA, de hígado. Gel de Agarosa 2%, se observa una sola banda correspondiente al gen endógeno β -*Actina* con un peso molecular de 332 pb. La letra **M** representa el marcador molecular de 100 pb.

ANEXO B. Descripción de secuencias de sondas Taqman

Se describen los primers Forward, Reverse y la sonda TaqMan marcada con FAM en tubo único para cada gen problema (20X, listo para utilizar 1 uL por reacción de 20 uL).

CUSTOM TAQMAN® GENE EXPRESSION ASSAY

NÚMERO DE PARTE	4331348
NOMBRE DEL GEN	<i>Per1</i>
FORWARD PRIMER SEQUENCE (9-45 BASES)	CGCTACAGGCACATTCAAAGC
REVERSE PRIMER SEQUENCE (9-45 BASES)	GGGCCACCTCCAGTTCTG
PROBE SEQUENCE (9-45 BASES)	TTCCCAGCCAGTCCC
DYE FAM/NFQ-MGB	FAM/MGB

CUSTOM TAQMAN® GENE EXPRESSION ASSAY

NÚMERO DE PARTE	4331348
NOMBRE DEL GEN	<i>Cry1</i>
FORWARD PRIMER SEQUENCE	GTTCCCCTCCTTTTCTCTTTATGG
REVERSE PRIMER SEQUENCE	CGTGGATTATTTGTTGCTGCTGTAT
PROBE SEQUENCE	CACGCCACAATAGCTG
DYE FAM/NFQ-MGB	FAM/MGB

CUSTOM TAQMAN® GENE EXPRESSION ASSAY

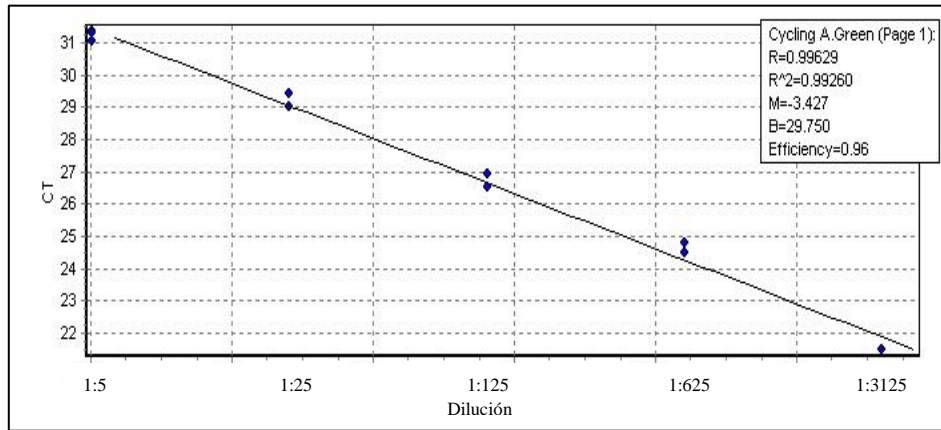
NÚMERO DE PARTE	4331348
NOMBRE DEL GEN	<i>Clock</i>
FORWARD PRIMER SEQUENCE	CACGAGAAGCCAGCACAGA
REVERSE PRIMER SEQUENCE	ACACACCAACAGACGGAGAATTT
PROBE SEQUENCE	TCGGCAGCCAGTCCAT
DYE FAM/NFQ-MGB	FAM/MGB

CUSTOM TAQMAN® GENE EXPRESSION ASSAY

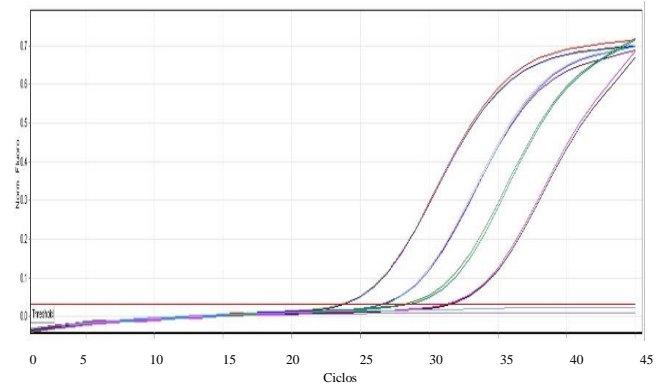
NÚMERO DE PARTE	4331348
NOMBRE DEL GEN	<i>Bmal</i>
FORWARD PRIMER SEQUENCE	AAGACAACGAACCAGACAACGA
REVERSE PRIMER SEQUENCE	CCGTTCCTGGCTGTGGAA
PROBE SEQUENCE	TCGGACGGCTGCACTC
DYE FAM/NFQ-MGB	FAM/MGB

Anexo C. CURVAS DE EFICIENCIA Y AMPLIFICACIÓN DE GENES EN HIPOTÁLAMO.

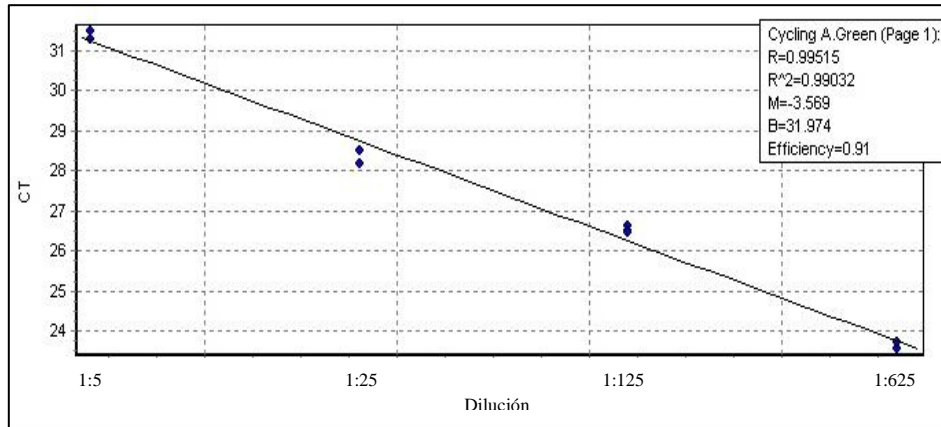
Curva de validación de eficiencia y curva de amplificación de *Gapdh*



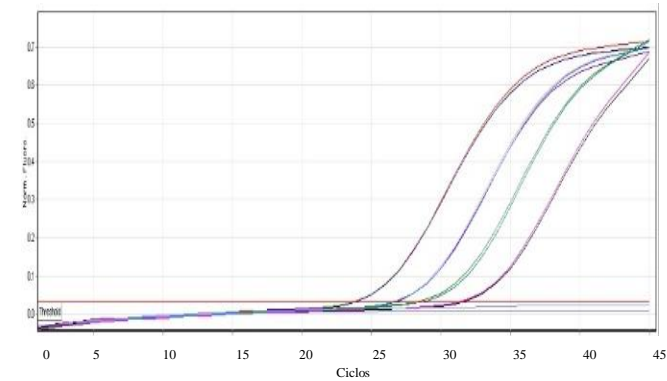
Pendiente: -3.42



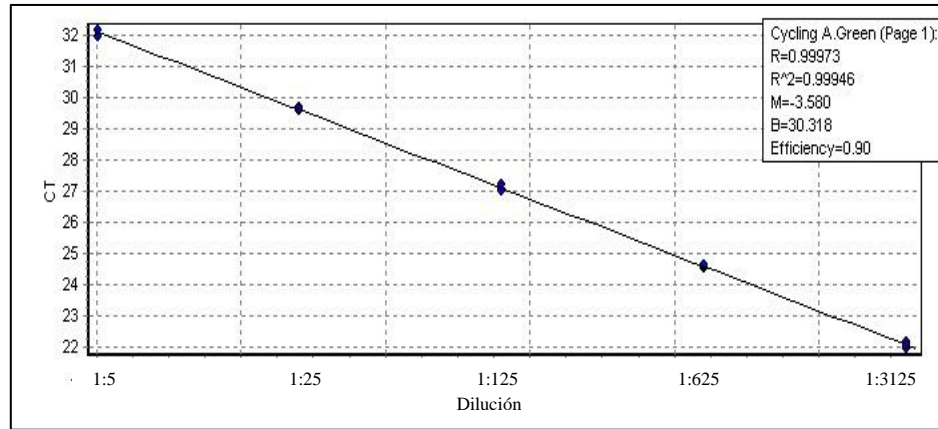
Curva de validación de eficiencia y curva de amplificación de *Hprt*



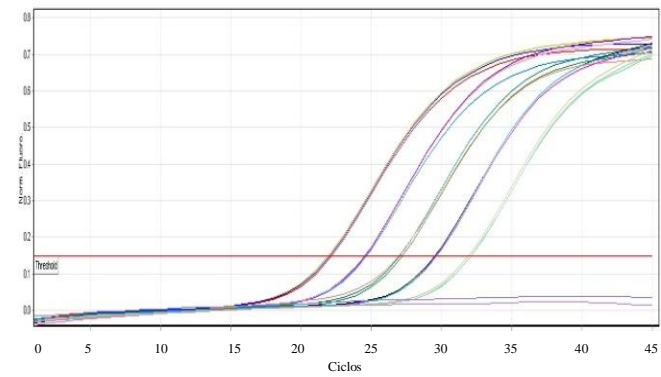
Pendiente: -3.56



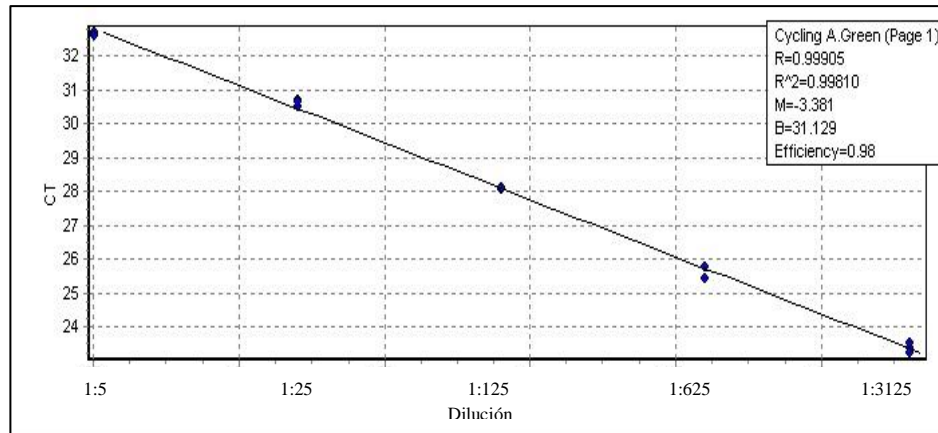
Curva de validación de eficiencia y curva de amplificación de *Ppia*



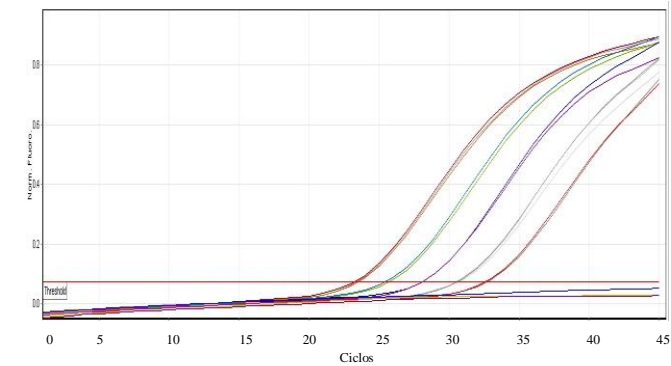
Pendiente: -3.58



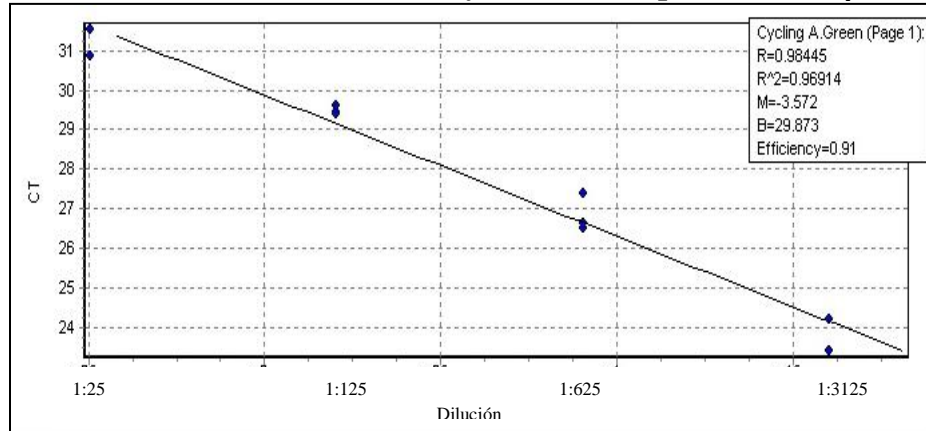
Curva de validación de eficiencia y curva de amplificación de *H2afv*



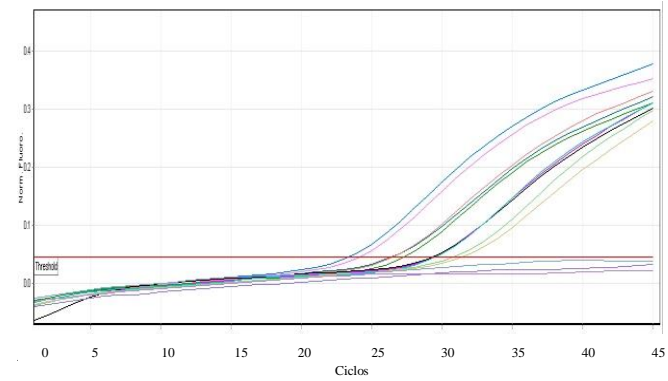
Pendiente: -3.38



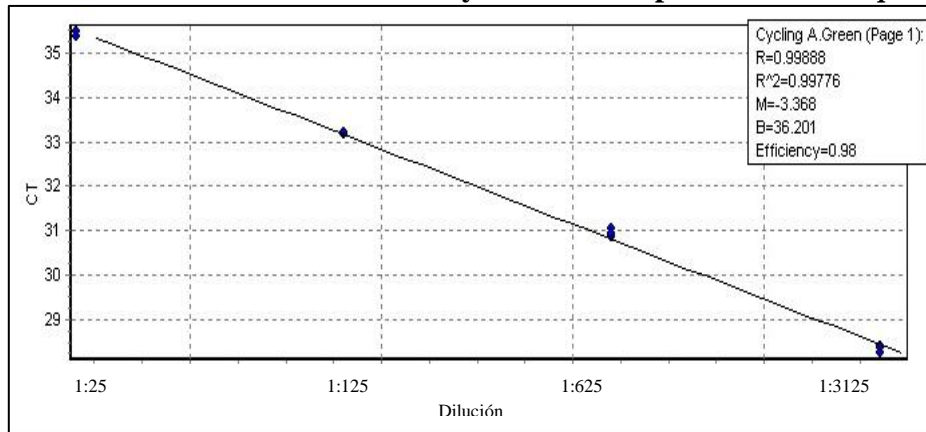
Curva de validación de eficiencia y curva de amplificación de β -actina



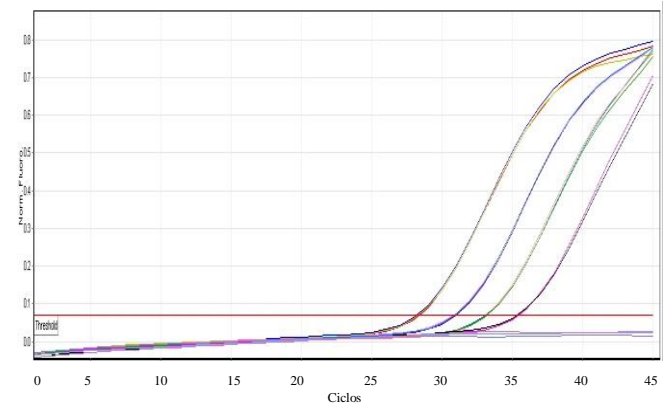
Pendiente: -3.57



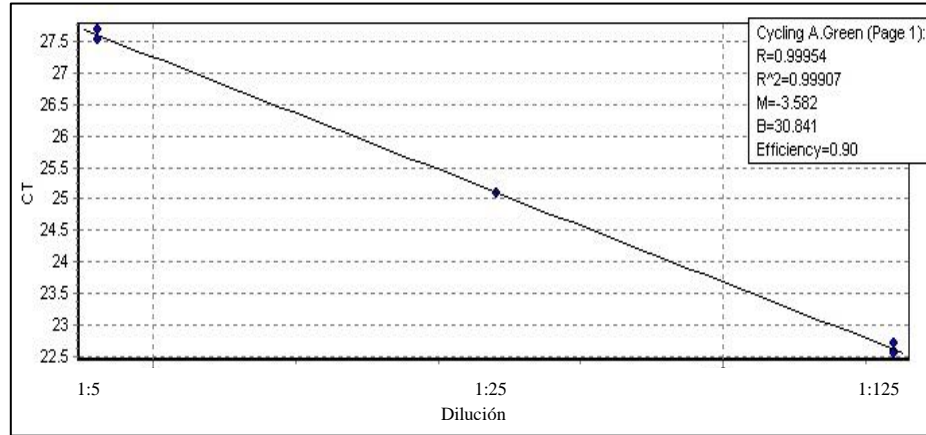
Curva de validación de eficiencia y curva de amplificación de Tbp



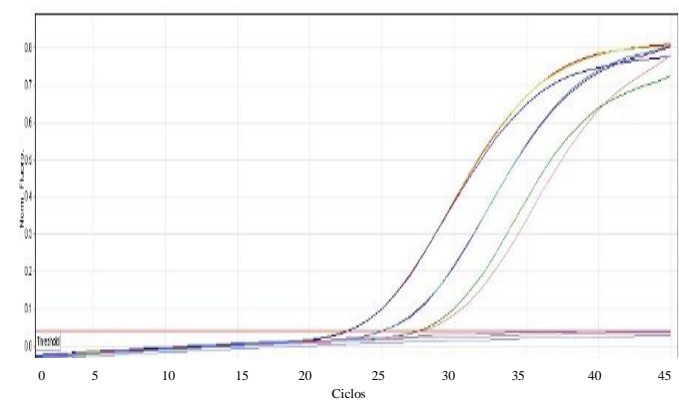
Pendiente: -3.36



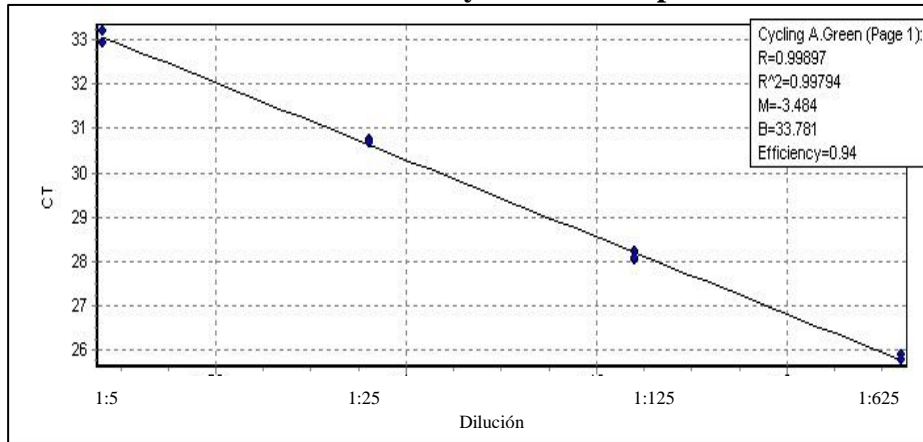
Curva de validación de eficiencia y curva de amplificación de *Tubulina*



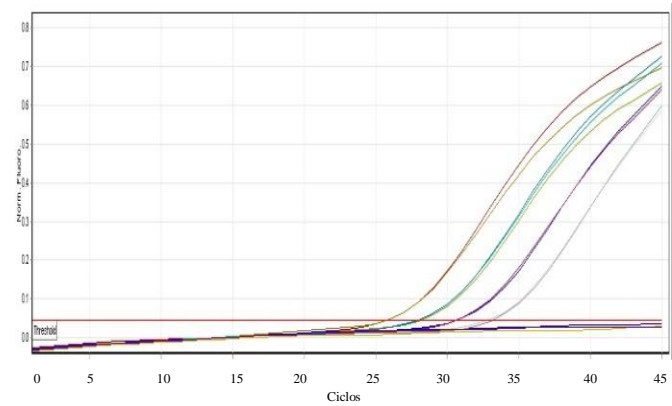
Pendiente: -3.58



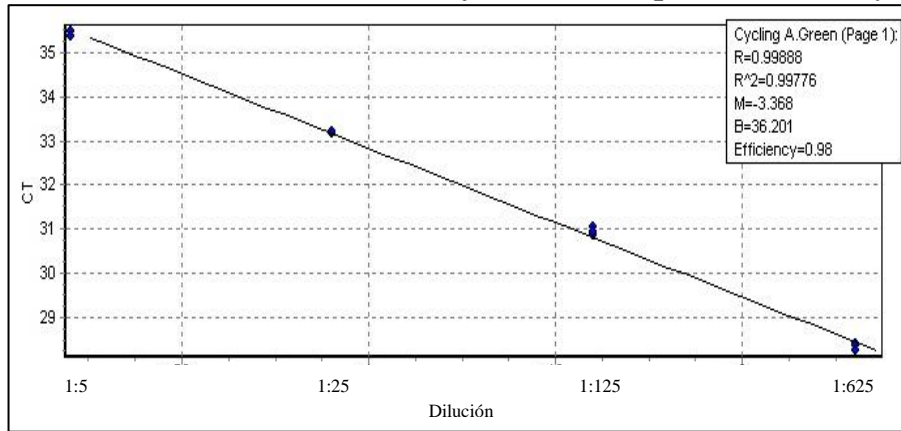
Curva de validación de eficiencia y curva de amplificación de *Per1*



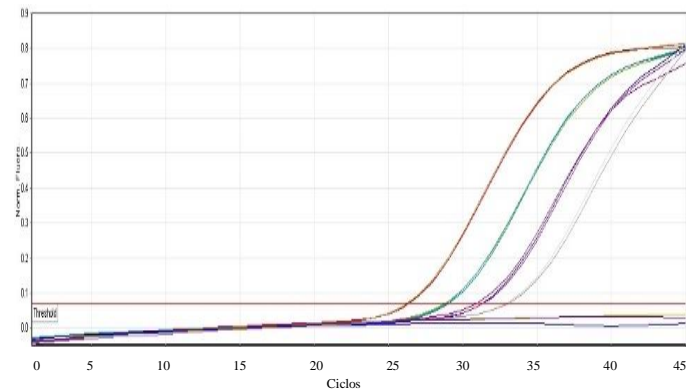
Pendiente: -3.48



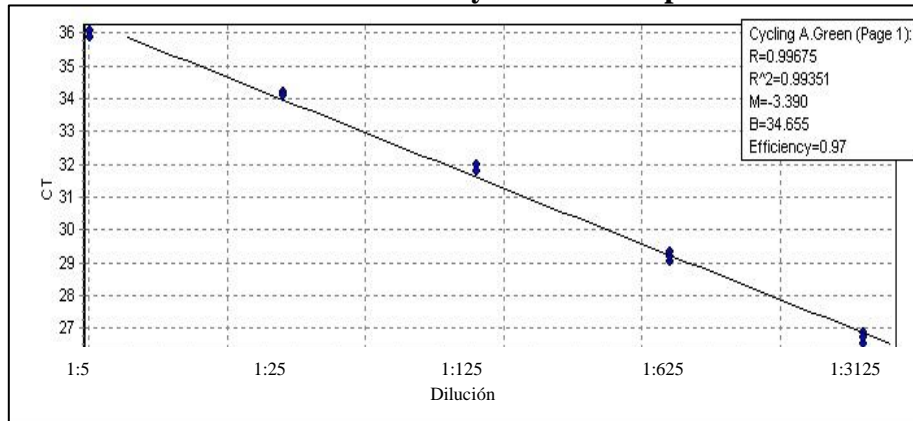
Curva de validación de eficiencia y curva de amplificación de *CryI*



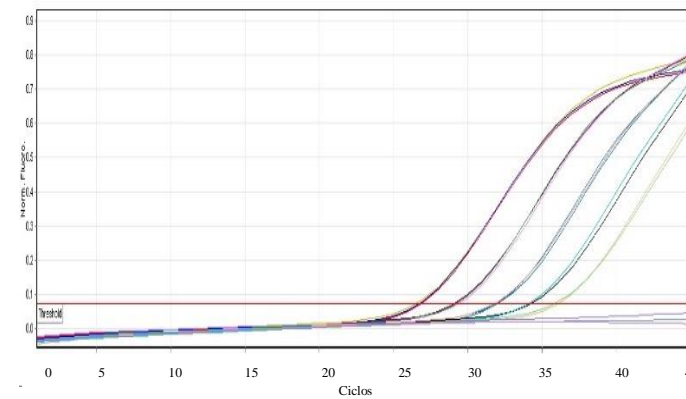
Pendiente: -3.36



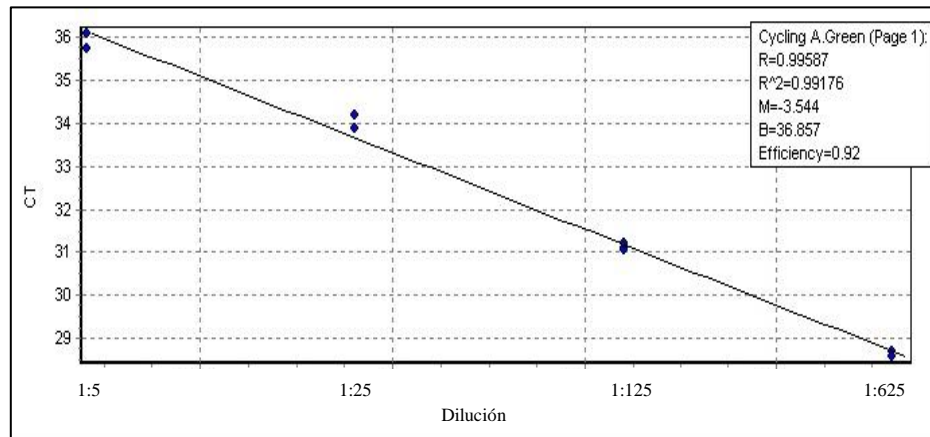
Curva de validación de eficiencia y curva de amplificación de *BmalI*



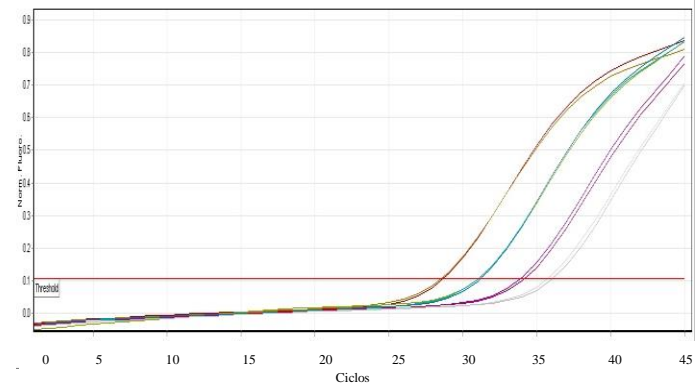
Pendiente: -3.39



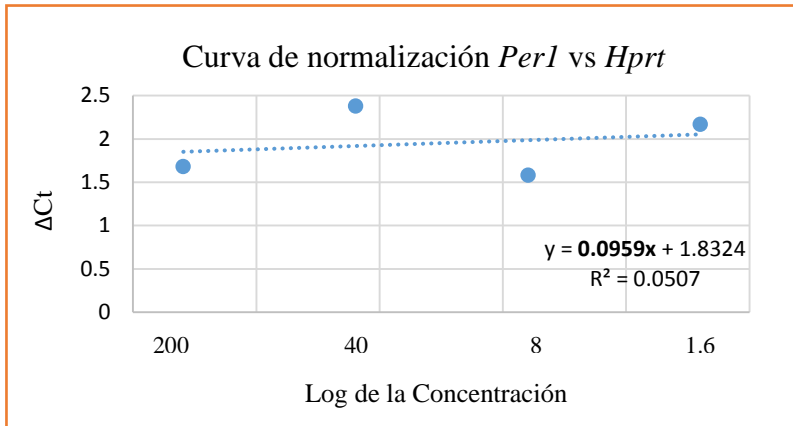
Curva de validación de eficiencia y curva de amplificación de *Clock*



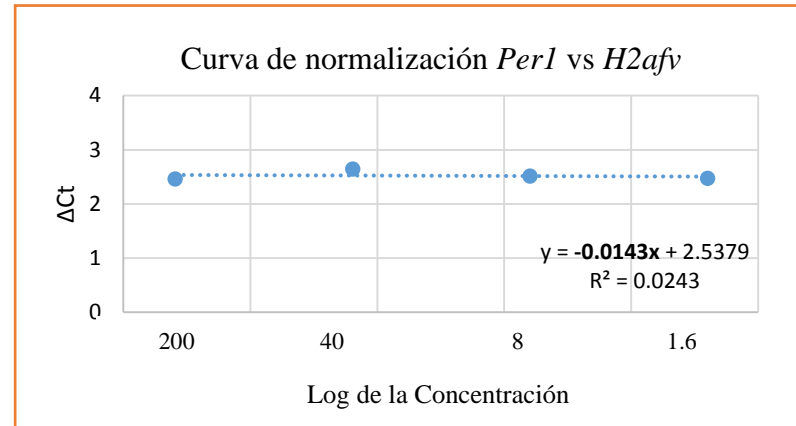
Pendiente: -3.55



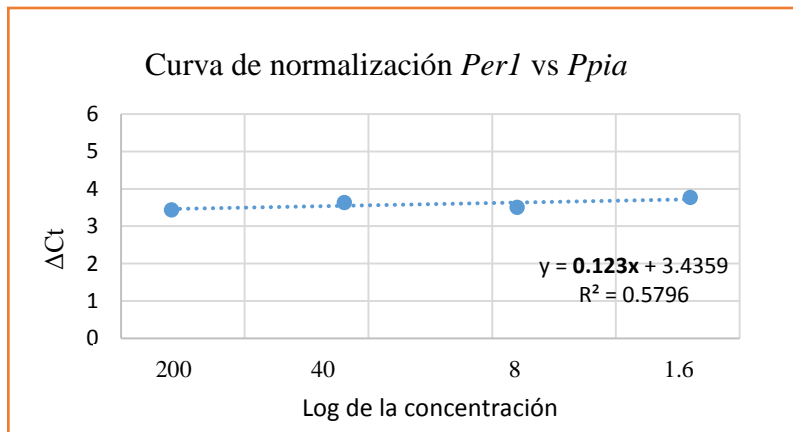
Anexo D. GRAFICAS DE NORMALIZACIÓN DE TODOS LOS GENES EN HIPOTÁLAMO



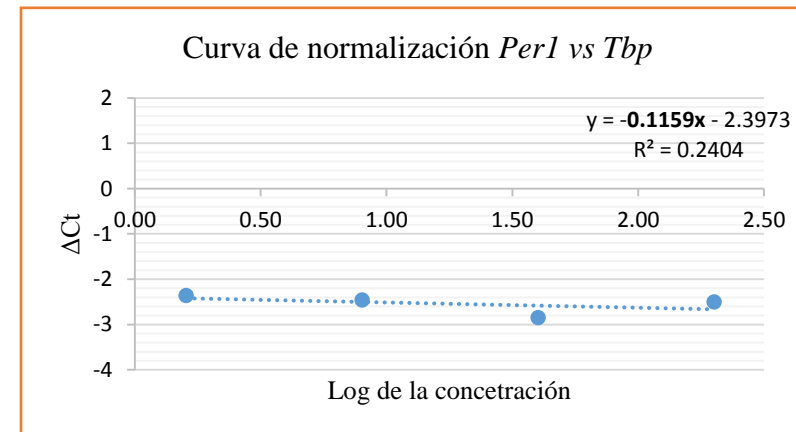
Pendiente: 0.09



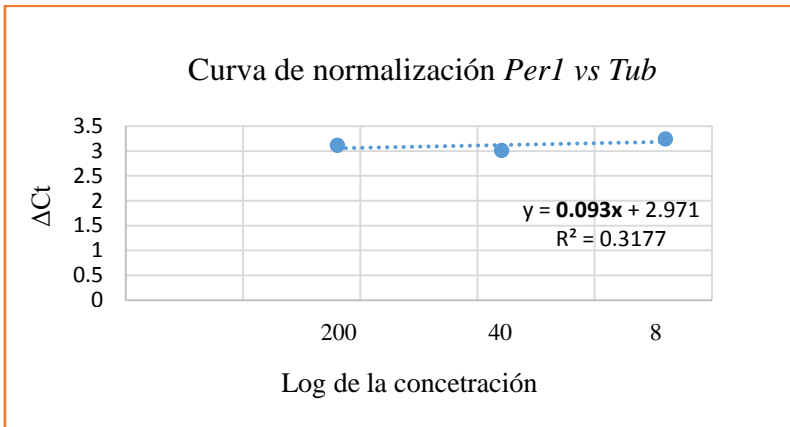
Pendiente: -0.01



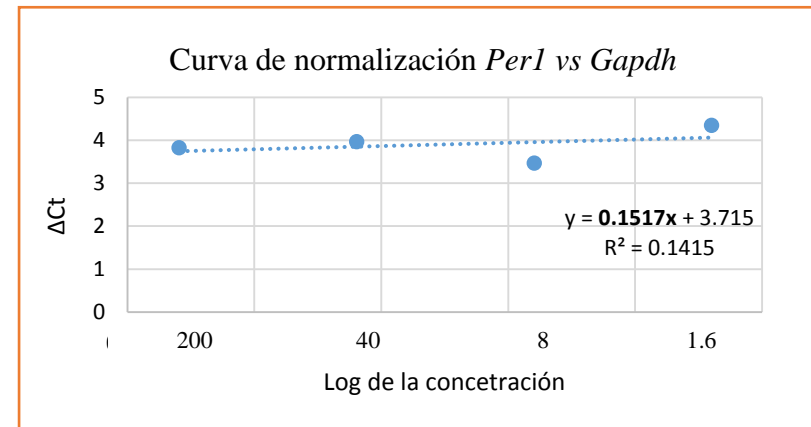
Pendiente: 0.12



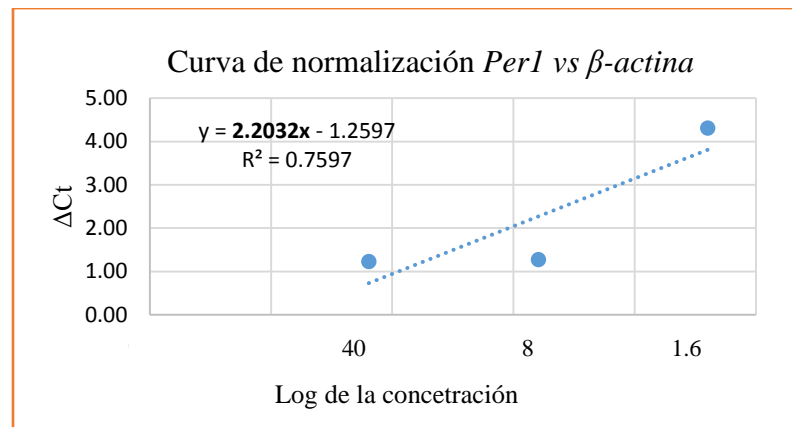
Pendiente: -0.11



Pendiente: 0.09

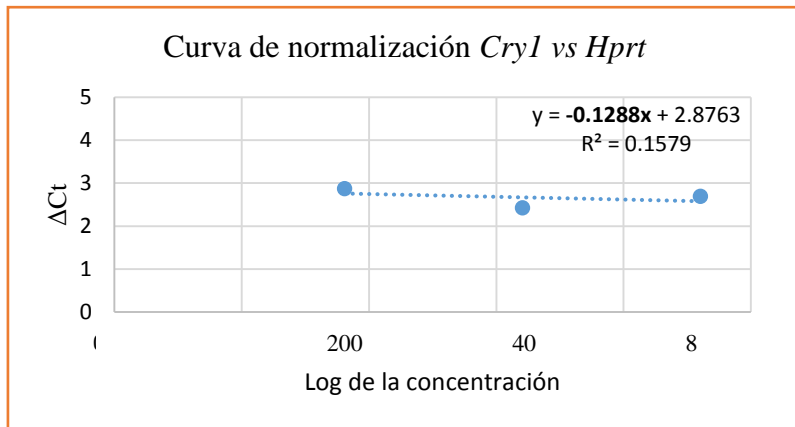


Pendiente: 0.15

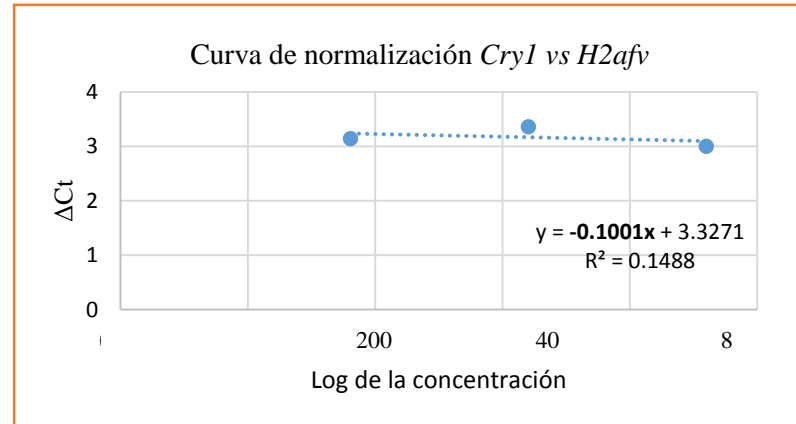


Pendiente: 2.20

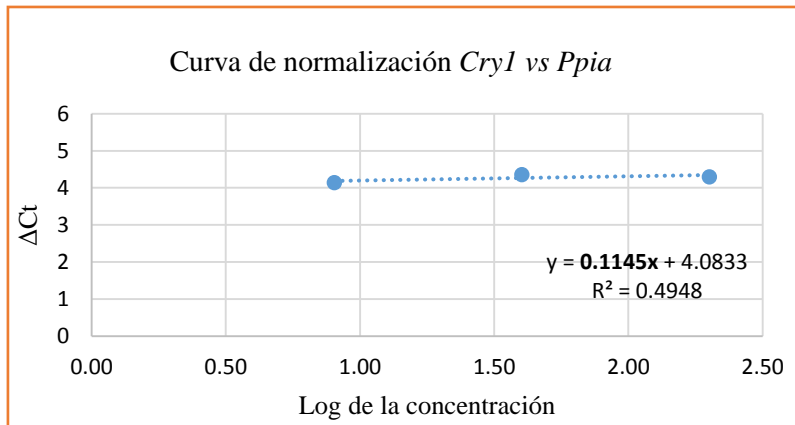
Curvas de normalización del gen blanco *Cry1*



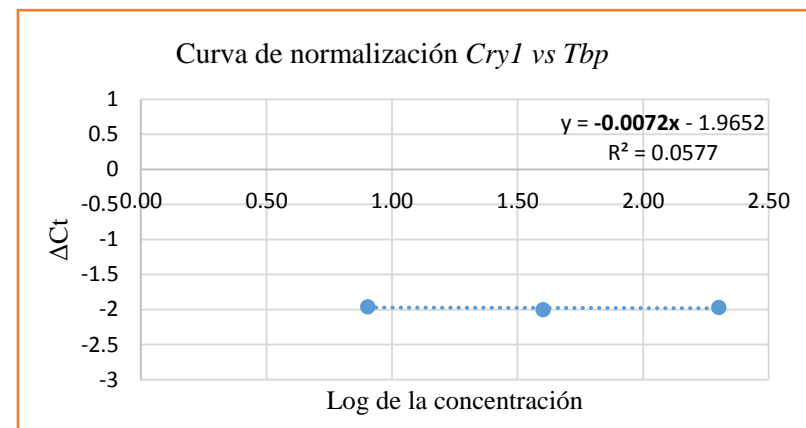
Pendiente: -0.12



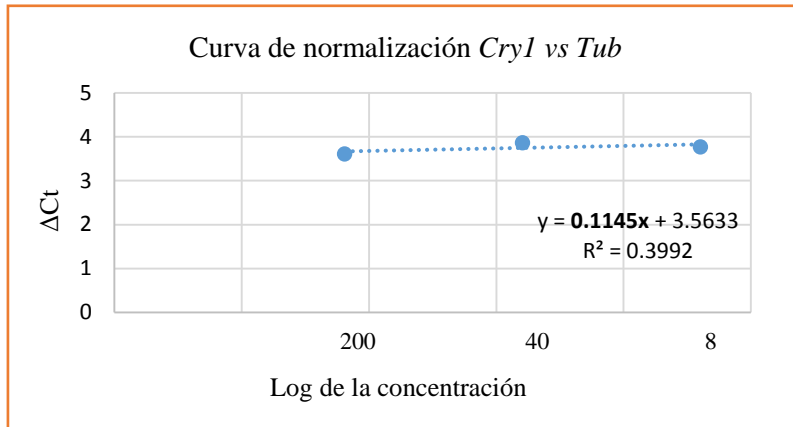
Pendiente: -0.10



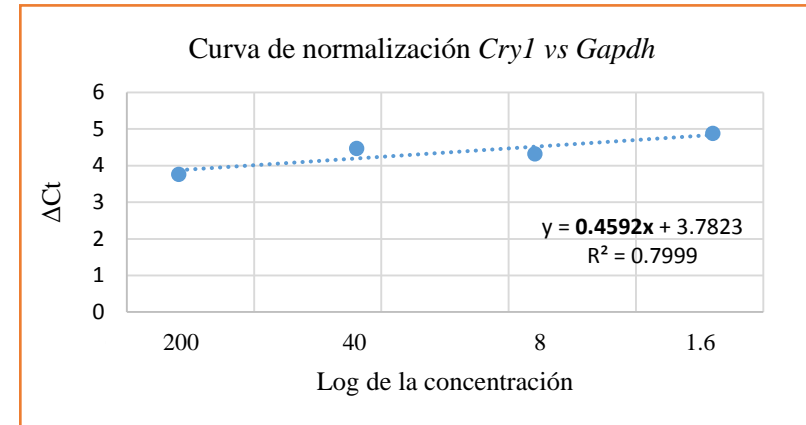
Pendiente: 0.11



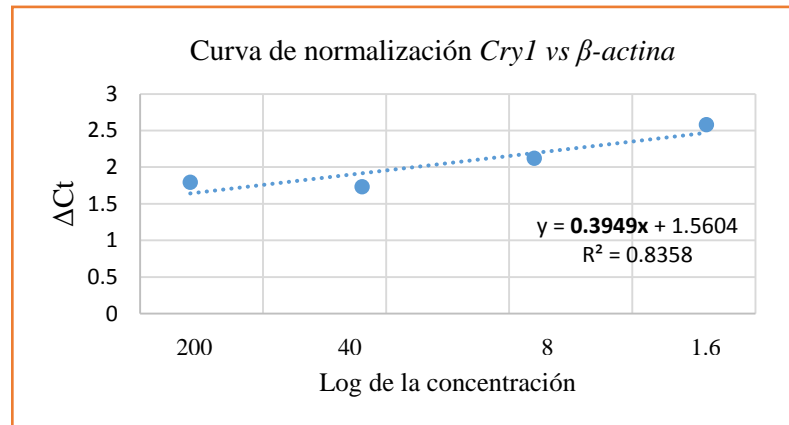
Pendiente: -0.007



Pendiente: 0.11

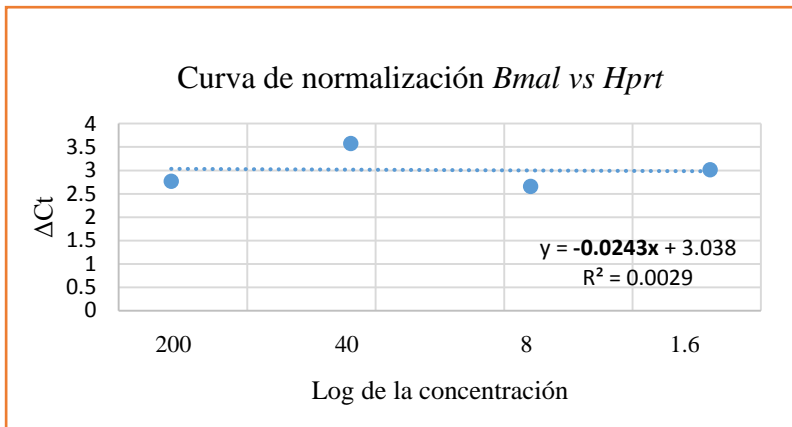


Pendiente: 0.45

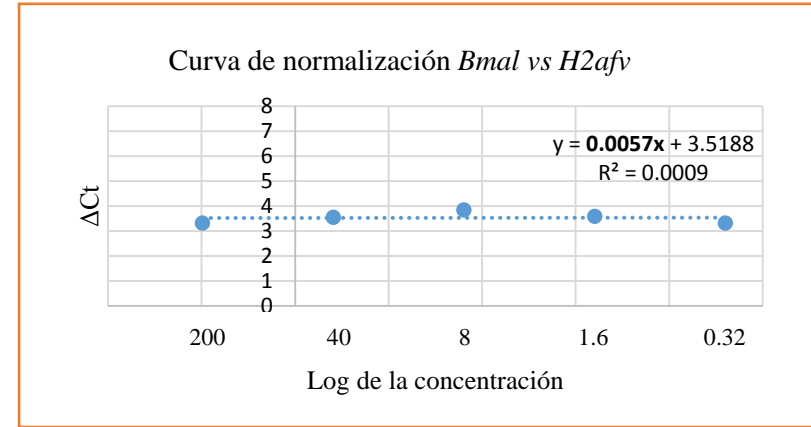


Pendiente: 0.39

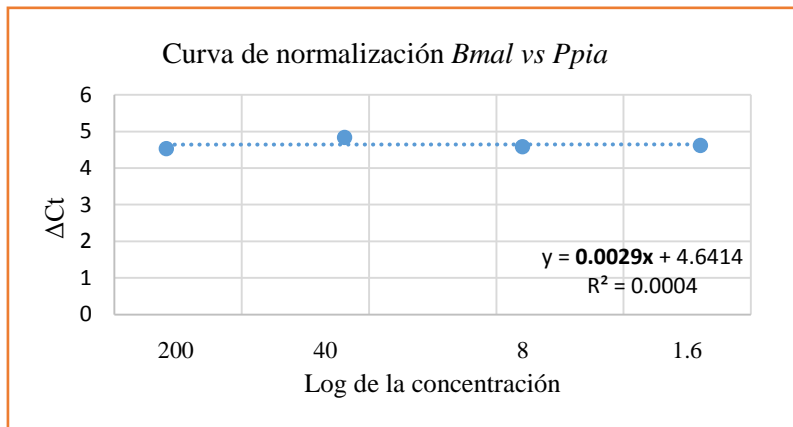
Curvas de normalización del gen blanco *Bmal*



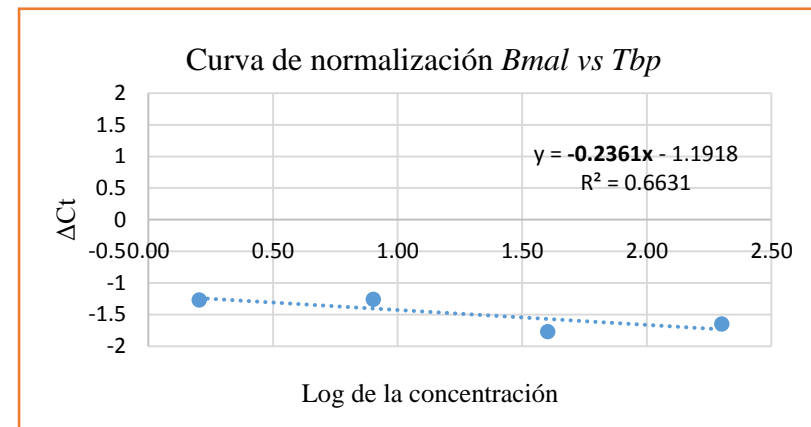
Pendiente: -0.02



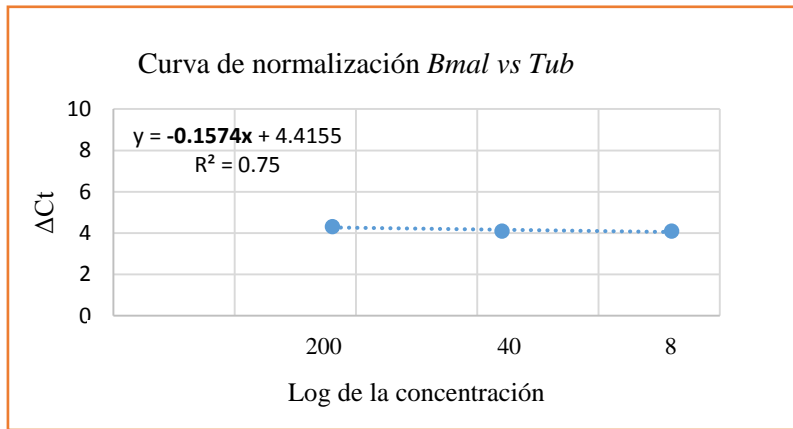
Pendiente: 0.005



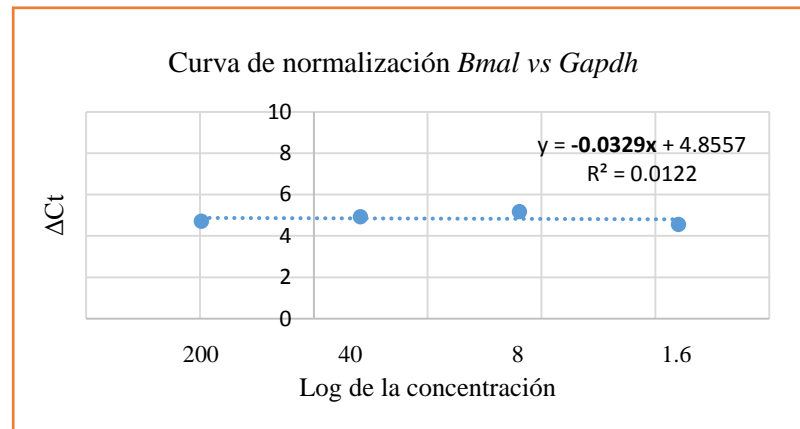
Pendiente: 0.002



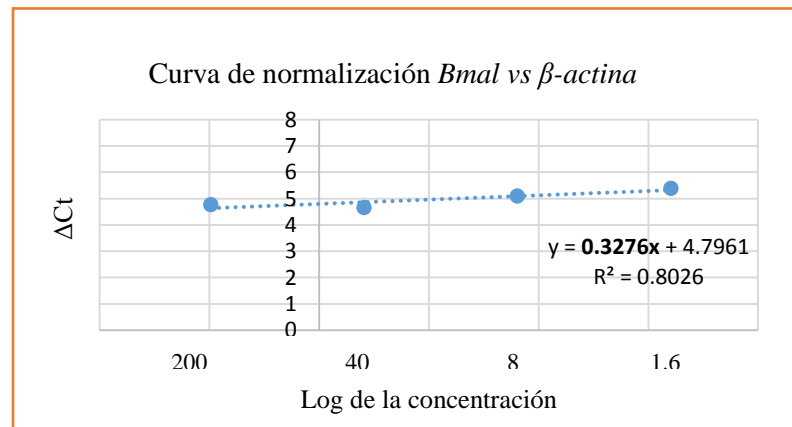
Pendiente: -0.23



Pendiente: -0.15

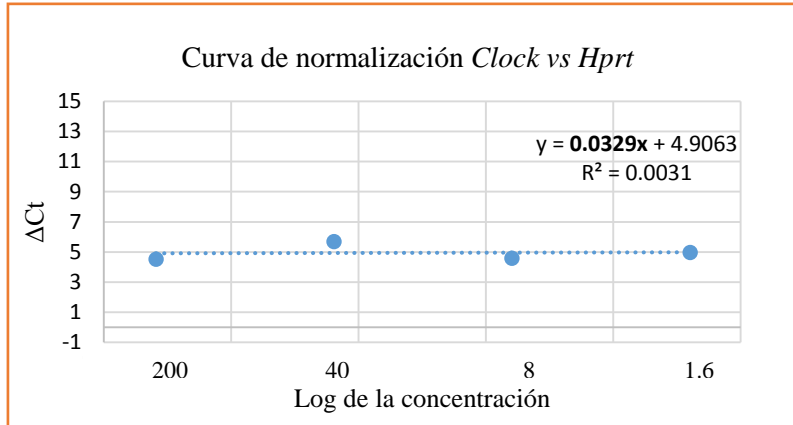


Pendiente: -0.03

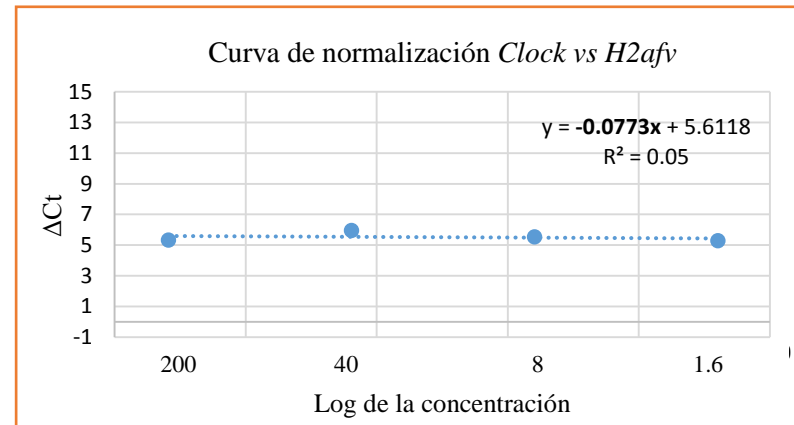


Pendiente: 0.32

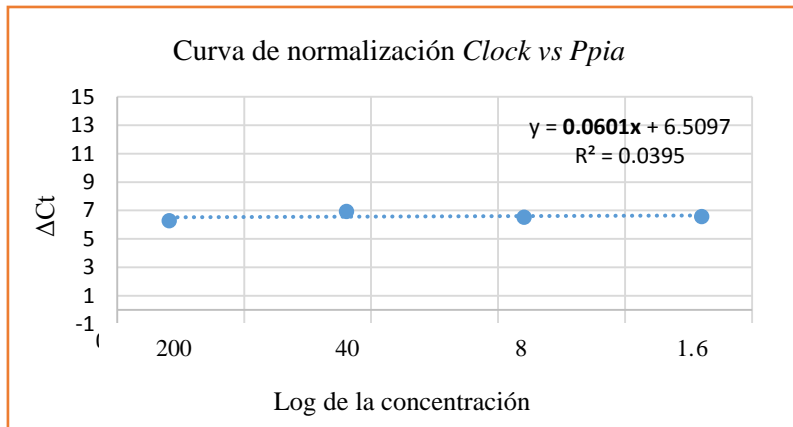
Curvas de normalización del gen blanco *Clock*



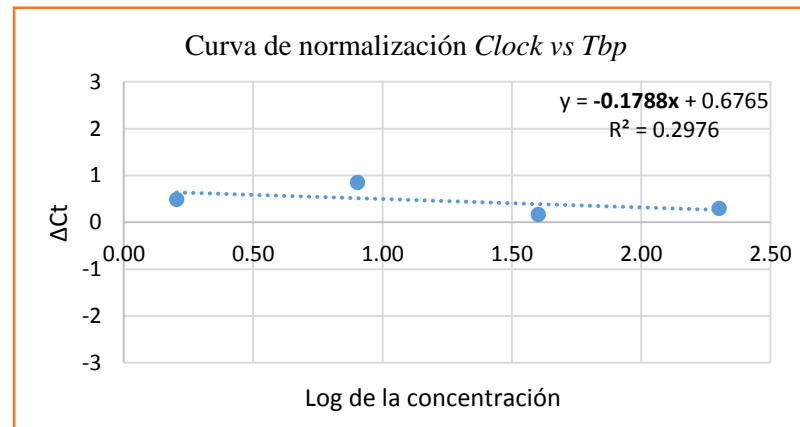
Pendiente: 0.03



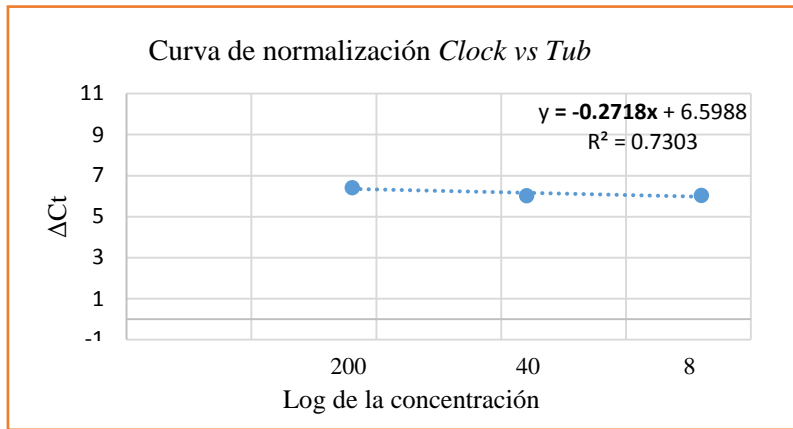
Pendiente: -0.07



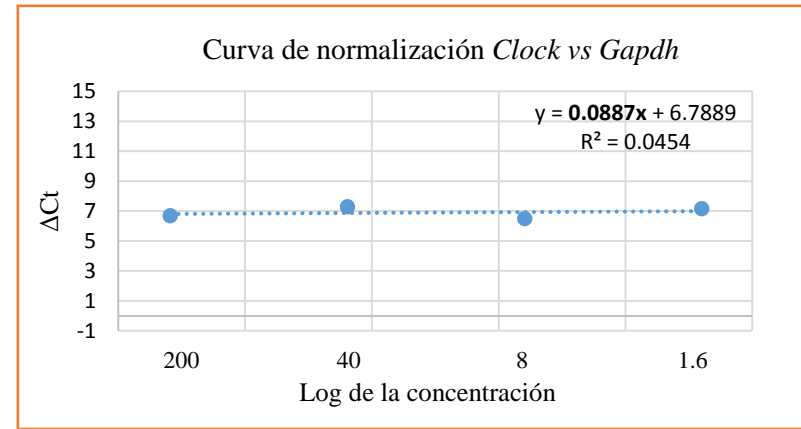
Pendiente: 0.06



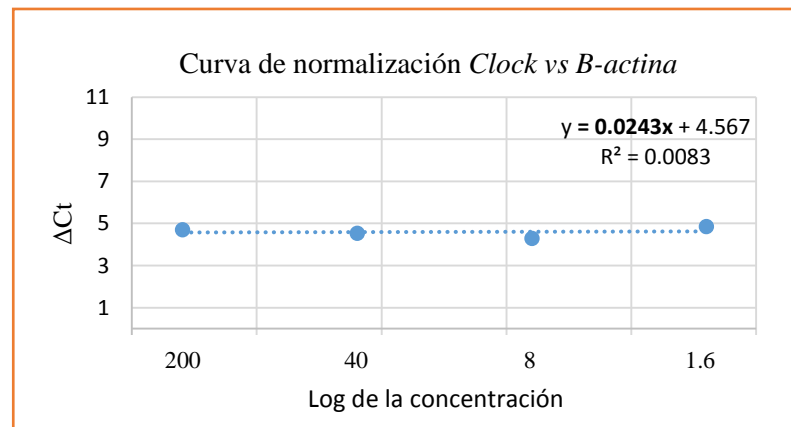
Pendiente: -0.17



Pendiente: -0.27



Pendiente: -0.08



Anexo E. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LOS GENES DE REFERENCIA POR *NORMFINDER* EN HIPOTÁLAMO.

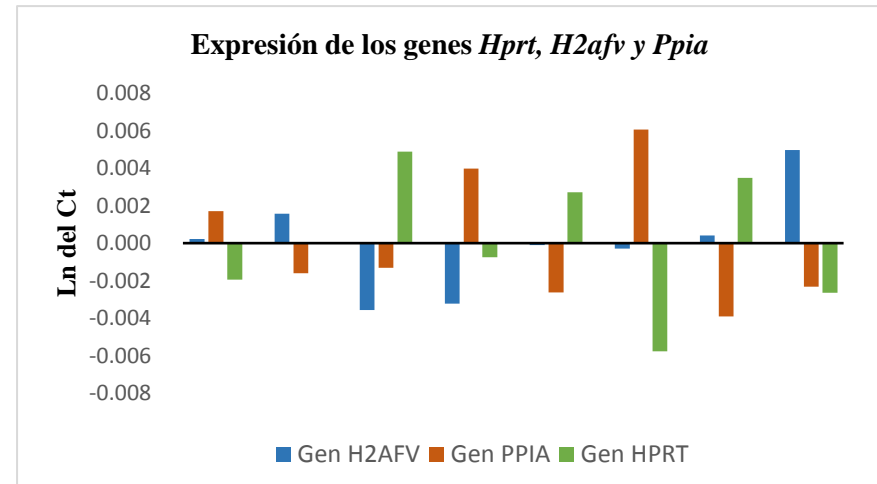
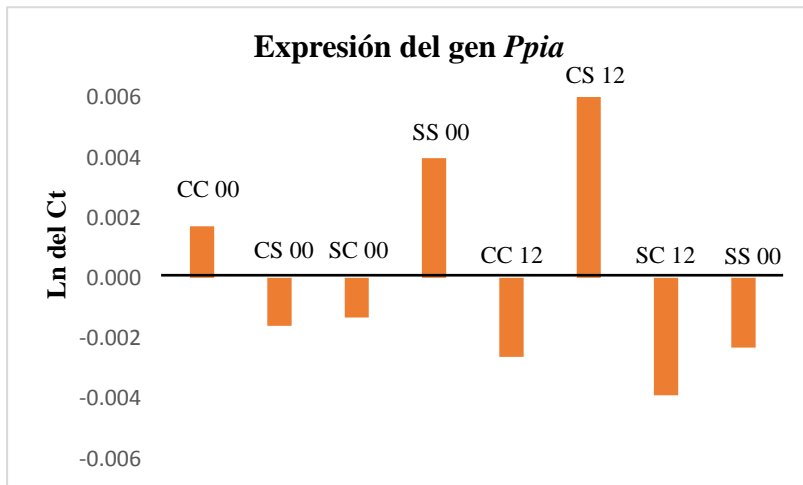
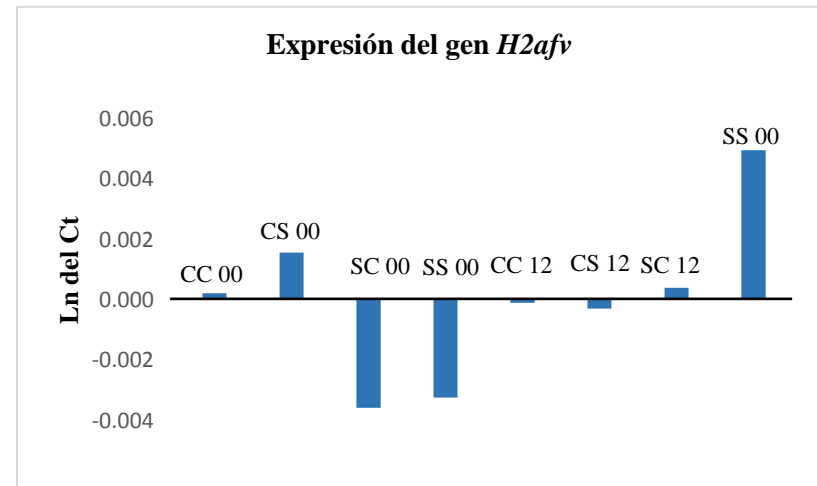
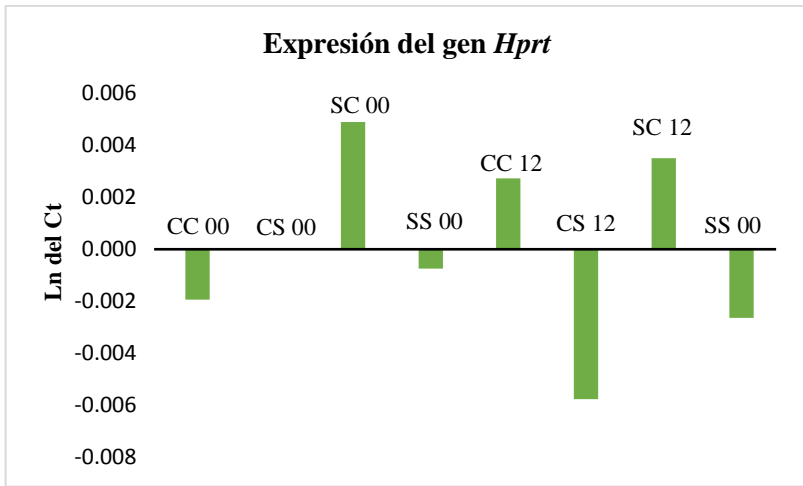
<i>Nombre del gen</i>	<i>Valores de estabilidad NormFinder</i>
<i>H2afv</i>	0.0047
<i>Hprt</i>	0.0046
<i>Ppia</i>	0.0044
<i>Mejor combinación: Ppia y Hprt</i>	0.0033

Variación Intragrupos

Genes de referencia	CC ZT 00	CS ZT 00	SC ZT 00	SS ZT 00	CC ZT 12	CS ZT 12	SC ZT 12	SS ZT 12
Gen H2AFV	0.0000420	0.0000018	0.0000338	0.0000270	0.0001562	0.0000119	0.0000382	0.0000122
Gen PPIA	0.0000042	0.0000271	0.0000037	0.0000036	0.0000062	0.0000092	0.0000459	0.0000026
Gen HPRT	0.0000183	0.0000113	0.0000299	0.0000427	0.0000581	0.0000010	0.0000067	0.0000005

Variación Inter-grupo

Genes de referencia	CC ZT 00	CS ZT 00	SC ZT 00	SS ZT 00	CC ZT 12	CS ZT 12	SC ZT 12	SS ZT 12
Gen H2AFV	0.0002311	0.0015724	-0.0035672	-0.0032295	-0.0000935	-0.0002836	0.0004108	0.0049593
Gen PPIA	0.0017159	-0.0015955	-0.0013092	0.0039765	-0.0026268	0.0060554	-0.0039001	-0.0023161
Gen HPRT	-0.0019470	0.0000231	0.0048764	-0.0007470	0.0027202	-0.0057719	0.0034893	-0.0026432



Anexo F. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LOS GENES DE REFERENCIA POR *NORMFINDER* EN HÍGADO.

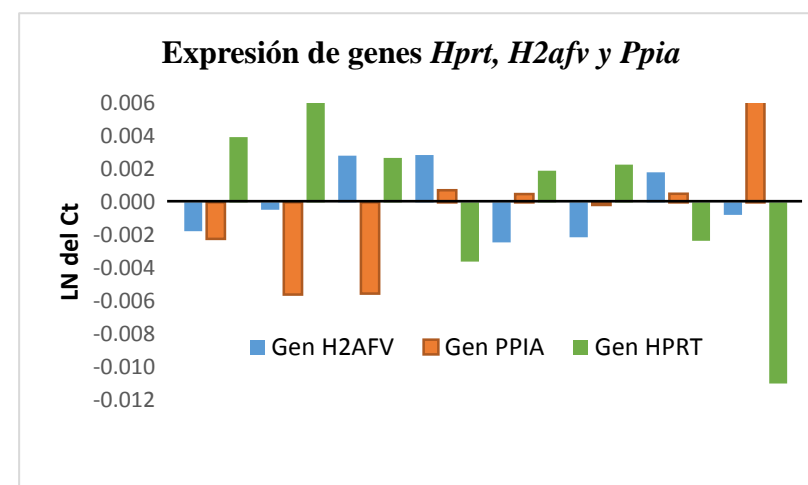
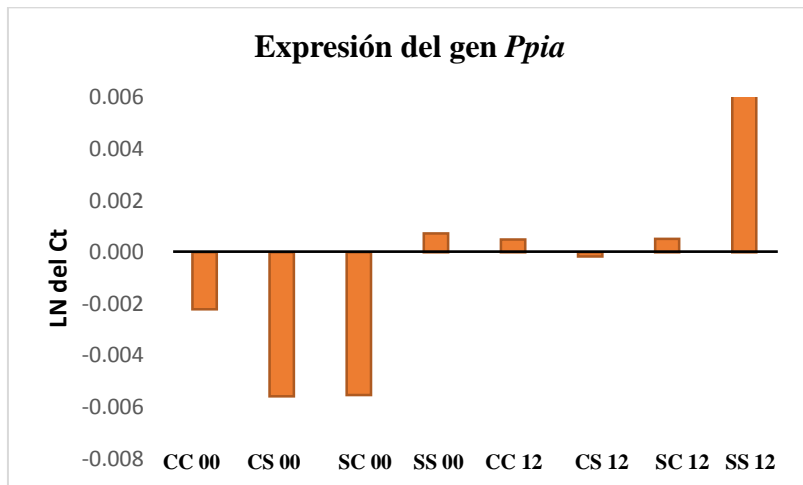
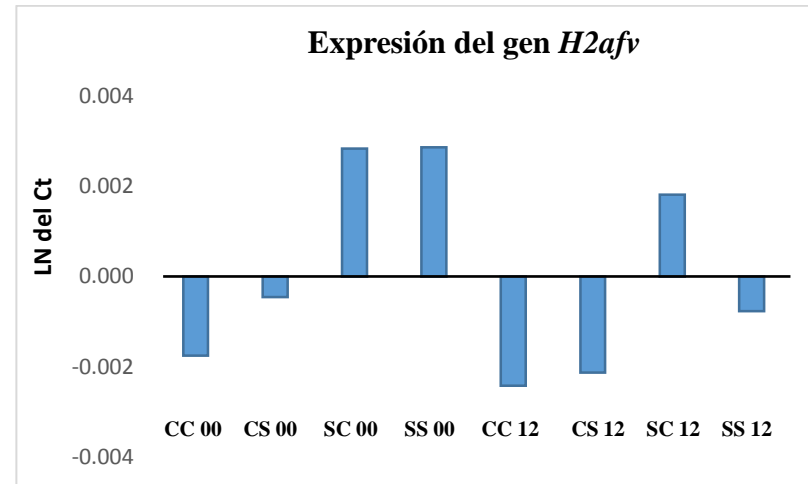
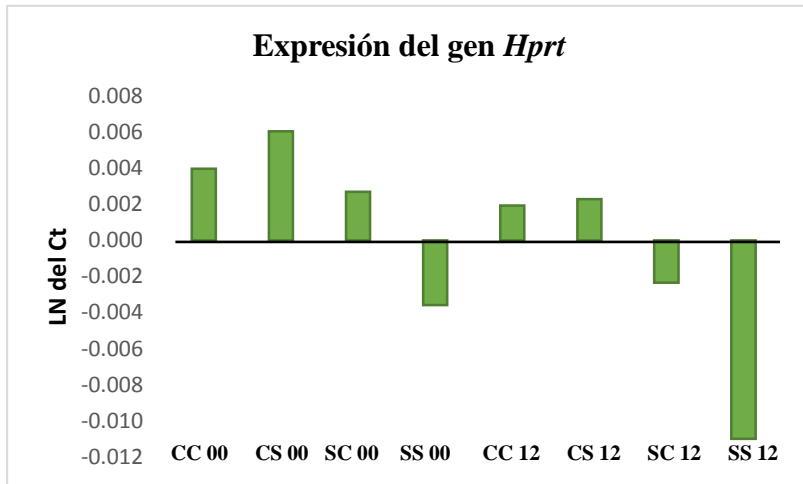
<i>Nombre del gen</i>	<i>Valores de estabilidad NormFinder</i>
<i>H2afv</i>	0.0047
<i>Hprt</i>	0.0072
<i>Ppia</i>	0.0061
<i>Mejor combinación: Ppia y Hprt</i>	0.005

Variación Intragrupos

Genes de referencia	CC ZT 00	CS ZT 00	SC ZT 00	SS ZT 00	CC ZT 12	CS ZT 12	SC ZT 12	SS ZT 12
Gen H2AFV	0.0000267	0.0000167	0.0000039	0.0001544	0.0000547	0.0000196	0.0000550	0.0000116
Gen PPIA	0.0000029	0.0000033	0.0000104	0.0000052	0.0002493	0.0000516	0.0000551	0.0000639
Gen HPRT	0.0002439	0.0000084	0.0000008	0.0000070	0.0003247	0.0000364	0.0000809	0.0000486

Variación Intergrupo

Genes de referencia	CC ZT 00	CS ZT 00	SC ZT 00	SS ZT 00	CC ZT 12	CS ZT 12	SC ZT 12	SS ZT 12
Gen H2AFV	-0.001749	-0.000455	0.002836	0.002860	-0.002419	-0.002123	0.001812	-0.000762
Gen PPIA	-0.002211	-0.005588	-0.005530	0.000727	0.000495	-0.000163	0.000523	0.011747
Gen HPRT	0.003960	0.006043	0.002694	-0.003587	0.001923	0.002286	-0.002334	-0.010985

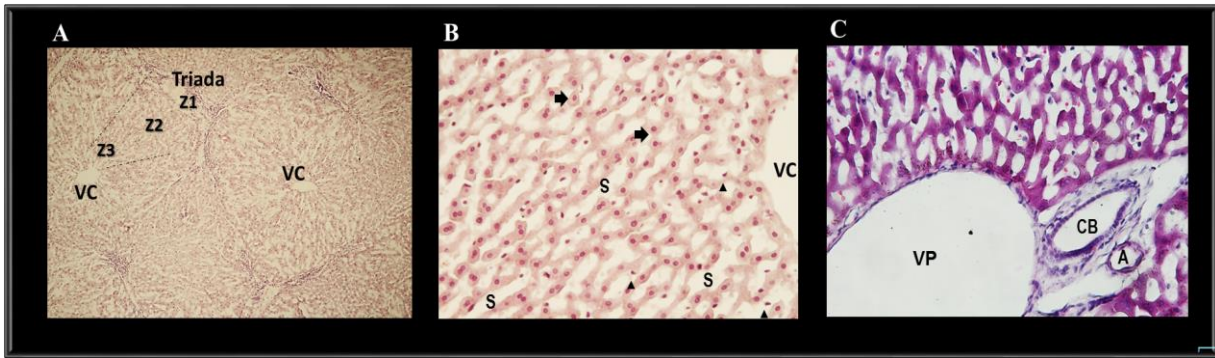


Anexo G. CÉLULAS HEPÁTICAS

El hígado está compuesta por células parenquimatosas uniformes, los hepatocitos, los cuáles conforman el 75% del peso de este órgano. Son células poligonales de 20-30 μm de diámetro y están dispuestos en lobulillos en forma de hexágonos de casi 2 mm de largo y 700 μm de diámetro. Los hepatocitos muestran variaciones en sus propiedades estructurales, histoquímicas y bioquímicas, según su localización dentro del lobulillo hepático. Este fenómeno es conocido como “heterogenicidad funcional” o “zonación metabólica” (Gebhard, 1992).

La organización microanatómica de la unidad funcional más pequeña del hígado, el acino o lobulillo hepático, se acompaña por una heterogenicidad funcional y estructural a nivel celular. La unidad es dividida en 3 zonas: La zona periportal (zona 1), la cual rodea los vasos aferentes y la triada portal esta recibe sangre rica en oxígeno y nutrientes resultantes de la absorción intestinal, así como hormonas gastrointestinales (insulina y glucagon) que tienen efectos sobre la regulación del metabolismo hepático; la zona intermedia (zona 2), la cual rodea la zona periportal y la zona más externa denominada perivenosa (zona 3).

Las zonas portales están dispuestas de tal manera que delimitan los lobulillos del tejido hepático. El lobulillo hepático tiene varios conductos portales en su periferia, y en su centro hay una vena central, tributaria de la vena cava inferior, a partir de la cual irradian las láminas de células parenquimatosas. Esta unidad estructural se repite miles de veces, con los vasos aferentes (vena porta y arteria hepática) en la periferia del lobulillo y los vasos eferentes (vena central) en el centro del mismo, por lo tanto, el flujo sanguíneo va de la periferia a la vena central, pasando por los conductos sinusoidales situados entre las láminas de células hepáticas. Las partes periféricas de un lobulillo (las más próximas a la vena porta y la arteria hepática) recibirán un mayor aporte de materiales alimenticios y oxígeno. Este aporte será menor en la zona central.



Representación esquemática de la unidad microanatómica del hígado, el acino o lobulillo hepático en cortes histológicos de 7 μ m de grosor de conejos Chinchilla. (A) Cada acino se presenta de una forma hexagonal (b) con hileras de hepatocitos que radian desde la vena central (VC) y las hileras entre los hepatocitos se le conocen como espacios sinusoidales (S). A intervalos regulares del acino hepático, (c) se encuentran las triadas portales, las cuales están conformadas por una rama de arteria hepática (A), la vena portal (VP) y el conducto biliar (CB). En el acino hepático los hepatocitos pueden ser divididos en 3 zonas: periportal (Z1), intermedia (Z2) y perivenosa (Z3). Gradientes de algunas vías metabólicas como la gluconeogénesis, glicólisis, metabolismo de xenobioticos, lipogénesis se presentan a lo largo del eje. Las flechas señalan los hepatocitos.

El hígado, es considerado el órgano central en el sostén del suministro de energía, ya que:

1. Está implicado en la homeóstasis de glucosa, tomándola durante la alimentación y liberándola durante la postabsorción.
2. Está implicado en la homeóstasis de lípidos, produciendo cuerpos cetónicos como sustratos alternativos de energía para el cerebro durante una inanición prolongada.
3. Además, el hígado cataliza procesos biosintéticos, biodegradativos y excretorios de los productos finales del metabolismo.

Debido a la función de los gradientes de sustratos y enzimáticos de una zona a la otra, la mayoría de las funciones hepáticas muestran diferencias en la actividad dentro de las zonas periportales y pericentrales.

La heterogenicidad zonal del parénquima hepático es dinámica, lo que permite la adaptación a períodos prolongados de alteraciones en el metabolismo. Por lo tanto, es posible modificar la zonación de un subconjunto de funciones hepáticas por un cambio en la dirección del flujo sanguíneo (Kinugasa et al, 1986), lo cual invierte la concentración del gradiente de oxígeno y metabolitos a través del hígado. El reloj local hepático regula la expresión de varias enzimas esenciales para el metabolismo de los nutrientes básicos, en la síntesis y eliminación de productos endógenos y exógenos, tales como hormonas esteroideas, fármacos y ácidos biliares.

Distribución zonal (periportal o pericentral) de algunas funciones metabólicas presentes en el acino hepático

HEPATOCITOS PERIPORTALES.	HEPATOCITOS PERICENTRALES
Metabolismo oxidativo (Ciclo de Krebs, fosforilación oxidativa).	Captación de glucosa (glicólisis, síntesis de glucógeno vía directa, glucogenólisis a lactato y ciclo de las pentosas).
Salida de glucosa (gluconeogénesis, síntesis de glucógeno desde lactato y aminoácidos por vía indirecta, glucogenólisis).	Metabolismo de aminoácidos (formación de glutamina)
Metabolismo de aminoácidos (Captación de aminoácidos, aminoácido oxidasa, ureogénesis de amonio intestinal, ureogénesis de aminoácidos).	Metabolismo de lípidos (lipogénesis de novo, formación y secreción de VLDL, formación de Acetil CoA).
Metabolismo de lípidos (oxidación de ácidos grasos, síntesis de colesterol, formación de ácidos biliares, conversión de acetato a Acetil CoA).	

La expresión génica es heterogénea dentro del acino hepático, además de que responde a una variedad de señales que son diferentes en el tejido periportal y pericentral, las cuáles se han verificado por estudios bioquímicos e histoquímicos. Además, las principales funciones hepáticas como son el control y/o la síntesis de metabolitos sanguíneos críticos como la glucosa, lipoproteínas, ácidos grasos libres, cuerpos cetónicos, aminoácidos, hormonas, factores de crecimiento y mediadores de respuesta de fase aguda muestran variaciones circadianas. Además, la ritmicidad hepática es principalmente sincronizada por el acceso y procesamiento del alimento.