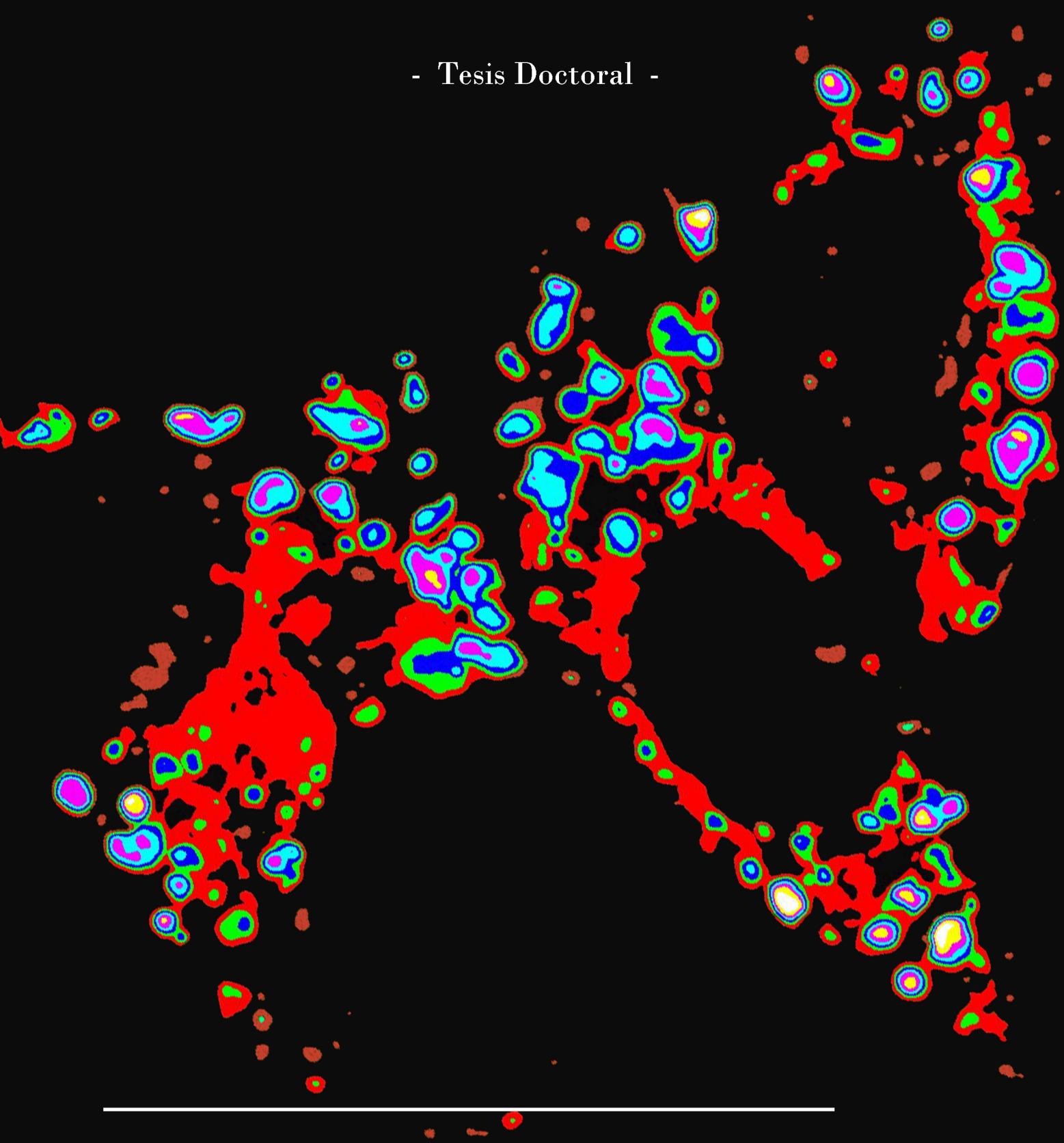


- Tesis Doctoral -



Estudios sobre la maquinaria molecular del reloj
y la regulación circadiana del metabolismo lipídico
en células de hepatocarcinoma humano

Natalia Monjes | 2022

Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas

**ESTUDIOS SOBRE LA MAQUINARIA MOLECULAR DEL
RELOJ Y LA REGULACIÓN CIRCADIANA DEL METABOLISMO
LIPÍDICO EN CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HUMANO.**

Tesista: Lic. Natalia Monjes

Director: Dr. Mario Eduardo Guido

Departamento de Química Biológica Ranwel Caputto

Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba, CIQUIBIC-CONICET

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba

- 2022 -

Comisión evaluadora de la tesis:

- **Dr. Gastón Ramiro Soria (miembro de la comisión asesora)**. Investigador independiente de CONICET. Empresa de base tecnológica, OncoPrecision.

- **Dr. Juan Pablo Nicola (miembro de la comisión asesora)**. Investigador independiente de CONICET. Centro de Investigación en Bioquímica Clínica e Inmunología, CIBICI -CONICET. Facultad de Ciencias Químicas – Universidad Nacional de Córdoba.

- **Dr. Eduardo Garbarino Pico (miembro de la comisión asesora)**. Investigador adjunto de CONICET. Departamento de Química Biológica Ranwel Caputto, Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba, CIQUIBIC -CONICET. Facultad de Ciencias Químicas – Universidad Nacional de Córdoba.

- **Dra. Ana Ves Losada (evaluadora externa)**. Investigadora adjunta de CONICET. Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata "Prof. Dr. Rodolfo R. Brenner", INIBIOLP-CONICET. Universidad Nacional de La Plata.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a la **Facultad de Ciencias Químicas** de la Universidad Nacional de Córdoba por brindarme el espacio para realizar mi carrera de posgrado. A **CONICET**, **FONCyT** y **SECyT** por el financiamiento para llevar a cabo esta tesis.

A los Dres. Gastón Soria, Juan Pablo Nicola y Eduardo Garbarino Pico por formar parte de mi **Comisión Asesora** de tesis, por su asesoramiento y seguimiento durante estos años de formación doctoral. Y a la Dra. Ana Ves Losada por aceptar ser evaluadora externa de mi trabajo. En especial quiero agradecerle Gastón por haber confiado en mí, por motivarme, por darme la posibilidad de seguir creciendo y aprendiendo a tu lado, y sobre todo por ayudarme a reconectar con una parte de mí que creía perdida.

A Mario, mi **director**, por confiar en mí desde un principio y por la formación humana y profesional que me brindaste. Gracias por tu inigualable paciencia, por tu calidez humana y por siempre tener una palabra de aliento en los momentos que más lo necesitaba.

A toda la **CIQUI-gente** por estar siempre dispuestos a ayudar y colaborar. Realmente es un instituto donde las puertas de cada laboratorio están abiertas y facilita muchísimo el trabajo día a día. En este sentido en especial quiero darles las gracias a los labos de Marta, Beti, Ali y María Ana, y sobre todo a Merce, Manu, Cesar, Lau y Bella, que fueron las personitas a las que más recurrí. Además, quiero agradecer muy especialmente a todo el personal de apoyo por su ayuda silenciosa en muchos casos, pero indispensable: Carlitos, Susi, Gabi, Pilar, Ceci, Dani, Lau, Gime, Rosita y Romi. Y un especial agradecimiento también a mi querida parienta Piti, gracias por la paciencia y tu buena energía cada vez que te iba a molestar con los datos de facturación ajaj.

A todos mis compis del **Guido's lab** (and Co jajajaja), anteriores y actuales, Paulita, Max, Nati, Merce, Manu, Geri, Choa, Meli, Luis y Nico por esos mates compartidos que tanto extraño. Sin dudas el día a día en el lab sin ustedes no hubiesen sido lo mismo. Gracias, gracias, gracias y mil veces gracias sobre todo a vos Paulita, que fuiste en muchos sentidos mi guía y ejemplo durante todos estos años de doctorado.

A mis **amigos**, mis indispensables. A mis **amigas del cole** Flor y Vero que a pesar del tiempo y ahora también la distancia pudimos seguir construyendo esta hermosa amistad y siempre estuvieron pendientes de mis pasos académicos y dancísticos desde el comienzo. A mis **amigos de la facu** Lau, Agus, Javi, Nani, Dal y Guadi. Sin duda algo invaluable que me regaló la vida y mi paso por la facu de Ciencias Químicas fueron estas personitas con las que compartimos taaaantas horas de estudio, pero también tantas otras de risas y amistad. Un *gracias* muy especial para vos

Euti, no solo por tu amistad sincera sino también por ser un gran guía y consejero en esta aventura del doctorado. Y sobre todo quiero agradecerte a vos Lau, mi amiga y hermana del alma, porque como bien sabes a pesar de la distancia fuiste un apoyo incondicional durante este proceso de doctorado y te lo agradezco infinitamente. Quiero agradecer también a mis nuevos **compis en OP** que a pesar del poco tiempo que nos conocemos estoy muy contenta por tener la oportunidad de seguir creciendo al lado de tan lindas personas y tan buenos profesionales. Sobre todo, un *gracias* muy especial a mi team STT Ale, Lia y Meli por su apoyo en este último tramo del doctorado. Y por último como no agradecerles a mis **amigos dancísticos**, a mis Mulier's y a mis queridísimos amigos y alumnos Acheros, porque durante estos años de doctorado encontré en ustedes y la danza el equilibrio que necesitaba para sentirme completa y en armonía. Gracias por ser mi cable a tierra en mi día a día.

A mi **familia** por ser parte de mi vida y acompañarme desde el principio en cada paso, cada logro y cada tropiezo. A mis abuelos Rita, Yoli, Italo y Monquechito en especial por mimarme siempre y por su amor sin límites. A mis papas Sandra y Sergio por su apoyo incondicional aun cuando no compartían o no lograban entender mis motivaciones. Y sobre todo gracias por enseñarme con su ejemplo la importancia de la responsabilidad, el compromiso y el valor del esfuerzo en todo lo que decida emprender en mi vida. A mi hermano querido Fran, por siempre brindarme tu cariño tan puro y sincero, y por enseñarme que la vida puede ser tan compleja como simple, depende como decidamos vivirla.

A Mati mi **compañero**, mi complemento y amor de mi vida. No tengo palabras para agradecerte lo suficiente todo lo que significaste para mí durante este doctorado. Como siempre decimos, a veces las palabras están de más, sobre todo cuando sabes perfectamente a lo que me refiero si te digo que sos y fuiste mi sostén incondicional. Vos y sólo vos sabes con certeza lo mucho que crecí durante este desafío. Gracias por ser mi compañero de aventuras.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	3
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
HIPÓTESIS	10
OBJETIVOS	11
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	12
I. RITMOS BIOLÓGICOS	12
II. EL SISTEMA CIRCADIANO	13
El reloj molecular	15
El reloj metabólico	19
III. EL RELOJ CIRCADIANO Y EL METABOLISMO	20
Loops accesorios de NAD ⁺ /NADH, AMPK, CK1, SIRT1	20
Receptores nucleares: REV-ERB, ROR, PPAR y PGC-1 α	21
Ritmos ultradianos de 12 horas	25
IV. METABOLISMO LIPÍDICO	26
Membranas biológicas	31
Biosíntesis de glicerofosfolípidos	34
Los lípidos en el metabolismo celular	36
Los lípidos en la homeostasis hepática	42
V. REGULACIÓN CIRCADIANA DEL METABOLISMO LIPÍDICO	43
Regulación del metabolismo de ácidos grasos	44
Regulación de la biosíntesis de glicerofosfolípidos	45
VI. DISRUPCIÓN CIRCADIANA, METABOLISMO Y CÁNCER	47
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	50
I. MANTENIMIENTO DE CULTIVOS CELULARES	50

II. DISRUPCIÓN DE BMAL1 POR CRISPR-CAS9	51
III. TRATAMIENTO CON SR9009 Y SOBREVIDA CELULAR	51
IV. SINCRONIZACIÓN DE CULTIVOS CELULARES	52
V. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS Y AMPLIFICACIÓN POR PCR	53
VI. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT	54
VII. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOFLUORESCENCIA	56
VIII. DETERMINACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO POR CITOMETRÍA DE FLUJO	56
IX. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO	57
X. DETERMINACIÓN DE GLICEROFOSFOLÍPIDOS POR CROMATOGRAFÍA EN PLACA FINA	57
XI. DETERMINACIÓN DEL PERFIL LIPÍDICO POR HPLC-MS	58
XII. TINCIÓN DE GOTAS LIPÍDICAS CON NILE RED	58
XIII. CUANTIFICACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS Y LACTATO	59
XIV. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	59
XV. ANÁLISIS PERIÓDICOS CON METACYCLE	60
CAPÍTULO III: RESULTADOS.....	61
I. MODELO DE ESTUDIO Y DESCRIPCIÓN CIRCADIANA	61
II. RITMOS EN LA BIOSÍNTESIS DE NOVO Y ALMACENAMIENTO LIPÍDICO	65
III. DISRUPCIÓN CIRCADIANA Y SU RELACIÓN CON EL METABOLISMO LIPÍDICO	68
IV. ANÁLISIS PERIÓDICO DE LOS DATOS. METACYCLE	87
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	92
Discusión	92
Conclusiones	96
BIBLIOGRAFÍA	99
ABREVIATURAS	122

RESUMEN

El hígado es un órgano crucial para la fisiología como integrador metabólico y centro regulador de la homeostasis lipídica y energética, ya que participa en el metabolismo de los triglicéridos (TG) y los glicerofosfolípidos (GFL). Diferentes factores pueden causar trastornos metabólicos que promueven una acumulación anormal de lípidos en orgánulos llamados gotas lipídicas (GLs) causando esteatosis hepática, que es la manifestación del síndrome metabólico, y que puede progresar a carcinoma hepatocelular (HCC), la neoplasia maligna hepática más común en todo el mundo. La vida moderna (trabajo por turnos rotativos, *jet-lag* crónico, trabajos nocturnos, exposiciones prolongadas a luces artificiales en horarios nocturnos, etc.) implica condiciones que afectan el normal funcionamiento del reloj biológico causando trastornos metabólicos y un mayor riesgo de cáncer. El hígado contiene un sistema circadiano, al igual que otros órganos y tejidos e incluso líneas celulares inmortalizadas derivadas de este órgano, que regula los ritmos transcripcionales y metabólicos, controlando así temporalmente diversos procesos. El reloj molecular está conformado por genes reloj (*BMAL1*, *PER1/2*, *REV-ERB*) y controla la expresión rítmica de muchos otros llamados genes controlados por reloj (Colina Quinasa, *CHOK*). Se desconoce al presente el funcionamiento del reloj celular en células hepáticas tumorales y la implicancia del reloj molecular sobre el metabolismo lipídico y bioenergético en estas células, y su perfil oscilatorio. Hemos descrito previamente en estudios in vivo en hígado de ratones, y en distintos modelos celulares bajo condiciones fisiológicas, que el metabolismo de GFLs se encuentra estrechamente regulado por el reloj circadiano, en particular la síntesis de fosfatidilcolina (PC) y de su enzima reguladora colina Quinasa (CHOK), como así también distintas aciltransferasas y fosfatidato fosfohidrolasa 1 (PAP1). En este trabajo investigamos en células HepG2, una línea celular derivada del HCC, los ritmos metabólicos y su vínculo con el reloj circadiano en condiciones control (B-WT) y en condiciones donde el reloj molecular ha sido dañado (disrupción de *BMAL1*, B-D) mediante la tecnología del CRISPR/Cas9. En las células B-WT mantenidas en condiciones de proliferación (con suero) y sincronizadas con dexametasona (DEX), se observaron ritmos autosostenidos en la expresión de las enzimas involucradas en la biosíntesis de glicerolípidos *CHOKα* (ARNm y proteína), *PCYT2* (citidil transferasa de fosfatidiletanolamina (PE)) y *PAP1*, y en el metabolismo de los GFLs más abundantes (PC y PE), TG y contenido de GLs. Por el contrario, luego de la disrupción del reloj circadiano (modelo B-D), todo el metabolismo hepático se vio severamente alterado con una reducción significativa en el contenido de PC, TG y GLs, así como en los ritmos de *CHOKα* (ARNm y proteína) y otras enzimas del metabolismo lipídico. Los resultados sugieren un estrecho vínculo entre el reloj molecular y el metabolismo lipídico, como se aprecia en células B-D que exhiben una marcada alteración en el almacenamiento y síntesis de lípidos al igual que en el metabolismo energético, como consecuencia de la disrupción de *BMAL1*. Esto pone de manifiesto que un reloj funcional continúa operativo en células tumorales en proliferación, lo que las vuelve susceptibles a perturbaciones y de este modo afectar su metabolismo.

ABSTRACT

The liver is a crucial organ to physiology as a major metabolic integrator and a central hub for lipid and energy homeostasis, being involved in triglyceride (TG) and glycerophospholipid (GPL) metabolism. Different factors may cause metabolic disorders promoting an abnormal lipid accumulation in organelles called lipid droplets (LDs) causing hepatic steatosis- which is the metabolic syndrome manifestation, and it can progress to a human hepatocellular carcinoma (HCC), the most common primary liver malignancy worldwide. Modern life (shift work, jetlag, etc.) involves conditions that disrupt the biological clock causing metabolic disorders and higher cancer risk. A circadian clock is present in the liver and in immortalized cell lines, and temporally regulates physiological processes by driving transcriptional and metabolic rhythms. A molecular clock drives the expression of clock genes (*BMAL1*, *PER1/2*, *REV-ERB*) and clock-controlled genes (Choline Kinase, *CHOK*) along 24 h. At present, little is known about the functioning of the biological clock in tumor hepatic cells and the link between the molecular clock and the lipid metabolism and oscillatory profiles. We have previously described that the synthesis of GPLs is tightly controlled by the circadian clock in the murine liver in vivo and immortalized cell lines under physiological conditions, mainly for PC the most abundant GPL and its regulatory enzyme *CHOK*, as well as other acyltransferases and phosphatidate phosphohydrolase (*PAP1*). Here we investigated in HepG2 cells, a HCC-derived cell line, kept under proliferation and synchronized with dexamethasone (DEX), metabolic rhythms and their link with the circadian clock in control (B-WT) and *BMAL1*-knocked down (B-D) cells having the molecular clock disrupted by CRISPR/Cas9. In B-WT cells rhythms in expression of lipid synthesizing enzymes *CHOK α* (mRNA and protein), *PCYT2* and *PAP1*, and in the metabolism of particular GPLs (phosphatidylcholine PC and phosphatidylethanolamine PE), TGs, and LD content were observed. By contrast, when the circadian clock was disrupted (B-D model), the whole hepatic metabolism was severely altered with a significant damping in TGs and LD content as well as in rhythms of *CHOK α* (mRNA and protein) and other enzymes. The results suggest a close link between the molecular clock and the lipid metabolism, which exhibits an alteration in lipid storage and synthesis and energy metabolism in B-D cells, as a consequence of *BMAL1* disruption. This shows that a functional clock continues to operate in proliferating tumor cells, which makes them susceptible to disturbances and thus affect their metabolism.

HIPÓTESIS

En los últimos tiempos se ha encontrado importante evidencia en torno a la conexión existente entre el reloj biológico y el metabolismo lipídico. Numerosos estudios ponen de manifiesto un mayor índice de obesidad, síndrome metabólico, diabetes, hipertensión, entre otras que se agrupan en lo que se denomina “síndrome metabólico”, al igual que una mayor predisposición a cáncer en personas expuestas a situaciones que de algún modo perturben de manera crónica al reloj biológico interno (*jet-lag*, dietas hipercalóricas, trabajos nocturnos, iluminación artificial continua; entre otros). Incluso existen varios estudios en modelos animales donde se evidencian perturbaciones a nivel metabólico luego de eliminar genes particulares que codifican para proteínas reloj. A su vez, a nivel molecular se conocen varios puntos de interacción entre el reloj molecular y proteínas/enzimas implicadas en el metabolismo lipídico, las cuales presentan una actividad y/o acumulación dependiente del tiempo. En lo que respecta a la homeostasis lipídica, la síntesis de varios lípidos fundamentales como los ácidos grasos, triglicéridos y lipoproteínas es llevado a cabo por el hígado, por lo cual es considerado un órgano metabólicamente fundamental. La perturbación de estos procesos puede desencadenar un síndrome metabólico que entre otros aspectos está acompañado de una acumulación excesiva de lípidos en el hígado, conocido como esteatosis o “hígado graso”. Un desbalance lipídico de este tipo a nivel hepático puede progresar hasta un carcinoma hepatocelular el cual, como todo contexto tumoral, implica una proliferación aberrante y exacerbada que a su vez requiere un metabolismo lipídico activo para abastecer tanto el requerimiento energético como la biosíntesis de membrana. Con toda esta evidencia se puede hipotetizar que células tumorales, particularmente células de hepatocarcinoma humano (HepG2) crecidas en condiciones proliferativas, presentarían ritmos en la expresión de sus genes reloj y un metabolismo lipídico muy activo y en estrecha relación con el reloj biológico. De este modo, sería de esperar que si estas células se mantienen en condiciones proliferativas presenten variaciones temporales en la biosíntesis y/o acumulación de lípidos. Una manera de abordar esta hipótesis de trabajo sería mediante la interrupción del reloj molecular; de esta manera, se podrían registrar cambios metabólicos o no como consecuencia de la interrupción y poner de manifiesto si existe o no una interacción entre ambos sistemas. Este abordaje además arrojaría indicios sobre cómo este desequilibrio circadiano podría resultar favorable o contraproducente en un contexto tumoral.

OBJETIVOS

El **objetivo general** de la presente tesis consistió en investigar el funcionamiento de la maquinaria molecular del reloj en células de hepatocarcinoma humano (HepG2) proliferantes y sincronizadas, y su relación con el metabolismo lipídico.

Objetivos Específicos

Para abordar este objetivo general se procedió llevar a cabo los siguientes Objetivos Específicos:

- Determinar si el reloj de células tumorales HepG2 es funcional en condiciones de proliferación.
- Analizar si en células HepG2 mantenidas en proliferación presentan variaciones temporales u oscilaciones en el metabolismo lipídico, especialmente en el de glicerofosfolípidos.
- Discernir si el reloj circadiano regula el metabolismo lipídico en células tumorales HepG2 mantenidas en proliferación.

Estos estudios pretenden poner de manifiesto si se conserva intacto o no el mecanismo intrínseco del reloj molecular y si existe un control circadiano activo en la expresión génica y el metabolismo lipídico de células de hepatocarcinoma que las convierta en un blanco terapéutico más susceptible en determinados horarios del día. Además, permitirán ahondar en el conocimiento de cómo una célula tumoral hepática sujeta a un ciclo proliferativo aberrante regula su metabolismo y funcionamiento celular en el tiempo. Asimismo, la posibilidad de elucidar probables mecanismos de control y regulación de células neoplásicas desde un punto de vista cronobiológico ofrecerá una potencial y novedosa herramienta terapéutica a fin de establecer posibles ventanas temporales más efectivas para los tratamientos destinados a eliminar células malignas.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

I. RITMOS BIOLÓGICOS

Todos los organismos vivos, incluyendo los humanos, se han adaptado a través de la evolución a ambientes cambiantes para asegurar y optimizar su existencia. La vida en la tierra constituye un contexto de cambios cíclicos, siendo los ciclos de luz y oscuridad uno de ellos. Estos ciclos están dados por la rotación de la tierra sobre su eje y da lugar a días de 24 h con fases de luz y oscuridad conocidos como día y noche respectivamente, que presentan variaciones no solo en la intensidad de la luz y la temperatura que esto supone, sino también en la duración de cada fase dependiendo de la altitud, latitud y la estación del año. Este entorno cambiante significó una presión selectiva a lo largo de la evolución que fomentó la adaptación de un sistema interno en los organismos vivientes que les permitiera anticiparse a estos ciclos diarios que ocurrían en su medio ambiente. Es así como existen procesos fisiológicos y de comportamiento como los ciclos de sueño y vigilia o los patrones de alimentación y el metabolismo energético, que exhiben ritmos de aproximadamente 24 h. También se conocen variaciones a lo largo del día en la temperatura corporal, los niveles hormonales (melatonina y cortisol), la presión sanguínea, la eficiencia cardiovascular y la fuerza muscular, entre otras. Estos ritmos están temporalmente coordinados por el *sistema circadiano* que deriva su denominación del latín *circa*: “cerca” y *dies*: “día” [1]. Los patrones temporales de aproximadamente 24 h formados a partir de este sistema se denominan *ritmos circadianos*, y se caracterizan por ser generados de manera endógena, es decir que el organismo puede mantener estos ritmos aun cuando se encuentre en condiciones ambientales constantes y sin estímulos periódicos del medioambiente como son los ciclos de luz y oscuridad, por ejemplo, en “corrida libre” como se lo conoce en la jerga cronobiológica [1][2]. Tal es así que, si una persona se encuentra encerrada en un lugar cerrado a oscuras, mantendrá sus ciclos de sueño y vigilia, al igual que sus patrones de alimentación diarios. Algo similar se observa en lugares del planeta donde, debido a su localización, poseen meses enteros de luz y otros de oscuridad. Incluso en estos contextos el sistema circadiano continúa generando de manera endógena patrones temporales a nivel fisiológico y de comportamiento.

Una característica importante de los ritmos circadianos es que son susceptibles a sincronización, es decir que si bien se generan de manera endógena no constituyen un sistema cerrado, sino que son capaces de censar señales externas y adaptarse a ellas. El sistema circadiano entonces posee la función de coordinar la fisiología del organismo con los cambios en su medio ambiente. Se supone que este mecanismo permite asegurar la adaptabilidad y optimizar la utilización de energía. Las señales sincronizantes más fuertes que se conocen son los ciclos de luz

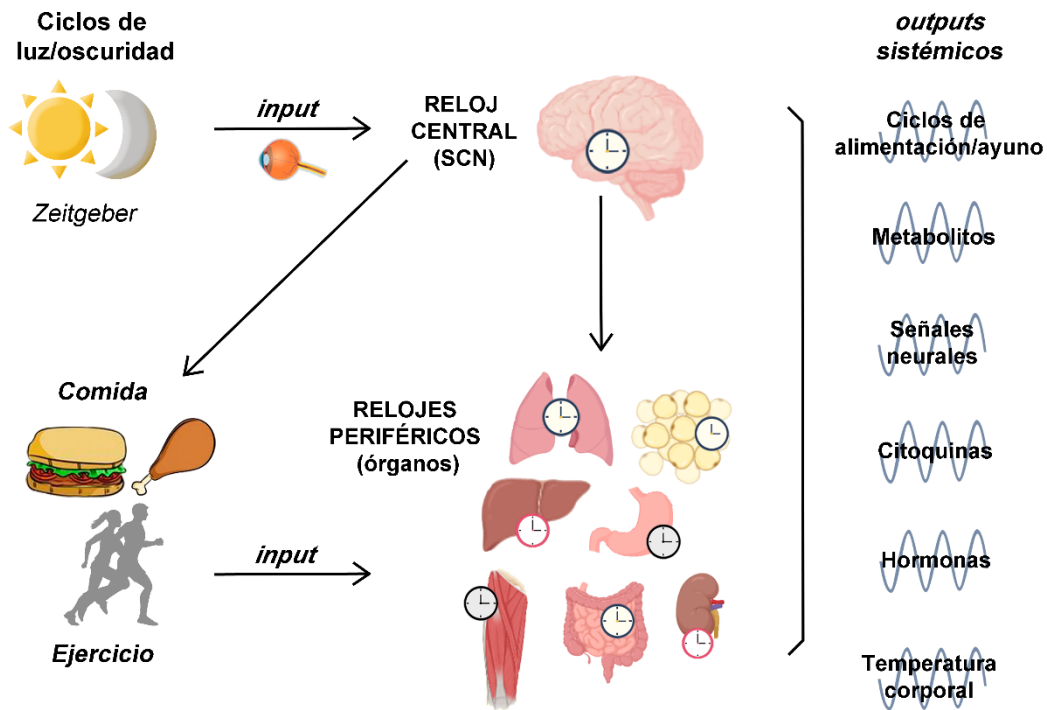
y oscuridad y la alimentación [3][4]. En los últimos años se ha avanzado mucho en el entendimiento de las bases moleculares y las vías a través de las cuales se dan estas sincronizaciones, al igual que la forma en que este reloj interno controla diversos procesos metabólicos de manera cíclica [5].

La importancia del sistema circadiano como centro de coordinación entre los procesos metabólicos internos y el medio ambiente cambiante externo se pone en evidencia en situaciones donde se pierde este control. La adaptabilidad del reloj interno es dinámica y flexible, pero existen circunstancias extremas que generan la perturbación del sistema circadiano de temporización. La vida moderna con las excesivas y prolongadas exposiciones a luces artificiales, dietas hipercalóricas, sedentarismo, turnos rotativos nocturnos de trabajo, vuelos transmeridianos, entre otros, generan un desbalance crónico que perturba el funcionamiento del reloj circadiano. Varios estudios sugieren que este desequilibrio incrementa el riesgo de desarrollar desbalances metabólicos y en última instancia enfermedades metabólicas como diabetes, obesidad, hipertensión e incluso una mayor predisposición al cáncer.

Los ritmos biológicos suponen entonces un equilibrio dinámico, aunque perturbable. En las próximas secciones se detalla el origen molecular de estos patrones temporales al igual que los medios que dispone el sistema circadiano para poder controlar y coordinar el metabolismo.

II. EL SISTEMA CIRCADIANO

En vertebrados, el sistema circadiano organiza temporalmente la fisiología, generando ritmos bioquímicos y de comportamiento [1][6]. Este sistema está compuesto por varios osciladores o relojes localizados en diferentes órganos y tejidos, e incluso dentro de cada célula individual, que se denominan *osciladores periféricos*. Todos estos relojes independientes están controlados por un *reloj maestro* u *oscilador central* que se localiza en el cerebro, particularmente en el núcleo supraquiasmático (SCN por sus siglas en inglés) del hipotálamo anterior [6][7], y funciona como centro de coordinación de la fisiología y el comportamiento de todo el organismo por medio de múltiples proyecciones a otras áreas del cerebro y/o enviando señales difusibles a los osciladores periféricos. La luz es la señal sincronizante más fuerte proveniente del medio externo que es capaz de sincronizar el reloj central a través de las células ganglionares fotosensibles de la retina, mientras que la alimentación o el ejercicio actúan a nivel de los relojes periféricos (esquema 1)[8].



Esquema 1. Organización del sistema circadiano en humanos. Tanto el reloj central, ubicado en el núcleo supraquiasmático (SCN) del cerebro, como los relojes periféricos presentes en los diferentes órganos, reciben señales sincronizantes o input que ponen en hora a estos relojes presentes en el organismo. Entre las señales más potentes y estudiadas se encuentran los ciclos de luz y oscuridad, los alimentos y el ejercicio físico. A su vez el reloj central envía señales a los periféricos para coordinar su funcionamiento. El sistema circadiano es la base que genera oscilaciones en varios aspectos metabólicos (output). Zeitgeber: “dador de tiempo”. Esquema adaptado de la revisión Guido et al. 2021.

Se puede asumir que los humanos, al igual que otros organismos, poseen osciladores biológicos que dan lugar a patrones diarios sobre diferentes aspectos del metabolismo tanto en el cerebro como en los distintos órganos que componen el organismo. Si se compara el sistema circadiano con una orquesta, en esta analogía el director de orquesta sería el cerebro que tiene el rol de coordinar el ritmo y guiar la dinámica de cada miembro que integra la orquesta, mientras que los músicos serían los diferentes órganos, cada uno capaz de generar su propio ritmo, o en el caso de esta analogía, cada uno capaz de tocar una melodía diferente que en su conjunto y con la guía del director compone la pieza musical. Esta organización incluso se extiende a nivel celular y metabólico como se detalla en la siguiente sección.

El reloj molecular

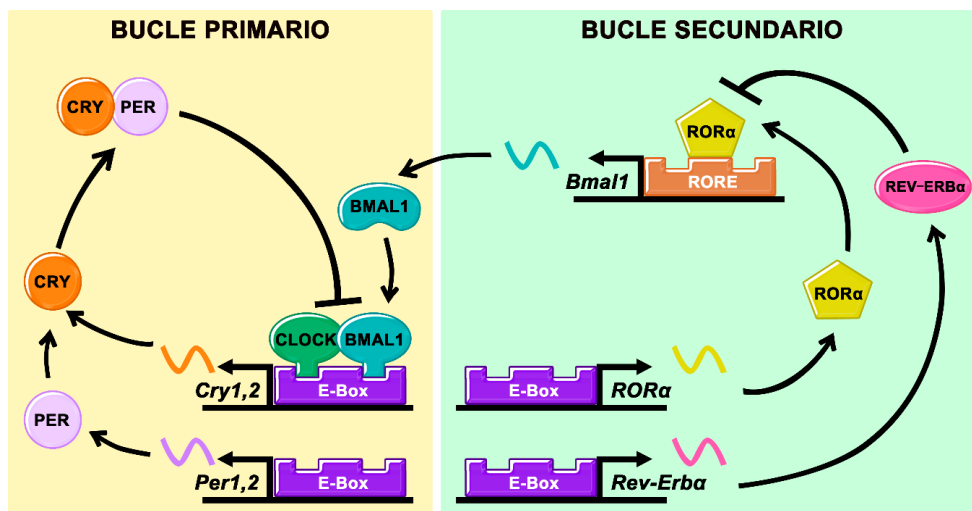
En 2017 J.C. Hall, M. Rosbash y M.W. Young recibieron el Premio Nobel en fisiología y medicina por el descubrimiento del mecanismo molecular a partir del cual funcionan los relojes biológicos. Sus descubrimientos permitieron proponer el primer modelo de *reloj molecular* y sentaron las bases a partir de las cuales pudieron explicar la forma en que los sistemas vivos adaptan los ritmos de sus relojes internos en sincronía con los cambios cíclicos del medio ambiente. Ellos usaron como modelo de estudio la mosca de la fruta (*Drosophila*), y de este organismo pudieron identificar y aislar un gen que era responsable de controlar los ritmos diarios en la fisiología y el comportamiento de la mosca. Llamaron a este gen *Period*, de período, que representa el tiempo que se requiere para completar una oscilación. Ellos pudieron identificar que este gen codifica para una proteína que se acumulaba y degradaba de manera periódica en diferentes momentos del día. Lo mismo ocurría con otras proteínas que también pudieron determinar, y con estos descubrimientos sentaron la base molecular que gobierna los ritmos auto-sostenidos dentro de la célula.

Se denominan **genes reloj** a aquellos genes que forman parte del mecanismo molecular del reloj y codifican para proteínas que son capaces de regular la expresión rítmica de otros genes diana. Este nivel de regulación se extiende desde una célula individual hasta órganos, tejidos y organismos en su conjunto, y establece las bases de la anticipación y adaptación de las especies a los ritmos generados en el medio ambiente.

El reloj molecular consiste en dos o más ciclos interconectados que funcionan como un *loop* de retroalimentación negativa donde ocurren procesos de transcripción y traducción génica (TTFL por las siglas en inglés de “*transcriptional–translational feedback loops*”), y está constituido por genes y proteínas reloj que en su mayoría actúan como factores de transcripción, activando o reprimiendo su propia expresión y la de otros genes diana llamados **genes controlados por el reloj**. Estos ciclos de regulación se llevan a cabo con una regularidad aproximada de 24 h, sentando la base molecular de los ritmos fisiológicos y bioquímicos observados en órganos, tejidos o incluso en organismos en su totalidad. En vertebrados este sistema molecular se encuentra muy conservado, es autónomo y autosostenible, y es capaz de medir el tiempo para anticipar el sistema y predecir cambios ambientales que puedan reiniciar el reloj interno (capacidad para ser sincronizado), como los ciclos de luz y oscuridad. Estos factores sincronizantes son llamados *zeitgeber* o dador de tiempo [6].

En mamíferos, durante la fase de luz, una proteína reloj denominada BMAL1 (*aryl hydrocarbon receptor translocator-like protein 1*) heterodimeriza con otra proteína denominada CLOCK

(*circadian locomotor output cycles kaput*) o con su análoga llamada NPAS2 (*neuronal PAS domain-containing protein 2*). CLOCK es considerada la proteína de preferencia para la unión a BMAL1 en tejidos periféricos, mientras que ambas, CLOCK y NPAS2 están involucradas en el cerebro. Estas proteínas funcionan como elementos positivos del reloj, ya que funcionan activando la transcripción génica a nivel de promotor. El complejo transcripcional BMAL1:CLOCK/NPAS2 se une a secuencias reguladoras muy específicas en las regiones promotoras, conocidas con el nombre de *E-box* [9][10][11]. Uno de los genes diana de este complejo de regulación es el que codifica para la proteína PERIOD (PER1 y PER2), que a su vez es miembro de la maquinaria molecular del reloj con actividad represora. El complejo también regula la transcripción de otro gen reloj llamado *Criptocromo* (CRY1 y CRY2), que codifica para una proteína denominada con el mismo nombre que heterodimeriza con *PERIOD* y actúan como elementos negativos del reloj al reprimir la transcripción de genes. Las proteínas PER y CRY se acumulan en el citoplasma, dimerizan y translocan al núcleo donde ejercen su función represora al interactuar con el complejo BMAL1:CLOCK/NPAS2 e impedir su rol activador [12][13][14][15]. Al ser PER y CRY dianas de regulación de BMAL y CLOCK/NPAS2, los elementos negativos del reloj son capaces de reprimir su propia expresión una vez que se acumula una cantidad determinada de proteína (Esquema 2, panel izquierdo). Este ciclo de retroalimentación transcripcional y traduccional se lleva a cabo en un período aproximado de 24 h. Este sistema de retroalimentación transcripcional y traduccional está conservado en diferentes especies, pero poseen elementos diferentes que se denominan de modos distintos [16].



Esquema 2. Elementos del reloj molecular en mamíferos. En el panel izquierdo se presenta el ciclo primario, donde intervienen factores de transcripción que ejercen su función activando la expresión de genes que poseen secuencias E-BOX en sus regiones promotoras (BMAL1 y CLOCK) o reprimiendo la acción del complejo activador BMAL1/CLOCK (PER y CRY). Constituye un loop o ciclo ya que los elementos activadores

fomentan la transcripción de los elementos represores, los cuales actúan reprimiendo su propia activación. En el panel de la derecha se presenta el ciclo o loop secundario de regulación, donde intervienen los receptores nucleares ROR y REV-ERB. Estos actúan activando y reprimiendo la expresión de genes, respectivamente, al interactuar con secuencias RORE en regiones promotoras. Además, se vinculan estrechamente con los elementos del loop primario de regulación ya que son activados transcripcionalmente por CLOCK y BMAL1, y a su vez regulan la expresión de BMAL1.

Existe un nivel de regulación post-traducciona que incluye la degradación proteosoma controlada de PER y CRY dependiente de ubiquitinación mediada por fosforilación [17][18][19][20][21], que determina el final y el comienzo de un nuevo ciclo al liberar la inhibición que ejerce el complejo PER:CRY sobre BMAL1:CLOCK/NPAS2.

En el panel derecho del Esquema 2 se presenta un ciclo secundario de regulación que involucra la activación transcripcional de **receptores nucleares** llamados *REV-ERB* y *ROR*. Una vez traducidas las proteínas REV-ERB y ROR actúan reprimiendo y activando respectivamente la transcripción de *BMAL1* y *CLOCK/NPAS2* mediante la unión a secuencias reguladoras en sus regiones promotoras llamadas RORE (*retinoic acid receptor-related orphan receptor response elements*) [22][23][24][25]. Particularmente, REV-ERB α reprime la transcripción de *CLOCK*, mientras que ROR aparentemente no ejerce una regulación sobre la expresión de este gen [26].

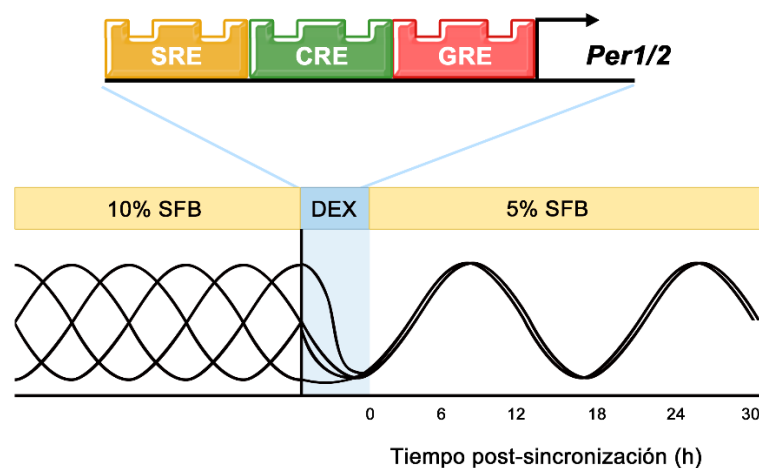
Estos **elementos positivos y negativos** del reloj molecular regulan temporalmente la activación y represión génica respectivamente, también controlan la transcripción de otros genes conocidos como **genes controlados por el reloj**. Estos están involucrados en muchas vías, entre las que se destacan vías que regulan el metabolismo lipídico y energético, la respiración mitocondrial y la división celular. Muchos de estos genes a su vez actúan como factores de transcripción, lo cual expande el alcance y la coordinación que ejerce el reloj molecular de una amplia diversidad de procesos celulares. El control que ejercer el reloj molecular se extiende también a la regulación de enzimas limitantes en diversas vías metabólicas [27] y de otros receptores nucleares, que son reguladores transcripcionales claves en, por ejemplo, la expresión rítmica del metabolismo lipídico en ciertos tejidos periféricos[25][28].

Sincronización del reloj

La regulación del reloj molecular se lleva a cabo incluso a nivel celular, es decir que cada célula de un organismo posee un reloj molecular propio e independiente. Cuando se estudian los ritmos circadianos *in vivo*, como por ejemplo usando el ratón como modelo de estudio, en general la sincronización se realiza mediante ciclos de luz y oscuridad y comida *ad libitum*. Esta es la forma

más eficiente de sincronización ya que la señal lumínica es captada por células fotosensibles de la retina, transmitida al reloj central (SCN) y luego a los relojes periféricos. Por el contrario, cuando se utilizan modelos *in vitro*, no se puede usar la luz como señal sincronizante a menos que se trate de cultivos de células fotosensibles de la retina que efectivamente puedan captar cambios en la intensidad lumínica. En estos modelos *PER1* y *PER2* están involucrados en la sincronización del reloj molecular por medio de la interacción a nivel de promotor con factores de transcripción de respuesta temprana, que están controlados por señales externas como hormonas, segundos mensajeros, temperatura o neurotransmisores (Esquema 3). En la práctica se utiliza principalmente el cambio de medio de cultivo como agente sincronizante, un shock de suero concentrado, o moléculas análogas de glucocorticoides, como la dexametasona (para más detalles revisar la sección de Materiales y Métodos).

La sincronización es un aspecto fundamental en el abordaje y estudio de los ritmos biológicos ya que permite poner en fase todos los osciladores presentes en el sistema y así poder evaluar el efecto del tiempo. Esto cobra mayor relevancia incluso cuando se estudian ritmos en cultivos celulares, ya que se puede pensar a cada célula como un oscilador independiente que se encuentra ciclando con una fase diferente. Esto se puede visualizar en el Esquema 3 como varias oscilaciones armónicas contrapuestas que están dadas por células diferentes. Estas oscilaciones pueden ser puestas en fase o alineadas luego de un pulso de sincronización (caja celeste) usando por ejemplo dexametasona (glucocorticoide). Como se puede observar en el Esquema, luego de la sincronización las oscilaciones se encuentran en fase y en esta condición si es posible medir un efecto del tiempo en todo el cultivo.



Esquema 3. Sincronización de cultivos celulares. En el esquema se esquematizan las regiones promotoras de los genes *PER1/2* implicadas en la sincronización. Estas secuencias son blancos de elementos externos que pueden introducirse en la célula como agentes sincronizantes, tales como la dexametasona (DEX), un análogo de glucocorticoide. Células en cultivo creciendo en un medio con 10% de suero fetal bobino (SFB) presentan cada una un perfil oscilatorio diferente. Un pulso de DEX es capaz de poner en fase todas estas

oscilaciones a fin de poder evaluar el comportamiento temporal de un determinado parámetro de estudio. SRE: serum response elements; elementos de respuesta al suero. CRE: cAMP response elements; elementos de respuesta al AMP cíclico. GRE: glucocorticoid response elements; elementos de respuesta a glucocorticoides (revisado en [29]).

El reloj metabólico

Diversos estudios que abordan la disrupción del reloj transcripcional en modelos procariotas y eucariotas observaron ritmos no transcripcionales remanentes que sugieren la existencia de un oscilador no transcripcional subyacente que mantiene estas variaciones temporales citosólicas [30]. La identidad molecular de este oscilador no se pudo caracterizar aún, pero existe evidencia filogenética que sugiere un origen metabólico en ciertas oscilaciones como es el caso de la oxidación de enzimas peroxirredoxinas [31].

El reloj metabólico fue primeramente descrito en glóbulos rojos en mamíferos [32], y constituye un oscilador independiente de actividad transcripcional que es sostenido a través de ciclos rédox en enzimas peroxirredoxinas/tiorredoxinas/NADPH [33][34]. Este complejo lleva a cabo fluctuaciones rédox de aproximadamente 24 h metabolizando peróxido de hidrógeno en varios tejidos del organismo. Este sistema se encuentra conservado en distintos reinos de vida [31][35] como en hongos, nematodos, plantas, células procariotas y eucariotas, en hígado murino, células del SCN e incluso en células tumorales [36] de glioblastoma humano; lo que sugiere la existencia de un oscilador no transcripcional que puede ser esencial en todos los sistemas temporales. La evidencia sugiere que ambos sistemas el rédox y el transcripcional/traduccionales son independientes, pero se encuentran vinculados de alguna manera ya que al alterar uno de ellos el otro persiste, pero con propiedades oscilatorias diferentes a las condiciones control [31]. En un estudio de orígenes filogenéticos, se observó que los mecanismos de detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) aparecieron hace aproximadamente 2500 millones de años con el comienzo de la vida aeróbica en el planeta, lo cual precede a los sistemas moleculares del reloj, que evolucionaron más recientemente e incluso de manera separada en los diferentes reinos (existen descritos diferentes sistemas de reloj molecular en plantas, hongos y metazoos). Con esta evidencia las oscilaciones en componentes de las vías de señalización de ROS, como son las peroxirredoxinas, podrían indicar un reloj ancestral que precede a las vías canónicas descritas en eucariotas [31]. De hecho, los ciclos de oxidación en las peroxirredoxinas pueden ser un marcador de ritmos biológicos a nivel metabólico (*reloj metabólico*) conservado a lo largo de los dominios de vida

(*bacterias, arqueas y eucaria*) y los ritmos celulares podrían compartir un origen molecular en común.

III. EL RELOJ CIRCADIANO Y EL METABOLISMO

Resulta necesaria una correcta coordinación entre el reloj molecular y el complejo sistema de vías metabólicas para poder mantener la homeostasis celular en condiciones óptimas. Existen varias vías por medio de las cuales el sistema circadiano interacciona con diversos circuitos metabólicos, algunas de las cuales se detallan a continuación.

Loops accesorios de NAD⁺/NADH, AMPK, CK1, SIRT1

Varios estudios reportan numerosos procesos citosólicos que son controlados por el reloj, como es el caso del estado redox de la célula, y que mantienen una relación con el oscilador transcripcional. Múltiples pares redox, como tioles (glutatión-GSH/GSSG) y coenzimas (FADH₂/FAD⁺, NADH/NAD⁺ y NADPH/NADP⁺) son los que determinan el estado redox de las células influyendo en el flujo de electrones y la homeostasis celular [37][38]. Estos procesos constituyen ciclos o *loops* accesorios que conectan el reloj circadiano con el metabolismo celular. En el metabolismo de nicotinamida adenina dinucleótido, o NAD⁺, la enzima limitante de su biosíntesis (*nicotinamide phosphoribosyltransferase*, NAMPT) es regulada transcripcionalmente por el complejo BMAL1:CLOCK, y los niveles de NAD⁺ muestran oscilaciones circadianas en citoplasma [39][40][41]. Al igual que se observó en los ciclos de peroxirredoxinas, los niveles de las formas reducidas NADH y NADPH presentaron patrones temporales en glóbulos rojos humanos anucleados [42]. Varios estudios demuestran que los niveles de NAD⁺ pueden regular a su vez ciertos aspectos del reloj molecular como, por ejemplo, el control en la afinidad de unión del complejo BMAL1:NPAS2 a sus regiones diana por medio del balance redox NAD⁺/NADH [43].

La función de las proteínas PER2 [44] y CLOCK [45] puede ser regulada por acetilación por medio de la enzima SIRT1, una desacetilasa dependiente de NAD⁺ que constituye un sensor nutricional clave involucrado en el balance energético [45][46]. Además, la expresión de SIRT1 es regulada por CLOCK:BMAL1. Las sirtuinas (SIRT) interaccionan con el reloj circadiano para controlar el remodelado de la cromatina y el destino metabólico de las células [47]. Las sirtuinas también influyen en el ciclo del ácido tricarboxílico (*TCA cycle* o *Ciclo de Krebs*) por medio de las proteínas SIRT3 y BMAL1, y en el metabolismo de ácidos grasos por medio de la SIRT6 [48][49].

SIRT1 también es capaz de activar directamente la expresión de *BMAL1* en el núcleo supraquiasmático [42].

Por último, los niveles de NAD⁺ también pueden regular el reloj molecular al regular la actividad de la polimerasa PARP-1 (*poly ADP-ribose polymerase 1*). Esta enzima presenta oscilaciones circadianas y está involucrada en la ribosilación de CLOCK al comienzo de la fase de luz, modulando la afinidad del complejo CLOCK:BMAL1 por el ADN [50].

Otro *loop* accesorio involucra la enzima quinasa AMPK (*adenosine monophosphate-regulated kinase*) que es capaz de censar niveles de energía en las células [51] y también se encuentra regulada rítmicamente por fosforilación [52]. A su vez, la AMPK puede regular a las proteínas CRY y CKI ϵ (*casein kinase*) por medio de fosforilación [53][54]. Otros *loops* accesorios incluyen vías de señalización donde intervienen moléculas señal como AMP cíclico y Ca²⁺, y niveles de glucosa (revisado en [55] y [56]).

El factor inducido por hipoxia HIF1 α es otro sensor metabólico que se encuentra relacionado con el reloj molecular al pertenecer a la superfamilia de factores de transcripción bHLH-PAS y tener la capacidad de ser reclutado al promotor de PER2 y activar su transcripción, generando así una disrupción en el sistema circadiano [57][58][59][60].

La estabilidad de PER2 es regulada por degradación proteosomal dependiente de fosforilación por medio de la acción de la enzima Caseína Quinasa (CK) 1 δ y 1 ϵ [61]. En este contexto, CK1 δ/ϵ frecuentemente opera en tándem con la enzima quinasa glucógeno sintasa (GSK) 3 α/β . Ambas enzimas tienen un rol conservado en determinar la velocidad del reloj circadiano celular en eucariotas [62][63], tanto en presencia como en ausencia de actividad transcripcional [32][62][64][65][66].

Receptores nucleares: REV-ERB, ROR, PPAR y PGC-1 α

El reloj circadiano controla el metabolismo lipídico y energético a través de reguladores transcripcionales como receptores nucleares, incluyendo proteínas REV-ERB, ROR y PPAR (α , γ y δ) [24]. Curiosamente, algunos receptores nucleares forman parte del reloj circadiano y otros están regulados por el mismo, y además participan en el control circadiano del metabolismo ya que responden a ligandos lipídicos y controlan la homeostasis de los lípidos.

Los receptores nucleares son generalmente clasificados como factores de transcripción regulados por ligandos debido a su capacidad de unirse a hormonas, lípidos y ácidos grasos, a través de los cuales regula el metabolismo. Los REV-ERBs y RORs participan en varios procesos

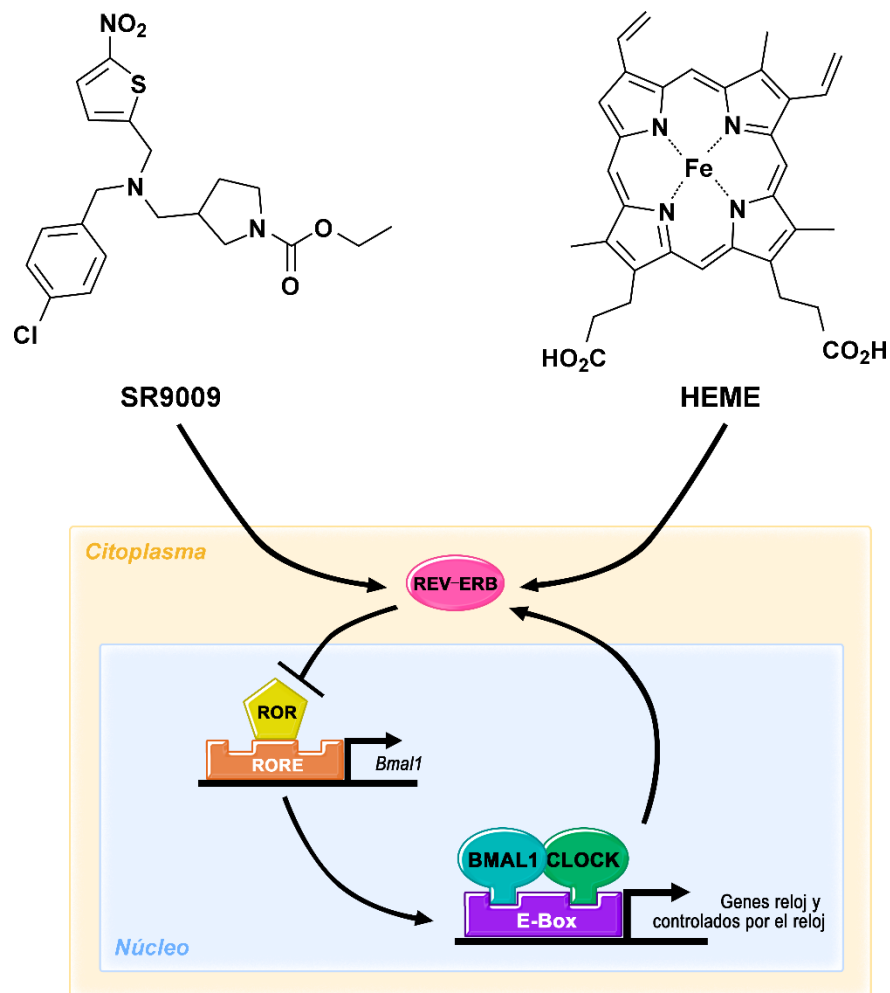
fisiológicos incluidos el desarrollo, metabolismo y la inmunidad. Estas familias de receptores están estrechamente relacionadas ya que son co-expresadas en algunos tejidos y tienen una gran similitud en los sitios diana que ambos reconocen y regulan. Pero a su vez, ejercen roles contrapuestos: las proteínas ROR activan constitutivamente la transcripción mientras que las REV-ERB la reprimen, ambos compitiendo por la unión a la misma región génica regulatoria, los sitios RORE. Esto pone de manifiesto la importancia del balance en la actividad de ambos factores para la correcta regulación de los genes diana. A su vez, ambos son componentes cruciales del reloj ya que ejercen su función como nexo entre el oscilador circadiano y diversas vías metabólicas.

Otros receptores nucleares fueron también implicados en la modulación y/o regulación de los ritmos circadianos debido a sus roles como factores de transcripción y sus patrones de expresión circadiana [25]. Cabe destacar que varios receptores nucleares que responden a ligandos lipídicos como ROR y PPAR γ junto a PGC-1 α fueron identificados como reguladores de la expresión de REV-ERBs. Se observó que a través de dietas altas en grasas se podía inducir una alteración en la expresión de *REV-ERB* [67].

También se identificaron nexos directos con elementos del reloj molecular: el receptor de glucocorticoide interacciona con CRY1/2, por medio de lo cual modula el patrón circadiano de glucocorticoides; PER2 interacciona con PPAR α y REV-ERB α a nivel de promotor [68]; y ROR estimula la expresión de *BMAL1* [69].

En particular, el **receptor nuclear REV-ERB** tiene gran importancia ya que es uno de los componentes accesorios del reloj molecular y su función en la regulación circadiana contribuye al correcto funcionamiento del reloj y del metabolismo [70][71]. Se conocen dos isoformas de estas proteínas, REV-ERB α y REV-ERB β , ambas ampliamente expresadas en todo el organismo. Los REV-ERBs regulan a nivel molecular genes implicados en el metabolismo lipídico [72][73][74][75], el metabolismo de glucosa [76][77][78], la adipogénesis [79][80][81], el metabolismo de triglicéridos [82], la capacidad oxidativa y la biogénesis mitocondrial [83]. Como componente del reloj, los REV-ERBs actúan reprimiendo genes del metabolismo lipídico [84], y también están involucrados en procesos de oncogénesis e inflamación [85][86]. Es por ello que ha emergido el desarrollo de ligandos sintéticos para los REV-ERBs (**SR9009** y **SR9011**) (Esquema 4) como una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento del cáncer y de desórdenes metabólicos. Estos compuestos se describieron como inhibidores de la autofagia y de la lipogénesis *de novo* [87]. De hecho, se observó un incremento en las enzimas sintasa de ácidos grasos (FASN) y estearoil-CoA desaturasa 1 (SCD1), ambas involucradas en la lipogénesis *de novo*, luego del tratamiento con agonistas de REV-ERBs [87]. En algunos estudios también se observó

una acumulación de gotas lipídicas (GLs) como resultado de un incremento en la captación y acumulación de ácidos grasos [88]. Guo et al. demostró que tanto una deficiencia en fosfolípidos con capacidad surfactante como la PC o bien una acumulación de ácido fosfatídico (PA) bajo el tratamiento con el agonista SR9009, incrementó la fusión de GLs o su coalescencia [89][90]. Considerando que PC es regulado por el reloj circadiano a través de la vía *BMAL1 / REV-ERB α / CHOK α* [91][92], la disponibilidad de este fosfolípido podría ser un regulador crucial en el tamaño y número de gotas lipídicas. También se reportaron efectos citotóxicos y alteraciones en el ciclo celular en modelos tumorales, con importantes efectos en el metabolismo lipídico luego del tratamiento con el agonista SR9009 [93].



Esquema 4. SR9009, agonista de REV-ERB. La proteína REV-ERB (esfera rosada) posee como ligando natural al grupo heme (segmento superior derecho del esquema), el cual le brinda estabilidad térmica y colabora con el reclutamiento del co-represor NCoR. Algunos estudios incluso sugieren que la regulación por parte de este ligando mediaría el control circadiano sobre el metabolismo [94]. A la izquierda se muestra la estructura de un ligando sintético (SR9009) que actúa como agonista de la proteína REV-ERB, promoviendo su actividad represora. En la parte inferior se esquematiza la interacción del agonista SR9009 con el loop secundario de regulación del reloj molecular, donde REV-ERB actúa reprimiendo la transcripción de *BMAL1*

en secuencias promotoras RORE (bloque naranja), y a la vez, BMAL activa transcripcionalmente a REV-ERB a través de la unión a regiones E-Box (bloque violeta).

Los **receptores nucleares ROR** también tienen un importante rol en la homeostasis lipídica ya que modulan la expresión de reguladores lipídicos como SREBP1c y genes que codifican para enzimas del metabolismo lipídico [95][96][97], y a su vez su actividad es controlada por lípidos en un ciclo de retroalimentación. Se ha observado que ratones con la enzima ROR α disfuncional presentan aberraciones en la homeostasis lipídica con disminución en los niveles de TG en suero e hígado, y los niveles totales de colesterol y HDL (*high density lipoprotein*) en plasma [98]. Además, existen dos isoformas, ROR α y ROR γ , ambas con una gran similitud de secuencia, que se expresan en hígado y participan en la regulación de la biosíntesis y absorción lipídica [99]. Como se mencionó previamente los ROR activan la transcripción de *BMAL1* [69], *REV-ERB α* [100] y *NPAS2* [96], y a su vez la expresión de ROR es controlada por BMAL1:CLOCK y REV-ERB [25][69].

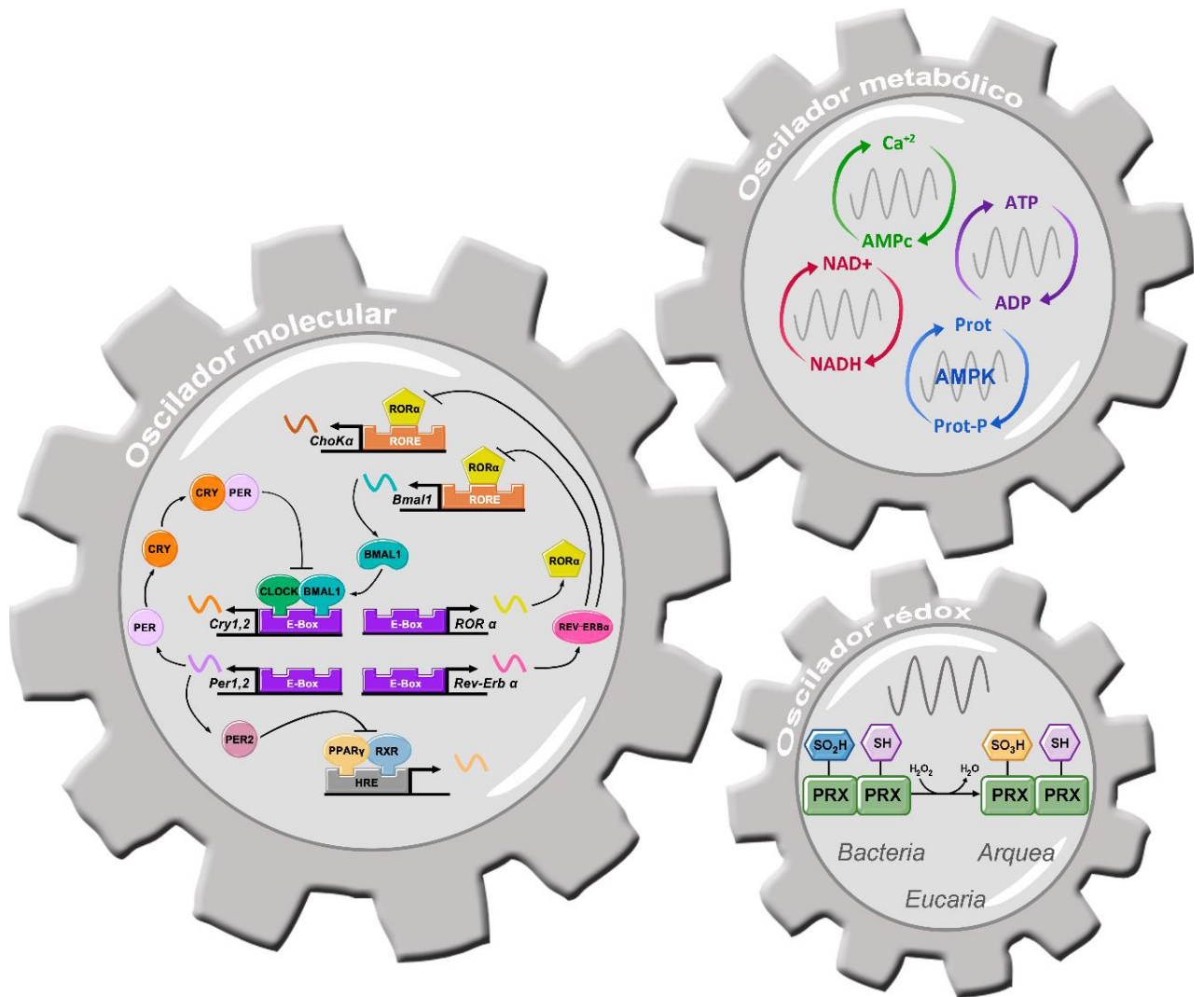
Los **PPARs (Peroxisome proliferator-activated receptors)** son receptores nucleares que regulan la homeostasis energética y lipídica participando en el metabolismo de nutrientes, glucosa y energía [101]. También se describieron como moduladores de la inflamación, de enfermedades del sistema nervioso central y del cáncer. A nivel molecular actúan como factores de transcripción, regulando la expresión de múltiples genes implicados en el metabolismo celular. Como otros receptores nucleares, los PPARs actúan como nexos entre el reloj circadiano y el metabolismo lipídico debido a su capacidad para interactuar con compuestos lipídicos (ácidos grasos y esteroides) como ligandos [102][103][104][105]. Por ejemplo, se sabe que PPAR γ participa en procesos de adipogénesis, sensibilidad a la insulina y respuestas inflamatorias, pero su actividad se reprime por medio de la interacción con PER2, que ejerce su inhibición bloqueando el reclutamiento de PPAR γ a sus secuencias diana en las regiones reguladoras. Es por ello que ciertos estudios postulan a PER2 como un modulador natural de la actividad adipogénica activada por PPAR γ . Tanto PPAR α como PPAR γ regulan la expresión de genes reloj por medio de su unión rítmica a regiones reguladoras PPRE (PPAR-response elements) presentes en los promotores de genes reloj. Así, modulan transcripcionalmente a *BMAL1* [93][106] y *REV-ERB α* [107][108]. A su vez, los PPARs son regulados por CLOCK:BMAL1 a través de regiones E-box [109].

PGC-1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) es un co-activador transcripcional implicado en la homeostasis energética al regular vías metabólicas relacionadas con la biogénesis y respiración mitocondrial, la termogénesis y la gluconeogénesis [110]. La expresión y actividad de PGC-1 α responde al estado metabólico de la célula. Aunque PGC-1 α no interacciona directamente con ligandos lipídicos, ejerce un importante rol en la

homeostasis lipídica al interactuar con PPAR γ . Se observaron alteraciones en la oxidación de ácidos grasos y en el procesamiento de lípidos, en hepatocitos con un alelo del gen PGC-1 α mutado [111]. Por el contrario, ante una sobreexpresión de esta proteína se registró la inducción de proteínas reloj como BMAL1, CLOCK y REV-ERB α/β en hepatocitos primarios, lo que sugiere un rol activo en el acoplamiento de la señalización lipídica con el reloj. También se observó que PGC-1 α induce la expresión de la enzima PAP (phosphatidate phosphohydrolase) o *LIPIN1*, que a su vez interactúa tanto con PGC-1 α como con PPAR α . Las tres presentan comportamientos temporales y promueven la coordinación temporal en la oxidación de ácidos grasos [112].

Ritmos ultradianos de 12 horas

Se habla de ritmos ultradianos cuando los períodos de las oscilaciones son menores a aquellos de la escala circadiana “cercana al día” de 24 horas (entre 20 y 28 h). En humanos la presión sanguínea, el desempeño cognitivo, las hormonas circulantes y los patrones de sueño muestran ritmos de 12 horas [113][114][115]. Estos ritmos son potencialmente importantes para la homeostasis sistémica ya que alteraciones en los mismos fueron reportados en diversas patologías humanas, y su desregulación puede llevar al desarrollo y progresión de enfermedades metabólicas. Se han reportado genes en hígado de ratón y otros tejidos murinos periféricos que presentan períodos de 12 horas en su expresión [116][117][118][119][120], al igual que enzimas involucradas en el metabolismo lipídico de ratones alimentados con dietas hipercalóricas [67]. Las bases moleculares de estos ritmos de 12 horas no están aún bien descritas, pero Hughes et al. (2009) propuso que podrían deberse a la interacción de dos componentes regulatorios diferentes del oscilador con fases opuestas [117]. Zhu et al. (2017) identificaron 3652 genes en el hígado que presentaban períodos de 12 h, y se encontraban enriquecidos en el metabolismo del retículo endoplásmico y mitocondrial, al igual que en vías de control de calidad. Ellos observaron que estos ritmos se perdían cuando se los exponía a condiciones de estrés, lo cual correlaciona con la progresión de hígado graso no alcohólico (NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease) en humanos. En estudios llevados a cabo en células tumorales de glioblastoma también se observaron ritmos de 12 horas en el estado redox, y cuando se deletó el gen de *BMAL1* estos ritmos disminuyeron significativamente su amplitud y extendieron su período a 18 horas [36].



Esquema 5. Interacción entre el oscilador molecular, redox y metabólico. Se esquematiza los elementos que presentan comportamiento rítmico en los distintos osciladores. En el oscilador molecular (izquierda) se presentan genes reloj y genes controlados por el reloj, y sus interacciones a nivel de promotor. En el oscilador redox (derecha, abajo) se esquematizan los ciclos de oxidación de las peroxirredoxinas (*PRX*) presentes en distintos reinos como bacteria, arquea y eucaria. En el oscilador metabólico (derecha, arriba) se representan oscilaciones en los cofactores $NAD^+/NADH$, $Ca^{2+}/AMPC$, ATP/ADP y fosforilación de proteínas (*Prot-P*) por acción de la enzima *AMPK*.

IV. METABOLISMO LIPÍDICO

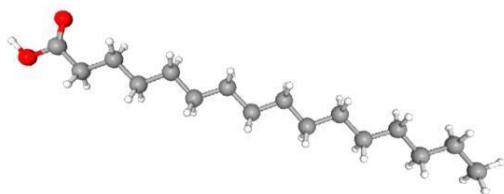
Los lípidos constituyen un grupo muy heterogéneo de moléculas orgánicas fundamentales para la vida, y tienen la particularidad de ser las biomoléculas más hidrofóbicas y con mayor poder energético a nivel celular. Constituyen un grupo químicamente muy diverso y por tanto desempeñan funciones biológicas muy variadas [121]. Los triacilglicéridos (TG) almacenan gran cantidad de energía química, los fosfolípidos y esfingolípidos son principalmente componentes estructurales de las membranas biológicas y las ceras poseen funciones de protección al

ambiente. Existen otros lípidos que desempeñan actividades biológicas muy importantes y potentes a pesar de su baja concentración, como son las vitaminas liposolubles, pigmentos, hormonas y mensajeros intracelulares.

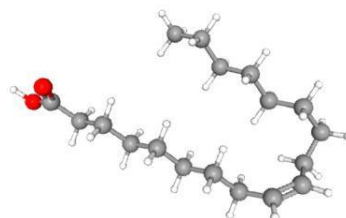
Los lípidos se pueden clasificar en dos grandes grupos dependiendo si poseen o no en su estructura un ácido graso. Los **ácidos grasos** están constituidos por una cadena hidrocarbonada conocida como “cola apolar” que posee un grupo carbonilo en uno de sus extremos. A su vez, la cadena hidrocarbonada puede poseer insaturaciones en su estructura, las cuales pueden variar en cantidad y posición. Esto junto a la posibilidad de estar constituida por diferentes cantidades de átomos de carbono, hace posible que exista una gran variedad de ácidos grasos con diversas propiedades. La mayor parte de los ácidos grasos presentes en los sistemas biológicos contienen un número par de átomos de carbono, siendo los de 16 (ácido palmítico) y 18 (ácido esteárico) átomos de carbono los más abundantes. Los ácidos grasos más abundantes son los que presentan insaturaciones y se conocen como *monoinsaturados*, si presentan un único doble enlace, o *poliinsaturados*, si poseen dos o más insaturaciones en su cadena apolar (Esquema 6). Estos dobles enlaces no están conjugados, es decir que se encuentran separados entre sí por un grupo metilo, y en su mayoría poseen una configuración en *cis*. Los ácidos grasos *trans* se producen durante la fermentación en el rumen de los animales productores de lácteos y de carne o durante la hidrogenación de aceites de pescado y vegetales. Es por ello que se recomienda evitar la ingestión de grandes cantidades de estos ácidos grasos, dado que un consumo excesivo está correlacionado con niveles elevados de LDL (colesterol “malo”) y bajos de HDL (colesterol “bueno”).

Ácidos grasos

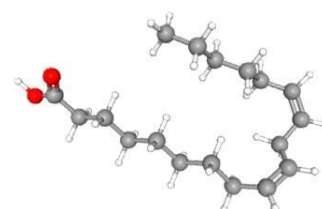
A) Ácido palmítico



B) Ácido oleico



C) Ácido linoleico



Esquema 6. Estructura de los ácidos grasos. En rojo se muestran los átomos de oxígeno, en blanco los de hidrógeno y en gris los de carbono. **A)** Saturados: ácido palmítico, C16 (16:0). **B)** Monoinsaturado: ácido oleico, C18 con 1 insaturación en C9 (18:1) **C)** Poliinsaturado: ácido linoleico C18 con 2 insaturaciones en *cis* en C9 y C12 (18:2). C: número de átomos de carbono. Notación del tipo (X:Y): “X” indica el número de átomos de carbono de la cadena, “Y” el número de insaturaciones. Estructuras obtenidas de la base de datos PubChem [122].

Abreviatura	Nombre	Nomenclatura sistemática	Fórmula
4:0	Butírico	Ácido butanoico	C ₄ H ₈ O ₂
6:0	Caproico	Ácido hexanoico	C ₆ H ₁₂ O ₂
8:0	Caprílico	Ácido octanoico	C ₈ H ₁₆ O ₂
10:0	Cáprico	Ácido decanoico	C ₁₀ H ₂₀ O ₂
10:1 n-1	Caproleico	Ácido 9-decenoico	C ₁₀ H ₁₈ O ₂
12:0	Láurico	Ácido dodecanoico	C ₁₂ H ₂₄ O ₂
12:1 n-3	Lauroleico	Ácido 9-dodecenoico	C ₁₁ H ₂₂ O ₂
14:0	Mirístico	Ácido tetradecanoico	C ₁₄ H ₂₈ O ₂
16:0	Palmítico	Ácido hexadecanoico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
16:1 n-7	Palmitoleico	Ácido 9-hexadecanoico	C ₁₆ H ₃₀ O ₂
18:0	Estearico	Ácido octadecanoico	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
18:1 n-9	Oleico	Ácido 9-octadecenoico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂
18:1 n-7	Vaccénico	Ácido 11-octadecenoico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂
18:2 n-6	Linoleico Ω6	Ácido N ₁ ,12-octadecadienoico	C ₁₈ H ₃₂ O ₂
18:3 n-3	Linolénico Ω3	Ácido N ₁ ,N ₂ ,15-octadecatrienoico	C ₁₈ H ₃₀ O ₂
18:3 n-6	Gamma Linolénico Ω6	Ácido N ₁ ,N ₂ ,12-octadecatrienoico	C ₁₈ H ₃₀ O ₂
18:4 n-3	Estearidónico Ω3	Ácido N ₁ ,N ₂ ,N ₃ -14-octadecatetraenoico	C ₁₈ H ₂₈ O ₂
20:0	Araquídico	Ácido eicosanoico	C ₂₀ H ₄₀ O ₂
20:1 n-11	Gadoleico	Ácido 9-eicosenoico	C ₂₀ H ₃₈ O ₂
20:2 n-6	Eicosadienoico Ω6	Ácido N ₁ ,14-eicosadienoico	C ₂₀ H ₃₆ O ₂
20:3 n-3	Eicosatrienoico Ω3	Ácido N ₁ , N ₂ ,17-eicosatrienoico	C ₂₀ H ₃₄ O ₂
20:3 n-6	Eicosatrienoico Ω6	Ácido N ₁ ,N ₂ ,14-eicosatrienoico	C ₂₀ H ₃₄ O ₂
20:4 n-3	Araquidónico Ω3	Ácido N ₁ ,N ₂ ,N ₃ ,17-eicosatetraenoico	C ₂₀ H ₃₂ O ₂
20:4 n-6	Araquidónico Ω6	Ácido eicosatetraenoico	C ₂₀ H ₃₂ O ₂
20:5 n-3	EPA Ω3	Ácido N ₁ ,N ₂ ,N ₃ ,N ₄ ,17-eicosapentaenoico	C ₂₀ H ₃₀ O ₂
22:0	Behénico	Ácido docosanoico	C ₂₂ H ₄₄ O ₂
22:1 n-11	Cetoleico	Ácido 11-docosenoico	C ₂₂ H ₄₂ O ₂
22:1 n-9	Erúcido	Ácido 13-docosenoico	C ₂₂ H ₄₂ O ₂
22:2 n-6	Docosadienoico Ω6	Ácido N ₁ ,16-docosadienoico	C ₂₂ H ₄₀ O ₂
22:4 n-6	Docosatetraenoico Ω6	Ácido N ₁ ,N ₂ ,N ₃ ,16-docosatetraenoico	C ₂₂ H ₃₆ O ₂
22:5 n-3	Clupanodónico Ω3	Ácido N ₁ ,N ₂ ,N ₃ ,N ₄ ,19-docosapentaenoico	C ₂₂ H ₃₄ O ₂
22:5 n-6	Docosapentanoico Ω6	Ácido N ₁ ,N ₂ ,N ₃ ,N ₄ ,16-docosahexanoico	C ₂₂ H ₃₄ O ₂
22:6 n-3	DHA Ω3	Ácido N ₁ ,N ₂ ,N ₃ ,N ₄ , N ₅ ,19-docosahexaenoico	C ₂₂ H ₃₂ O ₂
24:0	Lignocérico	Ácido tetracosanoico	C ₂₄ H ₄₈ O ₂
24:5 n-3	Tetracosapentaenoico Ω3	Ácido N ₁ ,N ₂ ,N ₃ ,N ₄ ,21-tetracosapentaenoico	C ₂₄ H ₃₈ O ₂
24:6 n-3	Tetracosahexaenoico Ω3	Ácido N ₁ ,N ₂ ,N ₃ ,N ₄ , N ₅ ,21-tetracosahexaenoico	C ₂₄ H ₃₆ O ₂
26:0	Cerótico	Ácido hexacosanoico	C ₂₆ H ₅₂ O ₂

Tabla 1. Nomenclatura de algunos ácidos grasos. En la primera columna se muestra la abreviatura de los diferentes ácidos grasos. El primer número corresponde a la cantidad de átomos de carbono de la molécula, y el segundo a la cantidad de insaturaciones. La referencia n-3, n-6, etc., por su parte indican la posición del primer doble enlace a partir del grupo metilo. En **negrita** se presentan los ácidos grasos esenciales de la serie Ω 3 del ácido α-linolénico (18:3 n-3) y Ω 6 del ácido linoleico (18:2 n-6), ácidos grasos poliinsaturados con dobles enlaces cerca del extremo metilo de la molécula que el organismo no puede sintetizar y es indispensable consumirlos con la ingesta de alimentos (abundantes en aceites vegetales y de pescado). En la tercera columna denominada "nomenclatura sistemática", las referencias del tipo N₁,N₂,

etc. indican las posiciones de los dobles enlaces en orden ascendente a partir del grupo metilo. El único número que se indica en esta referencia corresponde a la posición del último doble enlace a partir del grupo carboxilo. Información obtenida de la base de datos Lipid Maps [123].

Clasificación de los lípidos

Teniendo en cuenta la presencia o no de ácidos grasos en su estructura, los lípidos pueden clasificarse de manera global en dos grupos: saponificables e insaponificables, respectivamente. La saponificación consiste en la propiedad de formar sales de sodio o potasio (jabones) luego del tratamiento alcalino.

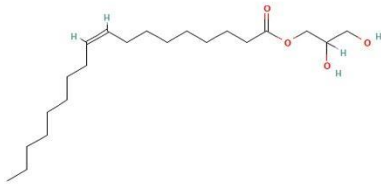
Los **lípidos insaponificables** no poseen ácidos grasos en su estructura y se caracterizan por no ser hidrolizados en presencia de hidróxidos, en otras palabras, no son capaces de generar jabones a partir de su hidrólisis básica, de ahí su nombre. La unidad más básica de esta categoría de lípidos es el isopreno. Las moléculas formadas por la unión de dos o más isoprenos se conocen como terpenoides y *terpenos*, como es el caso de las vitaminas A, E y K. Los *esteroides* son derivados de estos, siendo el colesterol una de las moléculas más relevantes (ver sección “membranas biológicas” a continuación para más detalles) al igual que los ácidos biliares y las hormonas esteroideas como el estrógeno. Dentro de los lípidos simples también se incluye a los icosanooides, compuestos por moléculas como las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, las cuales están implicadas en procesos biológicos de gran importancia como la inflamación y la regeneración de tejidos y su señalización (Esquema 7).

Los **lípidos saponificables**, por su parte poseen ésteres de ácidos grasos en su estructura y en términos generales son capaces de ser hidrolizado en presencia de hidróxidos y formar jabones. Esta clase de lípidos se puede clasificar a su vez en simples o neutros [acil glicéridos (mono, di o triglicéridos) y céridos] y complejos o polares (esfingolípidos y fosfoglicéridos). Los lípidos saponificables también son llamados lípidos simples o neutros ya que no poseen carga neta. Dependiendo del alcohol que se encuentra esterificado por los ácidos grasos se pueden clasificar en glicéridos, si se trata de un glicerol, o céridos, si posee otro alcohol de cadena larga. Los *glicéridos* o acilglicéridos, como lo indica su nombre son lípidos constituidos por ácidos grasos (saturados o insaturados) y glicerol (alcohol) unidos por un enlace tipo éster entre el grupo hidroxilo del alcohol y el grupo carbonilo del ácido graso. Según el número de ácidos grasos que aparezcan esterificados, los acilglicéridos pueden ser de tres tipos: *monoacilglicéridos* o monoglicéridos, con un solo ácido graso; *diacilglicéridos* o *diglicéridos*, con dos ácidos grasos; y *triacilglicéridos* o *triglicéridos*, con tres ácidos grasos (Esquema 7). Los *céridos* o ceras por su parte son ésteres de ácidos grasos de cadena larga con alcoholes de peso molecular elevado, es decir,

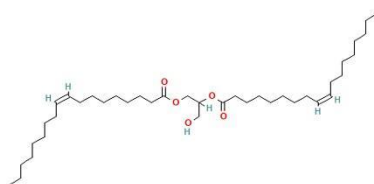
también de cadena larga. Tanto en animales como en vegetales, las ceras cumplen funciones de protección y aislantes térmicos. Los lípidos saponificables complejos o polares también se clasifican dependiendo el alcohol que posean en su estructura: se denominan glicerofosfolípidos o fosfoglicéridos si poseen un glicerol en su estructura o esfingolípidos si poseen una esfingosina (aminoalcohol) (Esquema 7).

Saponificables:

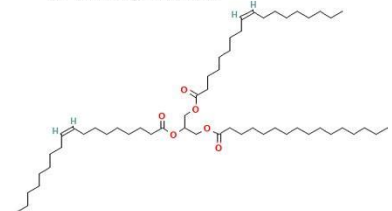
A) Monoacilglicéridos



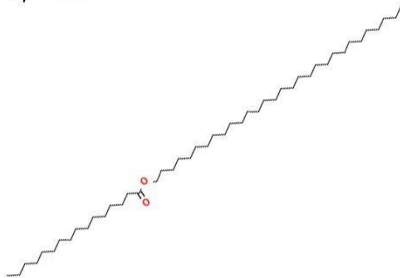
B) Diacilglicéridos



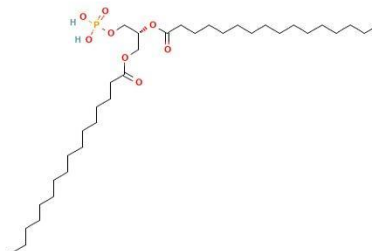
C) Triacilglicéridos



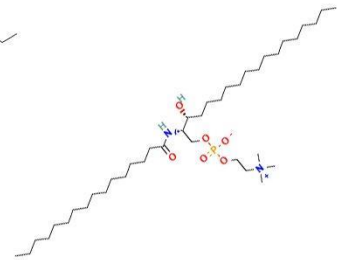
D) Ceras



E) Fosfoglicéridos

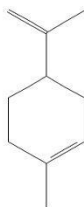


F) Esfingolípidos

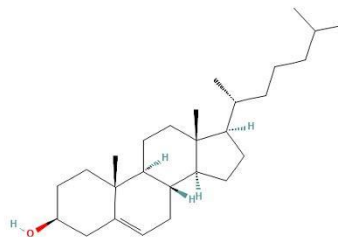


Insaponificables:

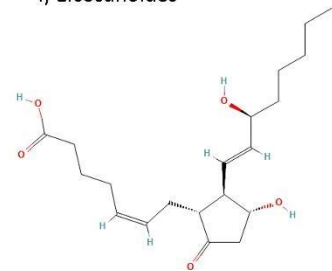
G) Terpenos



H) Esteroides



I) Eicosanoides



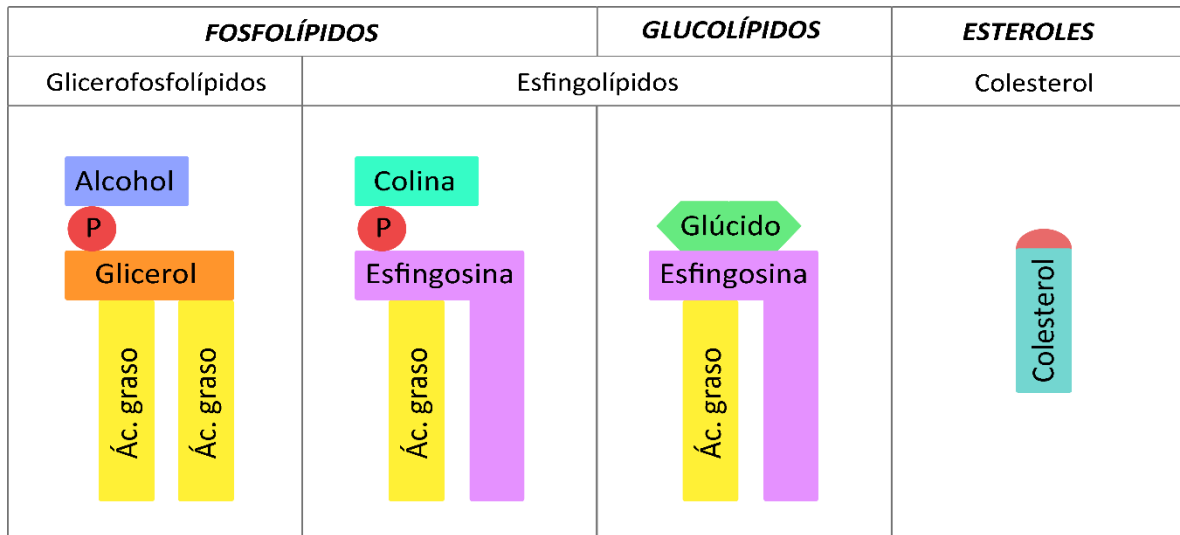
Esquema 7. Clasificación de lípidos. Se presentan algunos ejemplos de la estructura 2D de diferentes tipos de lípidos. Lípidos saponificables: A) Monoacilglicérido: Gliceril-monooleato. B) Diacilglicéridos: 1,2-Dioleoilglicerol. C) Triacilglicéridos: 1,2-Dioleoil-3-palmitoilglicerol o triglicérido OOP. D) Ceras: palmitato de miricilo (cera de abejas). E) Fosfoglicéridos: 1,2-Dipalmitoil-sn-glicerol 3-fosfato, ácido fosfatídico esterificado con dos ácidos palmíticos, PA (16:0/16:0). F) Esfingomielinas: N-Palmitoidihidroesfingomielina, SM(d18:0/16:0). Lípidos insaponificables: G) Terpeno: Limoneno. H) Esteroides, colesterol. I) Eicosanoides: Prostaglandina E2. Estructuras obtenidas de la base de datos PubChem [122].

Membranas biológicas

Los sistemas membranosos están compuestos por lípidos y proteínas, y constituyen la base que dio lugar a la evolución de la vida celular tal como la conocemos. En los sistemas eucariotas, las membranas son las encargadas de hacer posible la compartimentalización, delimitando en tiempo y espacio la infinidad de procesos metabólicos que ocurren de manera simultánea dentro de la célula.

De acuerdo con el modelo de *mosaico fluido* [124], la membrana plasmática de eucariotas está constituida por una bicapa de lípidos (principalmente fosfolípidos) y proteínas (periféricas o integrales) que conforman una matriz fluida que hace posible la comunicación y el transporte de sustancias químicas y iones desde el medio externo al interno o viceversa. Este modelo considera que las proteínas interactúan con los lípidos inmediatamente próximos, exponiendo sus residuos polares hacia las cabezas polares de los fosfolípidos y sus residuos apolares hacia las colas hidrofóbicas de los ácidos grasos.

Las membranas biológicas constituyen una estructura muy dinámica donde interactúan principalmente lípidos y proteínas. Una característica que tienen en común ambas macromoléculas es que poseen en una pequeña o gran parte de su estructura un segmento hidrofóbico que se encuentra en contacto con el interior apolar de la membrana como *bicapa lipídica*. La característica anfipática que poseen ciertos lípidos hace posible que en un medio acuoso tiendan a autoensamblarse en estructuras estables exponiendo su región hidrofílica o polar al medio acuoso circundante, y recluyendo sus regiones apolares en el interior. Esta repulsión hidrofóbica es la base fisicoquímica que fundamenta la formación de las bicapas lipídicas, siendo los fosfolípidos, esfingolípidos y colesterol los principales lípidos constituyentes (Esquema 8).



Esquema 8. Composición lipídica de membranas biológicas. Se esquematiza la estructura de los lípidos principales que componen las membranas biológicas. Cada bloque de color representa un segmento diferente de la estructura. Bloque amarillo: ácido graso. Bloque naranja: glicerol. Bloque azul: alcohol. Círculo rojo: fosfato (P). Bloque verde agua: residuo de colina. Bloque lila: esfingosina. Polígono verde: glúcido. Bloque celeste: colesterol.

Los **esfingolípidos** son lípidos que al igual que los fosfolípidos poseen dos colas hidrofóbicas y una cabeza polar, lo cual las vuelve moléculas anfipáticas y por lo tanto componentes estructurales de membranas biológicas. Ambos tipos de lípidos se diferencian en que los fosfolípidos poseen un *glicerol* en su estructura mientras que los esfingolípidos poseen una *esfingosina*, tal como lo sugiere su nombre.

El **colesterol** es un lípido fundamental en diferentes procesos biológicos ya que es una molécula precursora en la biosíntesis de hormonas adrenocorticales y sexuales, y además participa en la producción de ácidos biliares. También es un componente fundamental en las membranas biológicas donde regula la fluidez y la permeabilidad de la misma, posibilita la coexistencia de fases y la existencia de dominios en las membranas, además de estar implicado en las funciones de proteínas transmembranas, canales iónicos, entre otras [125]. En términos generales se considera que el colesterol, cuando se inserta en la bicapa lipídica genera una especie de barrera altamente hidrofóbica (dado por la rigidez de los anillos en su estructura) y genera una disminución en la fluidez de la membrana [126].

Los **fosfolípidos** conocidos como fosfoacilglicéridos, glicerofosfolípidos o fosfoglicéridos son lípidos que se caracterizan por tener un grupo polar unido a través de un enlace fosfodiéster al –OH de uno de los extremos del glicerol, además de poseer dos ácidos grasos esterificando los

otros dos residuos $-OH$. Esta estructura que presentan los glicerofosfolípidos los vuelve químicamente anfipáticos, con una cola apolar y una cabeza polar. Esta característica es la base bioquímica que fundamenta el ensamblado de las membranas biológicas y es por eso que los glicerofosfolípidos cumplen principalmente funciones estructurales. Existe una amplia variedad de fosfolípidos ya que tanto el largo de las cadenas hidrocarbonadas, sus insaturaciones y la naturaleza de la cabeza polar pueden variar químicamente y presentar diferentes propiedades. La nomenclatura de esta clase de lípidos está determinada por el compuesto que esté unido al grupo fosfato. El más simple de todos es el ácido fosfatídico (PA). En cambio, si se une el aminoalcohol colina al glicerol (por medio de un enlace fosfodiéster) se tratará de una *fosfatidilcolina* (PC), si es una etanolamina se denominará *fosfatidiletanolamina* (PE) y si se une un aminoácido serina se denominará *fosfatidilserina* (PS). PC y PE son los fosfolípidos más abundantes en las membranas biológicas, las cuales están formadas por una bicapa lipídica donde las colas hidrofóbicas quedan recluidas al interior de la membrana (ambiente apolar) dejando las cabezas polares en contacto con el medio polar circundante. El tipo de cadena hidrocarbonada que constituye a los ácidos grasos influye en las características fisicoquímicas de las membranas. Al igual que pasa con el colesterol, las membranas que poseen fosfolípidos con cadenas apolares poliinsaturadas se vuelven más fluidas, ya que estas insaturaciones vuelven menos compacta la membrana [127].

Como se mencionó previamente, los dos principales fosfolípidos constituyentes de membrana son PC y PE, y poseen una distribución asimétrica en la membrana plasmática: la mayoría de la PC está localizada en la hemicapa externa, mientras que la hemicapa interna se encuentra enriquecida en PE. Estos fosfolípidos poseen diferencias estructurales fundamentales que dan lugar a propiedades físicas diferenciales. La PC tiene una cabeza polar más voluminosa que la PE ya que el grupo amina que ambos lípidos tienen en común, en la PC se encuentra trimetilado. Esto hace que tridimensionalmente la PC se asemeje a un cilindro, mientras que la PE presenta una forma más cónica, siendo la punta del cono la cabeza polar relativamente pequeña respecto al volumen del segmento hidrofóbico (ver Esquema 8). La conformación tridimensional de estos bloques estructurales le confiere a las membranas cierta rigidez (compactación), en el caso de las PCs, o flexibilidad (curvatura), en el caso de las PEs, dependiendo las composiciones relativas de PC y PE. Muchos procesos celulares se llevan a cabo en diferentes compartimentos subcelulares que se encuentran delimitados por sistemas membranosos, lo cual implica que las características físicas de las membranas tengan mucha relevancia. La funcionalidad de las proteínas transmembranas, el transporte intracelular por medio de vesículas o la endocitosis/exocitosis son algunos ejemplos de procesos que dependen de la integridad de la membrana para llevarse a

cabo adecuadamente, y es por ello que resulta clave mantener un debido balance en la composición de la bicapa lipídica a fin de preservar la supervivencia celular. Cabe destacar que PC y PE poseen un rol fundamental en el balance estructural de las membranas biológicas, así como también en la generación de segundos mensajeros implicados en vías regulatorias y otros procesos celulares.

Biosíntesis de glicerofosfolípidos

La biosíntesis de *novo* fue descrita por Kennedy y Weiss en los años cincuenta, y postula una vía dinámica donde los glicerofosfolípidos (GFLs) son sintetizados a partir de glicerol-3-fosfato [128]. Una vez sintetizados los GFLs también atraviesan procesos de remodelado conocidos como *ciclo de Lands*, donde se modifican los ácidos grasos que se encuentran esterificando al glicerol por medio de la acción secuencial de enzimas fosfolipasas (escinden un ácido graso) y acil-transferasas de lisofosfolípidos (transfieren un ácido graso), PLA y LPLATs respectivamente por sus siglas en inglés [129].

Biosíntesis de PC

La vía de Kennedy para la biosíntesis de PC se inicia a partir de una molécula de colina (Cho, por sus siglas en inglés) e involucra tres pasos enzimáticos catalizados por Colina Quinasa (CHOK, por sus siglas en inglés), CTP: fosfocolina citidiltransferasa (CCT) y CDP-colina: 1,2-diacilglicerol colina fosfotransferasa (CPT) (ver Esquema 9). Además, una vez sintetizada la PC se llevan a cabo procesos de remodelado de los ácidos grasos que esterifican a la molécula, por medio de enzimas lipasas (fosfolipasa A2, PLA2 por sus siglas en inglés) que por hidrólisis de uno de los ácidos grasos produce liso-PC y luego otras enzimas transferasas (acil-transferasas de liso-PC, lysophosphatidylcholine acyltransferases, LPCAT) se encargan de transferir un nuevo ácido graso. Este proceso ocurre también para otros fosfolípidos y se conoce como *Ciclo de Lands* en honor a quien describió por primera vez en 1958 el rápido intercambio de ácidos grasos que ocurre en la posición sn-2 de los glicerofosfolípidos [129]. El remodelado de los lípidos de membrana es un proceso muy dinámico y está involucrado en la fisiopatología de varias enfermedades incluyendo el cáncer y la enfermedad de hígado graso no alcohólico, al modular la composición de las membranas y por lo tanto sus propiedades biofísicas y los procesos biológicos que se llevan a cabo en esta superficie [130].

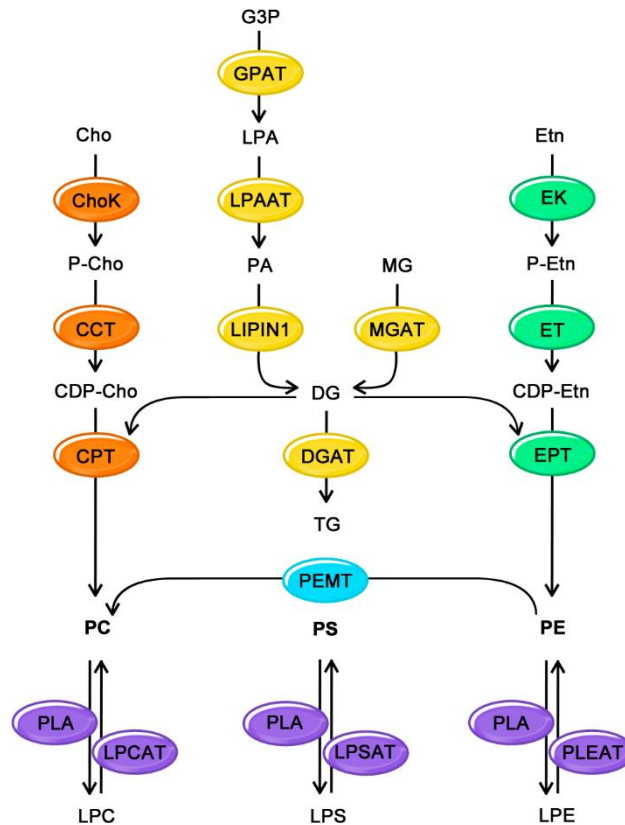
En la vía de *Kennedy* el paso limitante es llevado a cabo por la CCT, y es esta enzima junto a la CHOK las que ejercen la principal actividad regulatoria en muchas condiciones metabólicas [131]. En ciertos estudios con modelos de ratón que no expresaban la enzima CHOK se observó que morían en estadios tempranos de la embriogénesis [131], mientras que la sobreexpresión de la enzima se vinculó a procesos carcinogénicos en humanos [132][133]. También se ha demostrado que la disponibilidad de diacilglicerol (DG), un metabolito intermedio de la vía, influye en la biosíntesis de PC [134][135][136].

En la mayoría de los mamíferos existen dos genes para la enzima CHOK: *CHOK α* codifica para la proteína CHOK α 1/2 y *CHOK β* codifica para la proteína CHOK β [137][138]. En cuanto a la enzima CCT, también es codificada por dos genes diferentes que por medio de procesamientos alternativos del ARNm da lugar a varias isoformas: el gen *PCYT1 α* codifica la isoforma CCT α 1/2 y el gen *PCYT2 β* codifica para las proteínas CCT β 2/3 [139]. La CCT es una enzima muy regulada, que cuando se activa se transloca del citosol a la membrana del retículo endoplásmico (RE) [140][101]. La PC puede también ser generada por intercambio de bases a partir de otros GFLs entre ellos PE.

En el hígado, la PC puede sintetizarse por una vía alternativa a partir de PE. Esta interconversión de fosfolípidos está catalizada por una enzima que se llama fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa (PEMT), que introduce tres restos metilos al sustituyente etanolamina [131][109]. Incluso esta vía puede contribuir con el 40% de la producción total de PC en hígado.

Biosíntesis de PE

En mamíferos la síntesis de *novo* de PE se lleva a cabo a partir de la vía de Kennedy CDP-etanolamina, donde la etanolamina (Etn) es fosforilada por la enzima Etanolamina Quinasa (EK, por sus siglas en inglés). Esta ruta involucra varios pasos enzimáticos donde actúan enzimas citidiltransferasas: CTP:fosfoetanolamina citidiltransferasa (CET) y CDP-Etn: 1,2-diacilglicerol etanolamina fosfotransferasa (EPT). Al igual que en la vía de la PC, la biosíntesis de PE tiene su paso limitante en la acción de la enzima citidiltransferasa (CET), que es codificada por el gen *PCYT2* (revisado en [141]). La PE puede también ser generada por intercambio de bases a partir de otros GFLs entre ellos PC y fosfatidilserina (PS).



Esquema 9. Biosíntesis de glicerofosfolípidos. En el esquema se representan con óvalos a las distintas enzimas involucradas en la biosíntesis de fosfatidilcolina (PC, vía naranja, izquierda. Vía de Kennedy), fosfatidiletanolamina (PE, vía verde, derecha) y triglicéridos (TG, vía amarilla, centro). Además, se representa en la parte inferior del esquema (en color violeta) las enzimas involucradas en el recambio de ácidos grasos de los fosfolípidos PC, fosfatidilserina (PS) y PE (ciclo de Lands). En celeste se muestra la enzima PEMT, encargada de metilar la PE y de esta forma generar PC.

Los lípidos en el metabolismo celular

Triglicéridos, mitocondrias y energía

Como se mencionó previamente, dada su naturaleza anhidra, los lípidos son las moléculas que almacenan mayor cantidad de energía utilizable por la célula. Los múltiples enlaces C-C que contienen los ácidos grasos pueden ser hidrolizados para obtener moléculas más simples que son capaces de oxidarse y producir energía en forma de ATP. Este proceso se lleva a cabo en las mitocondrias por medio de la beta oxidación de ácidos grasos y la cadena de transporte de electrones. De manera resumida, las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos se van clivando cada dos residuos de carbono por medio de varias reacciones enzimáticas, generando como producto final Acetil-CoA. Este intermediario es capaz de ingresar al ciclo de Krebs para generar coenzimas reducidas (NADH y FADH₂) CO₂ y GTP. Estas coenzimas reducidas luego

ingresan en la cadena de transporte de electrones, o fosforilación oxidativa, y promueven la producción de energía en forma de ATP y H₂O [142].

Los lípidos que poseen mayor cantidad de ácidos grasos en su estructura y por lo tanto almacenan mayor energía en sus enlaces son los triglicéridos (TG), también conocidos como triacilglicéridos. Estas moléculas funcionan principalmente como almacén de energía en las células, incluso poseen más energía que los hidratos de carbono. Son moléculas muy insolubles en medios acuosos debido a la presencia de tres cadenas apolares de ácidos grasos en su estructura, con lo cual en el interior celular tienden a almacenarse en orgánulos específicos para lípidos neutros llamadas gotas lipídicas que se describirán en más detalle en la próxima sección. Su oxidación en la mitocondria produce grandes cantidades de ATP, la principal molécula impulsora de los procesos metabólicos.

Los procesos metabólicos que tienen lugar en la mitocondria son llevados a cabo por enzimas que se encuentran ancladas en las membranas de la organela, de modo que existe una importante relación entre la composición lipídica y la funcionalidad mitocondrial. Los lípidos mitocondriales definen las propiedades físicas de las membranas mitocondriales e influyen en la actividad de las proteínas de la cadena de transporte de electrones y por lo tanto la síntesis de ATP [143].

Al igual que ocurre en la membrana plasmática, en la mitocondria los lípidos más abundantes de membrana son PC y PE, y presentan un desbalance normal en su distribución. La membrana interna se encuentra más enriquecida en PE (aproximadamente un 40% del total de fosfolípidos) que en mamíferos es sintetizado *in situ*. Existe evidencia que muestra un efecto severo en el crecimiento y la supervivencia celular cuando el contenido de PE en esta membrana interna se reduce a un 20% aproximadamente. Además, se observó una disminución en la tasa de consumo de oxígeno y la producción de ATP como producto de un defecto en la cadena de transporte de electrones. Otro estudio evidenció una correlación positiva entre la cantidad de PE mitocondrial y el contenido de ATP en hepatocitos [106]. Estos autores observaron que al incrementar la cantidad relativa de PE por medio de la exclusión de la enzima PEMT (que genera PC a partir de PE) se producía un incremento en la respiración mitocondrial y se duplicaban los niveles de ATP en estos hepatocitos, en comparación a aquellos que tenían la enzima PEMT normal (*PEMT^{+/+}*). Estos estudios ponen de manifiesto el importante rol que cumplen los fosfolípidos en el balance de la homeostasis lipídica. De hecho, la disfunción mitocondrial ha sido relacionada con el síndrome metabólico y enfermedades cardiovasculares [144], diabetes [107], enfermedades neurodegenerativas [108] y la progresión del cáncer [145].

El contenido de colesterol también es capaz de influenciar la funcionalidad mitocondrial. En términos generales el colesterol disminuye la fluidez de las membranas generando una barrera hidrofóbica, lo cual dificultaría el correcto funcionamiento del complejo proteico implicado en la cadena de transporte de electrones [125]. El mismo efecto en la fluidez es generado por la presencia de cadenas poliinsaturadas en los ácidos grasos que poseen los fosfolípidos. En particular, una alta fluidez en las membranas mitocondriales permite la alta movilidad de CoQ10 a través de la bicapa y hace posible el transporte de electrones de manera más eficiente entre los complejos II y III [146].

Estrés celular, metabolismo energético y gotas lipídicas

Las gotas lipídicas (GLs) son organelas que tienen un rol activo en el mantenimiento de la homeostasis celular al cumplir múltiples funciones, siendo la principal y más conocida el almacenamiento de lípidos neutros. Coordinan el tráfico y consumo de lípidos involucrados en diversas condiciones celulares como la producción de energía, la protección contra el estrés oxidativo o la biogénesis de membrana durante un rápido crecimiento celular [147]. Están delimitadas por una monocapa de fosfolípidos y proteínas, cuyas regiones hidrofílicas quedan en contacto con el citoplasma celular mientras que las colas hidrofóbicas quedan recluidas en el interior, en contacto con el medio apolar compuesto por lípidos neutros, principalmente triglicéridos (TGs) y ésteres de colesterol. Las proteínas que se encuentran en su superficie no solo los estabilizan, sino que además permiten la síntesis local de lípidos. (revisado en [148]).

Las gotas lipídicas tienen una morfología muy variable determinada por su gran dinamismo tanto en la síntesis como en su degradación. Por un lado, la biogénesis de las GLs se lleva a cabo en el lumen del retículo endoplásmico (RE), donde se nuclea la acumulación de lípidos neutros. La biosíntesis de TGs consiste en la adición secuencial de ácidos grasos activados (acil-CoA). En el primer paso, el glicerol-3-fosfato (G3P, por sus siglas en inglés) se esterifica con un ácido graso, dando lugar a una molécula de ácido lisofosfatídico (LPA). Esta reacción es catalizada por una enzima aciltransferasa llamada glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT). A continuación, se incorpora un segundo ácido graso al glicerol activado por medio de la enzima acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa (AGPAT), lo que da como producto un ácido fosfatídico (PA). Por último, una fosfatasa de ácido fosfatídico (PAP, codificado por el gen *LIPIN1*) escinde el grupo fosfato y da como resultado un diacilglicerol (DG). Por último, a este DG se le incorpora un tercer ácido graso para formar un triacilglicerol (TG) por medio de la enzima diacilglicerol aciltransferasa (DGAT). Estas reacciones pueden llevarse a cabo de manera secuencial en el retículo endoplásmico

durante la biogénesis de las GLs, o en la superficie de las mismas una vez formados, regulando la síntesis local de lípidos. Por otro lado, la degradación de las GLs se lleva a cabo por dos vías principales: la lipólisis o la lipofagia. La primera es llevada a cabo por enzimas lipasas (*adipose triglyceride lipase*, ATGL; *hormone sensitive lipase*, HL; y *monoacylglycerol lipase*, MAGL) y la segunda por autofagosomas, que captan las GLs y las transportan hacia los lisosomas para su degradación y lipólisis ácida, también mediada por lipasas de TGs (*lysosomal acid lipase*, LAL) [148].

Las gotas lipídicas no solo cumplen funciones de almacenamiento sino también se identifican como organelas claves que participan en la regulación del metabolismo celular, el tráfico y la señalización. En cuanto al metabolismo lipídico, las GLs coordinan las vías de captación, distribución, almacenamiento y uso dentro de las células. Una de las principales características de estas organelas es su capacidad para actuar de manera muy dinámica de acuerdo a los requerimientos de la célula, siendo un sistema *buffer* ante el exceso de lípidos. Al mantenerlos almacenados en su interior se genera un desfase en la disponibilidad de estos lípidos desde su síntesis hasta su utilización, lo que implica un punto de control clave en la biodisponibilidad de estos y otros metabolitos [149].

Las GLs poseen un rol pleiotrópico en la respuesta al estrés celular. Al mantener una interacción dinámica con las mitocondrias mantienen la homeostasis energética y redox, suministrando ácidos grasos para la producción óptima de energía. Por otro lado, ejercen protección contra la lipotoxicidad, secuestrando lípidos tóxicos como ácidos grasos, colesterol y ceramidas en su interior, lo que establece un complejo vínculo con procesos de autofagia. Además, participan en el mantenimiento de la homeostasis de membranas y organelas al regular la composición de las membranas, previniendo la peroxidación lipídica y removiendo lípidos y proteínas dañadas. Otro de los mecanismos celulares con los que guarda estrecha relación es la autofagia, donde las GLs actúan como reservorios de lípidos bioactivos que regulan las respuestas inflamatorias y la inmunidad [149].

Existe un sistema sumamente regulado que censa la disponibilidad de nutrientes y coordina el destino de estos metabolitos en pos de los requerimientos celulares. Como resultado final se promueven vías como la captación, distribución, reciclado o almacenamiento a fin de mantener la homeostasis celular. Este sistema está controlado principalmente por dos elementos altamente conservados: AMPK (*AMP-activated protein kinase* o proteína quinasa activada por AMP) y mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1* o complejo 1 sensible a rapamicina) [150].

La AMPK censa la disponibilidad de nutrientes tales como los niveles de energía, de nucleótidos (principalmente adenina) y glucosa, entre otros. Se activa ante diversas situaciones de estrés celular tales como el estrés de nutrientes, el estrés oxidativo, o la presencia de genotoxinas y xenobióticos. En relación a la demanda energética, AMPK censa la relación AMP:ATP y activa o reprime procesos celulares en función a la energía disponible. Así, cuando hay un déficit de energía en la célula, se reprimen los procesos anabólicos como la biosíntesis *de novo* de ácidos grasos, colesterol y triglicéridos [151][152] y promueve la producción de ATP mediante la glicólisis, la biogénesis mitocondrial y la fosforilación oxidativa [153][154][155].

En cuanto al complejo mTORC1, en términos generales es activado en condiciones opuestas a las que activan la AMPK, es decir, cuando existe una gran disponibilidad de energía. Cuando hay abundancia de nutrientes, mTORC1 promueve vías anabólicas para fomentar el crecimiento celular, como la síntesis de colesterol, ácidos grasos y glicerolípidos (por medio de la regulación del factor de transcripción SREBP: *sterol regulatory element-binding protein*), mientras que inhibe el catabolismo lipídico. mTORC1 es reprimido por AMPK, y regulado negativamente ante la carencia de metabolitos como glucosa o aminoácidos. mTORC1 también es conocido como un fuerte represor de la autofagia [153].

Diversos procesos metabólicos son afectados como consecuencia de respuestas celulares específicas activadas o reprimidas en pos de la biodisponibilidad de nutrientes. En particular, las gotas lipídicas responden a desbalances de nutrientes y energía, al estar vinculado su metabolismo con las vías regulatorias de AMPK y mTORC1. Esto se hace más evidente en condiciones de estrés celular. En diversos estudios realizados en levaduras en crecimiento se observa que a tiempos cortos los precursores lipídicos son utilizados principalmente en la síntesis de membrana, mientras que a tiempos largos cuando la disponibilidad de nutrientes escasea, los lípidos son redireccionados y almacenados en gotas lipídicas para permitir la supervivencia celular. También se evidencia que este mecanismo se encuentra acompañado por un cambio en el metabolismo energético de las levaduras, el cual vira desde la fermentación a la respiración oxidativa ante el déficit de nutrientes. En levaduras, SNF1 es el análogo de AMPK, y es una proteína capaz de censar los niveles de glucosa, y ante una disminución revierte su represión sobre la expresión de genes de la vía oxidativa [156]. Otro dato interesante es que este cambio energético se da en correlación con la activación de la enzima PAH1 (PAP en mamíferos) que es clave para la síntesis de TG y es indirectamente regulada por mTORC1 [157][158][149].

Gotas lipídicas y cáncer

El **cáncer** constituye un contexto de estrés celular donde las células tumorales normalmente presentan cambios en su metabolismo como mecanismo de adaptabilidad y supervivencia. La proliferación es un factor común en todos los tipos de cáncer, y depende entre otras cosas de la disponibilidad de lípidos como precursores para la síntesis de membrana y moléculas señal. La reprogramación del metabolismo lipídico por ejemplo es esencial para varios aspectos de la tumorigénesis al involucrar cambios en la lipogénesis *de novo*, la oxidación de ácidos grasos (AGs) y el metabolismo de fosfolípidos y lípidos neutros [159][160]. En varios tipos de cáncer se observó un incremento en la síntesis *de novo* de AGs, lo que sugiere que la disponibilidad de AGs es fundamental para la supervivencia y proliferación de células tumorales al igual que su oxidación. De hecho, se observó que células tumorales expuestas a nutrientes u oxígeno limitados, son capaces de incorporar AGs de múltiples fuentes: incrementando la captación desde el medio extracelular, incrementando la síntesis de AGs (comúnmente observado en varios tipos de cáncer independientemente la disponibilidad de AGs externas) y/o la movilización endógena de lípidos (por la ruptura de membranas de organelas vía autofagia y/o por el remodelado de membranas por la acción de fosfolipasas) [159]. Las gotas lipídicas como centros reguladores de estas vías celulares de adquisición de lípidos están cobrando interés como posibles dianas para el manejo del estrés celular en el cáncer [161].

En varios tipos de cáncer se observó acumulación de gotas lipídicas, sobre todo en condiciones de hipoxia o deprivación de nutrientes. Varios estudios postulan que estas organelas actúan como moduladores del estrés nutricional y oxidativo, contribuyendo así al crecimiento y supervivencia de las células tumorales, lo que sugiere un punto atractivo a evaluar en lo que respecta a la resiliencia tumoral ante condiciones de estrés [162][163].

La enzima AMPK por su parte, promueve la adaptación metabólica en células tumorales al mantener los niveles intracelulares de ATP. Ciertos estudios demostraron que células deficientes en AMPK son resistentes a la transformación oncogénica, posiblemente debido a la adaptabilidad metabólica de la enzima, lo que resulta crucial en la supervivencia de células cancerígenas. La AMPK también mantiene los niveles de NADPH disminuyendo su utilización en la síntesis de ácidos grasos e incrementando su producción por medio de la oxidación de ácidos grasos. Estos procesos se regulan a través de la inhibición (fosforilación por acción de la AMPK) de acetil-CoA carboxilasas ACC1 y ACC2. En modelos de estudio donde se bloquea la expresión de ACC1 o ACC2 se promueven el crecimiento y la formación de tumores sólidos in vivo, mientras que la activación de estas carboxilasas atenúa estos procesos oncogénicos. De hecho, el mantenimiento de los

niveles de NADPH es el mecanismo predominante por el cual la AMPK promueve la supervivencia celular durante situaciones de estrés celular [155].

Los lípidos en la homeostasis hepática

El rol de PC y ácidos grasos en el transporte de lípidos

El hígado es un órgano clave en la fisiología del organismo, siendo el mayor integrador metabólico y un eje central en la homeostasis lipídica y energética al tener un rol muy activo en el metabolismo de triglicéridos y glicerofosfolípidos. De hecho, dado que ejerce funciones vitales para el funcionamiento del organismo en su conjunto, el hígado constituye uno de los pocos órganos con la capacidad de regenerarse y recuperar hasta dos terceras partes de su volumen original por medio de la activación controlada de la proliferación celular [164]. Ciertos estudios han demostrado que para mantener un crecimiento, proliferación y supervivencia celular en hepatocitos es crucial la síntesis de PC [165], al tratarse de uno de los fosfolípidos más abundantes y necesarios para la biogénesis de membranas como se detalló previamente. En mamíferos se han observado severos efectos en la fisiología o incluso letalidad en modelos de estudio donde se generó la disrupción de genes que codifican para enzimas de la biosíntesis de fosfolípidos [131][166].

La homeostasis de PC en el hígado se encuentra regulada por su anabolismo y catabolismo, así como también por su captación y secreción. Los fosfolípidos son moléculas claves para la formación y estabilidad de lipoproteínas, ya que junto con el colesterol forman una monocapa alrededor de lípidos neutros como TG, ésteres de colesterol y en menor medida diacilglicerol y esfingolípidos. En humanos el ensamblado de lipoproteínas ricas en TGs en el hígado llamadas VLDLs (*very low density lipoproteins*) requiere de la apolipoproteína apoB100 así como también de una buena cantidad de PC, ya que conforma el 60-80% de los fosfolípidos de la superficie de este tipo de lipoproteínas [167]. Ciertos estudios demostraron que la reducción en la síntesis de PC dificulta la secreción de VLDLs, particularmente a nivel de RE, donde la falta de PC en la membrana causa la degradación de las partículas nacientes de VLDLs [168]. En este proceso también interviene la composición de ácidos grasos de las PCs, ya que la membrana del RE requiere cierta fluidez para la correcta transferencia de lípidos hacia la apoB, lo cual está dado por la presencia de ácidos grasos poliinsaturados en la posición sn-2 de los fosfolípidos que componen la membrana [169]. La composición de los ácidos grasos está regulada por el *ciclo de Lands* como se mencionó previamente, y particularmente en hígado la enzima LPCAT3 cobra un rol fundamental. Se observó que la delección de LPCAT3 en hígado causa la acumulación de TGs

debido a un impedimento en la lipidación y secreción de VLDLs, y eso se asocia a la disminución del ácido graso araquidónico en las PCs [170].

El desbalance PC/PE y su correlación con patologías hepáticas

La síntesis de fosfolípidos juega un rol vital en la supervivencia celular, el desarrollo y la salud, ya que pequeñas alteraciones en sus niveles tienen implicancias en patologías metabólicas como hígado graso, obesidad y resistencia a la insulina. Ciertos modelos de estudio en ratón y humanos proponen que el balance de **la relación molar PC/PE** es un determinante clave en lo que respecta a salud hepática. Valores anormalmente altos o bajos en la relación molar de PC/PE en varios tejidos tiene influencia en el metabolismo energético y está vinculada con la progresión de diversas patologías. Se observó que el desbalance en la síntesis de PC estaba asociado a la enfermedad del hígado graso [171], a la falla hepática [172], obesidad, resistencia a la insulina y aterosclerosis. En estudios con pacientes con esteatohepatitis no alcohólica (NASH) se observó una menor relación PC/PE respecto a hígados sanos. Esta y otras evidencias sugieren que variaciones en los niveles de PC/PE afecta la integridad de las membranas e inicia una respuesta inflamatoria que resulta en daño hepático [171]. Este efecto se vincula a un aumento en el flujo de componentes que atraviesan estas membranas dañadas, incluyendo la entrada de citoquinas extracelulares que promueven las respuestas inflamatorias. Además, se ha visto que la proteína C reactiva (proteína de respuesta inflamatoria aguda) se une con mayor facilidad a membranas con una relación PC/PE disminuida [173].

La relación PC/PE también afecta la dinámica y funcionalidad de las membranas que recubren las gotas lipídicas (GLs). Una disminución en la síntesis de PC en condiciones donde se promueva el almacenamiento de TG produce el incremento del tamaño de las GLs. Este efecto se asocia a la menor superficie de membrana (y por lo tanto de PC) necesaria en GLs grandes respecto a las pequeñas. También se observó que el incremento relativo de PE en la membrana de las GLs incrementa la fusión de pequeñas GLs a otras de mayor tamaño [174].

V. REGULACIÓN CIRCADIANA DEL METABOLISMO LIPÍDICO

Como se describió en detalle en la primera sección, muchos procesos fisiológicos y de comportamiento no se llevan a cabo de manera constante, sino que ocurren de forma dinámica y rítmica con una cierta periodicidad. Muchos de ellos mantienen ritmos de aproximadamente 24

h (ritmos circadianos) como los ciclos de sueño y vigilia, los patrones de alimentación y el metabolismo energético. El sistema circadiano se encarga de generar y coordinar estos ritmos de manera endógena de modo que se puedan mantener los patrones temporales aún en ausencia de señales externas de sincronización.

Es esperado que el metabolismo lipídico se encuentre regulado por el sistema circadiano dada su implicancia en el metabolismo energético, la señalización celular, el transporte y la fisiología celular (ver Esquema 10). En el último tiempo cada vez más estudios indican que la desregulación del metabolismo lipídico, la obesidad y las enfermedades metabólicas pueden ser promovidas por una disrupción del reloj circadiano[5]. Nuestro laboratorio ha sido pionero en el estudio del metabolismo de GFLs en distintas poblaciones celulares y órganos bajo diversas condiciones fisiológicas desde un punto de vista cronobiológico, aspectos que se abordarán en detalle en las próximas secciones [revisado en [28]].

Regulación del metabolismo de ácidos grasos

La síntesis de ácidos grasos presentan una variación temporal en parte dado por la regulación circadiana sobre la proteína **SREBP1c** (*sterol regulatory element-binding protein-1c*) y otros elementos aguas abajo [175][176]. En adipocitos se observó una regulación temporal del receptor nuclear **PPAR γ** involucrado en la síntesis y almacenamiento de ácidos grasos [177].

En hígado, todos los miembros de la familia de receptores nucleares **PPAR** están regulados temporalmente [25]. Particularmente **PPAR α** promueve la beta oxidación de ácidos grasos en la mitocondria por medio de su interacción con el co-activador 1α de **PPAR γ** (**PGC-1 α**). A su vez, **PGC-1 α** se encarga de la coordinación del sistema circadiano y el metabolismo energético. Regula la expresión de genes reloj interaccionando con miembros de la familia ROR, y es fundamental para la función del reloj presente en hígado [178].

En músculo esquelético se observó que la mayoría de los transcriptos regulados por el reloj están relacionados con vías metabólicas de lípidos [179] entre los que se encuentran receptores nucleares y sus co-reguladores, genes que involucran la beta oxidación de ácidos grasos, la síntesis lipídica y la hidrólisis de triglicéridos.

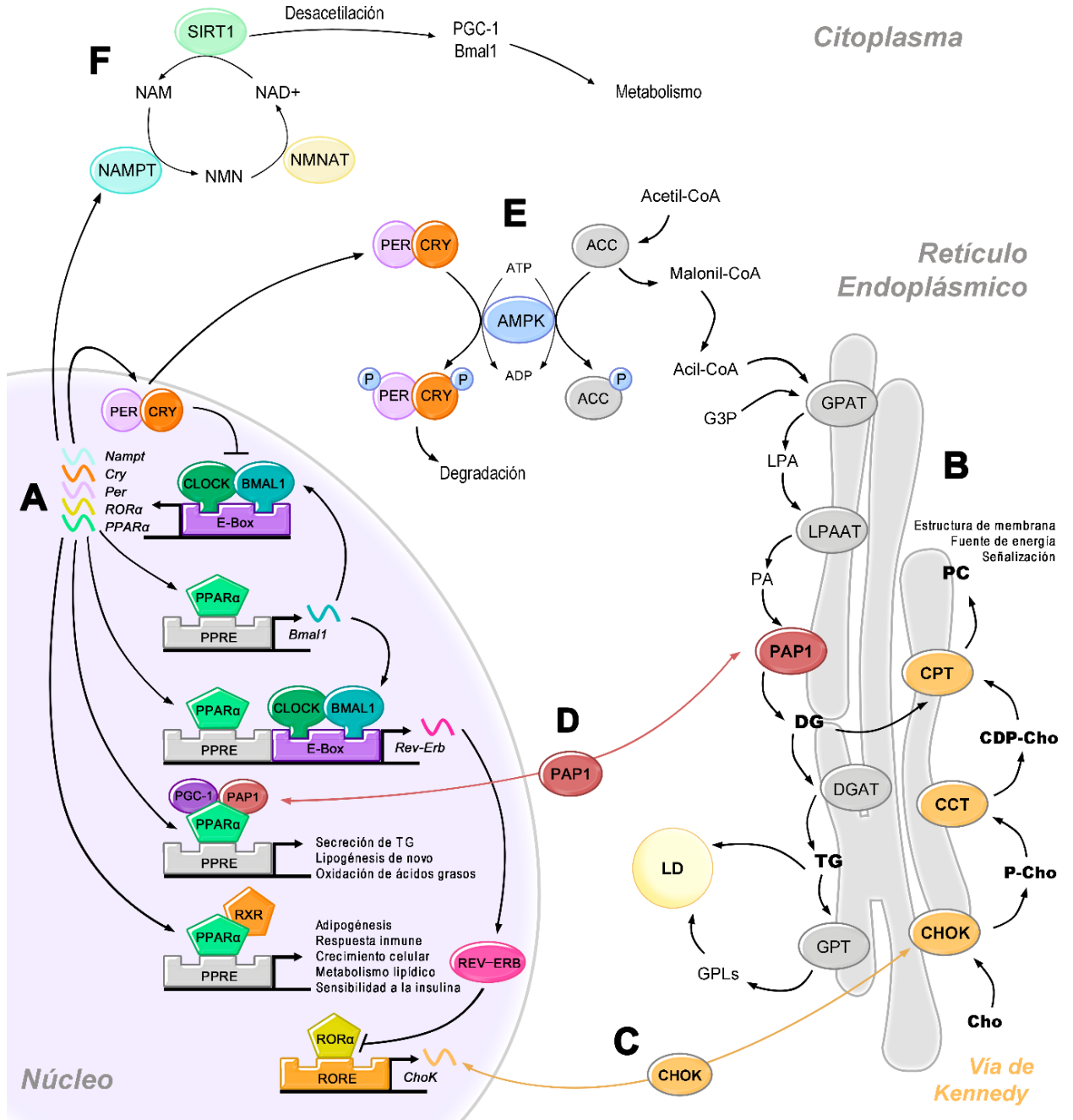
En resumen, el sistema circadiano se encuentra en una dinámica interacción con receptores nucleares, por medio de los cuales coordina diversos procesos metabólicos tales como la síntesis y oxidación de ácidos grasos, la producción de energía, la biogénesis mitocondrial y la autofagia. En este sentido, la superfamilia de factores de transcripción denominados receptores nucleares

son elementos claves de regulación, al activar o reprimir programas metabólicos específicos de genes en respuesta a diversas señales de hormonas, nutrientes, metabolitos y estado redox de la célula [180].

Regulación de la biosíntesis de glicerofosfolípidos

Nuestro laboratorio ha investigado la regulación circadiana del metabolismo de glicerofosfolípidos (GFLs) en células retinales [181][182][183], en hígado de ratón [91] y en cultivos de fibroblastos NIH3T3 [184][185]. Células NIH3T3 y otras líneas inmortalizadas presentan oscilaciones circadianas en la expresión génica [186] y en la síntesis de GFLs [184][185] luego de ser sincronizadas. También hemos encontrado que la síntesis de PC presenta una oscilación circadiana en la incorporación de ³H-glicerol y ³²P-fosfato, en la expresión de la enzima colina quinasa (CHOK), en la actividad de la enzima limitante CTP:fosfocolina citidil transferasa (CCT) y en su acil-transferasa (LPCAT) en fibroblastos en cultivo y en hígado de ratón. Además se observaron cambios significativos en los niveles de RNA de PEMT y en la actividad de la PAP1 [91][184].

Como se mencionó previamente, una célula que mantiene una proliferación activa necesita sintetizar activamente GFLs (principalmente PC y PE) para generación de nuevas membranas y segundos mensajeros. El cáncer representa una condición patológica con una activa división celular. Una característica frecuente observada en varios tipos de células tumorales fue la sobreexpresión de la enzima colina quinasa, la primera involucrada en la biosíntesis de PC (ver Esquema 9), por lo que podría jugar un rol clave en la proliferación celular.



Esquema 10. Esquema de la interacción entre el reloj molecular y la biosíntesis de glicerolípidos. **A)** A la izquierda se esquematiza el núcleo celular. En su interior se presentan las proteínas reloj (BMAL1, CLOCK, PER y CRY) y su rol como factores de transcripción, regulando la expresión de genes involucrados en el metabolismo lipídico. **B)** En el lado derecho del esquema se representa el retículo endoplásmico donde se alojan los complejos enzimáticos involucrados en la biosíntesis de PC (vía de Kennedy, en naranja) y TG (en color gris). **C)** La enzima colina quinasa (CHOK) es regulada a nivel de promotor por el reloj molecular y ejerce su función en la biosíntesis de PC. **D)** La enzima PAP1 tiene un rol dual en la biosíntesis de TG y como factor de transcripción regulando diversos procesos del metabolismo lipídico. **E)** La enzima AMPK regula mediante fosforilación la degradación de los elementos de regulación negativa del reloj, PERs y CRYs. También controla la acción de la enzima ACC encargada de generar malonil-CoA a partir de acetil-CoA, precursores necesarios para la biosíntesis de novo de lípidos. **F)** La enzima NAMPT (significado de siglas) es

regulada transcripcionalmente por el reloj y tiene la función esencial de controlar el balance redox en la célula, al ser la enzima limitante de la vía de reciclado de NAD⁺ en las células [40] [41] [187]. El NAD⁺ a su vez es sumamente importante en la regulación del metabolismo ya que es la coenzima utilizada por SIRT1, una deacetilasa que modula diversos elementos implicados en el metabolismo celular tales como PGC-1 α y BMAL1. Esquema modificado de [28].

VI. DISRUPCIÓN CIRCADIANA, METABOLISMO Y CÁNCER

En mamíferos existen muchos procesos metabólicos que se encuentran influenciados por el reloj biológico e incluso por ritmos en la alimentación. El mecanismo por medio del cual se acoplan las oscilaciones circadianas con el metabolismo esta emergiendo de manera paulatina en los últimos tiempos. El hígado murino es un modelo de estudio muy interesante en este campo a tratarse de un oscilador periférico que integra una gran cantidad de procesos metabólicos claves, principalmente relacionados con el metabolismo lipídico. De hecho, existen varios estudios transcriptómicos, proteómicos, lipidómicos y metabolómicos que demuestran un control circadiano sobre la fisiología y el metabolismo [188][189][190][27]. Por ejemplo, se demostró que alrededor de un 10 % de los ARNm se expresan de una manera rítmica en hígado, y muchos de ellos se encuentran involucrados en procesos de biosíntesis o catabolismo de lípidos, tales como el colesterol y los triglicéridos. En otros estudios realizados en hígado de ratón y en plasma y saliva humana, se evaluaron cientos de metabolitos primarios a lo largo del día y se determinó que una gran fracción de los que presentaron oscilaciones fueron lípidos [191][192]. Estos estudios y muchos otros más demuestran como el reloj circadiano juega un rol fundamental en el desarrollo de fisiopatologías metabólicas, principalmente aquellas que se vinculen con el metabolismo de los lípidos. Diferentes modelos animales de disrupción del reloj demostraron este vínculo existente entre los lípidos y la maquinaria del reloj, ya que se observaron fenotipos metabólicos anormales como resultado de la alteración en la coordinación circadiana. Estos cambios incluyen obesidad, dislipidemia, desbalance en la secreción de insulina, intolerancia a la glucosa e hipertensión, además de contribuir al desarrollo del síndrome metabólico. Ratones mutantes para los genes de *CLOCK* y *BMAL1* desarrollaron hiperlipidemia y esteatosis hepática [193][194], ratones deficientes para *PER2* desarrollaron un metabolismo lipídico alterado [195] y ratones donde se eliminaron los genes de *REV-ERB* desarrollaron esteatosis hepática [196]. A nivel molecular, genes involucrados en el metabolismo de esteroides, lípidos y triglicéridos presentan unida la proteína BMAL1 a sus regiones reguladoras en momentos particulares del día [197][198]. Un estudio realizado en pacientes con obesidad demostró que ciertas variantes alélicas del transcrito del gen *CLOCK* se asocian con un mayor riesgo de obesidad o sobrepeso, demostrando que una alteración en el sistema circadiano resulta en cambios fisiopatológicos vinculados al

síndrome metabólico y la acumulación de lípidos [199]. Las proteínas reloj también participan en otras vías involucradas en diversos desórdenes metabólicos y en el cáncer, y son capaces de censar el medio ambiente celular y regular la expresión y secreción de factores con funciones parácrinas o endócrinas [200].

La carcinogénesis es un largo proceso patológico que resulta en la acumulación de alteraciones genéticas primariamente en genes involucrados en la regulación del crecimiento celular y la división. Entre las características típicas de los procesos neoplásicos se encuentran la activación proliferativa sostenida, la evasión de supresores del crecimiento, la resistencia a la muerte celular, la inmortalidad replicativa, la inducción de angiogénesis, la capacidad de invasión y metástasis, la reprogramación del metabolismo energético y la evasión del sistema inmune [201]. Como se describió en secciones anteriores, el reloj circadiano es un regulador maestro de la fisiología y procesos biológicos claves y posee un rol fundamental en el mantenimiento de la homeostasis metabólica. De hecho, en el último tiempo se ha identificado a la disrupción circadiana como un factor de riesgo para el cáncer, y fue clasificado como carcinógeno del grupo 2A. En este contexto, el conocimiento a nivel molecular de la biología circadiana y su vinculación con el metabolismo celular puede contribuir significativamente al entendimiento y potencial tratamiento oncológico. Si bien se ha establecido una estrecha relación entre los relojes circadianos y el metabolismo celular [189][190] poco se conoce acerca del funcionamiento de los mismos en la regulación del metabolismo lipídico de células cancerígenas.

Particularmente en lo que respecta a estudios realizados en células cancerígenas de hígado HepG2 en comparación a su contraparte normal (hígado sano), Panda y colaboradores realizaron un detallado trabajo de revisión donde ordenaron temporalmente datos de expresión génica para poder comparar diferencias entre sus patrones temporales. Estos análisis determinaron que cerca de un 15% de los transcritos no presentan ritmos en la escala circadiana (períodos cercanos a las 24 horas) en células cancerígenas comparadas a las normales [202]. Algo similar se observó al contrastar los perfiles de expresión de melanoma metastásico y de piel normal, lo que sugiere una alteración en las oscilaciones circadianas en células cancerígenas respecto a su contraparte sana [203].

Actividades que alteran la homeostasis endógena por la exposición a señales externas se han visto incrementadas en el mundo industrializado. La vida moderna se caracteriza por un incremento en las actividades nocturnas, lo que supone una exposición prolongada a las luces artificiales. También genera alteraciones en los patrones de alimentación, fomentados por las dietas hipercalóricas y el advenimiento de las comidas rápidas. Además, incrementaron alteraciones del sueño fomentado por los turnos rotativos o trabajos nocturnos. Como

consecuencia, la disrupción circadiana emergió en las últimas décadas como un nuevo concepto caracterizado por la pérdida de correlación entre los componentes del sistema circadiano (disminución de la amplitud de las oscilaciones, modificación en los picos de actividad o la amplitud de los ciclos) [204]. La disrupción circadiana es considerada un factor que contribuye al desarrollo de obesidad, diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico, desórdenes inflamatorios y cáncer [205][206][207][208][209][210][211]. En condiciones neoplásicas, la homeostasis de células y tejidos puede ser evadida para asegurar una proliferación exacerbada, junto a la evasión del sistema inmunológico y la resistencia a la apoptosis, todos identificados como marcadores tumorales [201]. Para llevar a cabo estos procesos las células neoplásicas requieren un incremento significativo en la biogénesis de membrana, los sustratos bioenergéticos y los metabolitos intermediarios derivados de la glucólisis aeróbica (efecto *Warburg*) y el metabolismo lipídico.

El efecto *Warburg* describe la forma en que las células tumorales obtienen la mayoría de la energía por medio del alto consumo de glucosa y su conversión en ácido láctico por medio de la glucólisis, en lugar de generar energía por medio de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias como ocurre en las células normales. En varios tipos de tumores se observó una reprogramación metabólica [212], donde se puso en evidencia la sobreexpresión o activación de enzimas involucradas en la síntesis *de novo* de ácidos grasos para mantener una lipogénesis activa [213][214]. Asimismo, la expresión de varios genes involucrados en el transporte y metabolismo de la glucosa es controlado por el reloj circadiano [116][215].

La reprogramación del metabolismo energético que se da en las células tumorales, donde predomina la utilización de la actividad glucolítica en lugar de la respiración mitocondrial aún en condiciones aeróbicas (conocido como efecto *Warburg*), es caracterizada por una alta formación de NADPH, una disminución en la actividad del ciclo del ácido tricarboxílico y un incremento en la síntesis de ácidos grasos [216]. Recientes estudios establecieron la relación entre estos procesos y el reloj circadiano [217][218]. Además, se evidenció que alteraciones en las vías de las pentosas fosfato, que generan NADPH, está estrechamente controlado por el reloj circadiano [38].

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

I. MANTENIMIENTO DE CULTIVOS CELULARES

Se utilizó como modelo de estudio una línea celular derivada de hepatocarcinoma humano denominada HepG2 (ATCC Cat# HB-8065, RRID: CVCL0027), las cuales presentan una morfología de tipo epitelial y poseen un cariotipo con un número modal de 55 cromosomas (rango entre 50 y 60 cromosomas). Las células fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's médium, Gibco, BRL, Invitrogen, Carlsbad, CA; USA*) suplementado con suero fetal bovino (*SFB Gibco o Natocor, Córdoba, Argentina*) al 10% v/v de acuerdo con Wagner et al. 2019 [93], y mantenidas en estufa con 5% de CO₂ a 37 °C.

Los repiques celulares se realizaron una vez que llegaban al 90% de confluencia aproximadamente o a las 36 horas del repique anterior, lo que ocurriera primero. Para el repique primero se aspiró y descartó el medio de cultivo y se realizó un lavado con buffer PBS 1X para descartar los restos de medio remanente. Luego se agregó la enzima tripsina (0,25% en EDTA) (350 µL en el caso de usar placas de 6 cm o 200 µL si se usan placas de 3,5 cm), una proteasa que digiere las proteínas implicadas en la adhesión celular a la placa de cultivo. Se incubó durante 5 minutos en estufa a 37 °C y luego se desactivó la enzima agregando medio de cultivo con 10% SFB en una relación 3:1 respecto al volumen usado de tripsina. Se homogeneizó con pipeta y se recuperó el pellet celular por centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos. Las células fueron resuspendidas en 1 mL de medio de cultivo (DMEM + SFB 10%) y una alícuota de esta solución fue agregada en una nueva placa con medio fresco.

Para los experimentos se procuró trabajar con células que tuviesen la menor cantidad de pasajes posibles (alrededor de 6) a fin de mantener la identidad poblacional y preservar las características genéticas y epigenéticas lo más homogéneas posibles. Las células se conservaron a -80°C o en nitrógeno líquido dependiendo el tiempo necesario de almacenamiento hasta su utilización. Los crioviales se descongelaron por centrifugación, pudiendo de este modo descartar el DMSO presente en el medio de congelación. Se resuspendió el pellet celular en medio fresco (al 10 o 20% de SFB según sea necesario para asegurar su recuperación) y se pasó todo el contenido a una placa de cultivo nueva. Las células se mantuvieron en estufa a 37 °C y 5% CO₂ y a las 24 h se realiza un recambio de medio de cultivo. Se mantiene la expansión hasta que se alcanza el número necesario de células para comenzar el experimento. De los primeros repiques, de ser necesario, se prepararon stocks para guardar células en nitrógeno líquido. A tal fin, el pellet

celular se resuspende en SFB con 5% de DMSO, se congela a -20°C. Una vez congelado se pasa a -80°C y finalmente se guarda en nitrógeno líquido.

II. DISRUPCIÓN DE *BMAL1* POR CRISPR-CAS9

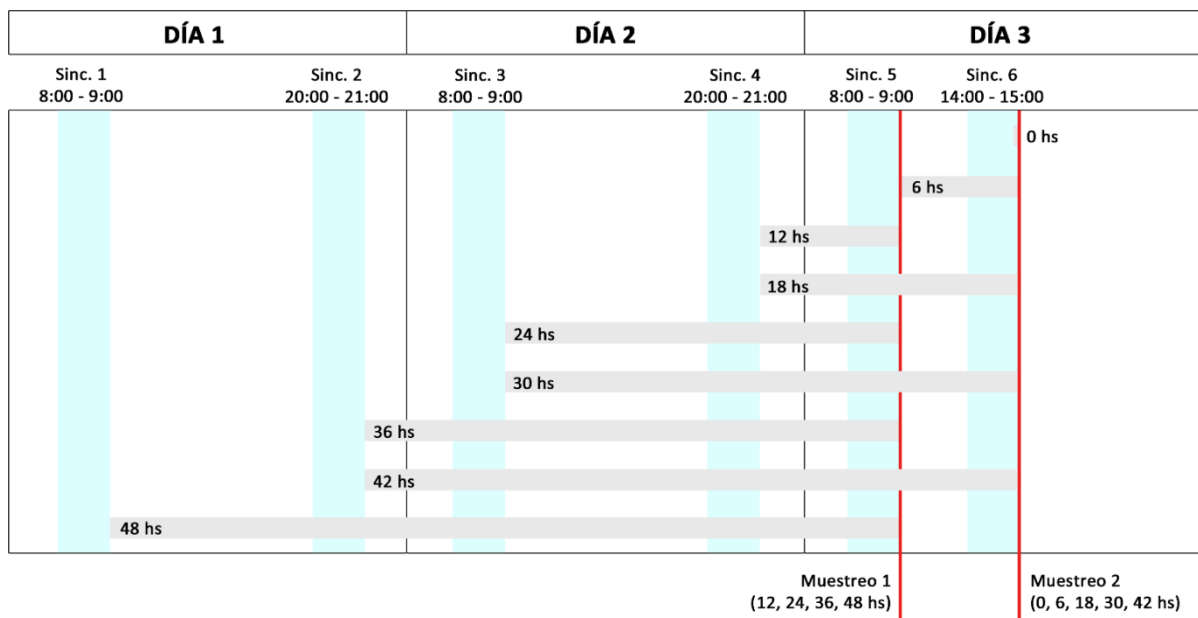
Se generó una disrupción en la expresión de *BMAL1* en células HepG2 normales usando la tecnología de edición génica CRISPR/Cas9 como se describió previamente [219]. Se diseñó un RNA guía que tiene como diana específica en la región 5'UTR del gen de *BMAL1* en humanos, y se clonó en un vector PX459 (*Addgene*) para obtener el plásmido PX459-*BMAL1*. La secuencia correspondiente al RNA guía fue 5'CTGGCTAGAGTGTATACGTT 3' y la complementaria 5'GACCGATCTCACATATGCAA 3'. Las células fueron transfectadas con el plásmido utilizando Lipofectamina 2000 (*Invitrogen*) y seleccionadas con puromicina (2 µg/mL) durante 24 h. A continuación, se realizaron diluciones seriadas de estas células en una placa de 96 pocillos y se continuó con la selección y expansión clonal. Al final del proceso se aislaron tres poblaciones clonales que partieron de células únicas y luego de evaluar el efecto de la disrupción por WB e ICC se seleccionó uno de los clones (el que evidenció mayor efecto de la disrupción) y se lo denominó B-D (modelo de disrupción en *BMAL1*). Las células transfectadas con el vector control se denominaron B-WT (*BMAL1 Wild Type*).

III. TRATAMIENTO CON SR9009 Y SOBREVIDA CELULAR

Ambos modelos de estudio (B-WT y B-D) fueron tratados con el compuesto SR9009 (*Millipore* #554726), el cual actúa como agonista específico de la proteína reloj REV-ERB. Se sembraron células en una placa de 96 pocillos a una densidad de 1×10^4 , y fueron incubadas en estufa durante toda la noche para permitir su adhesión. Luego se realizó el tratamiento con la droga a una concentración final de 0, 5, 10, 20 y 40 µM durante 96 h. Luego del tratamiento se evaluó la supervivencia celular en cada modelo de estudio con un ensayo de MTT (bromuro de 3-(3,4-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, 5 mg/mL, Sigma #M2128). Para este ensayo se agregaron 10 µL del reactivo por pocillo, e incubados durante 2 h en estufa protegido de la luz. Luego, se descartó el medio y se agregaron 100 µL de DMSO:isopropanol (1:1, v/v) a cada pocillo y se resuspendieron las células en este medio. Luego de incubar a temperatura ambiente durante algunos minutos en oscuridad la placa fue medida a 570 nm en el espectrofotómetro *Epoch*. Como control positivo de supervivencia se utilizaron células sin el tratamiento con la droga SR9009. Como blanco se utilizaron pocillos con células sin el agregado de MTT

IV. SINCRONIZACIÓN DE CULTIVOS CELULARES

En los estudios circadianos se parte de un conjunto de células, se las cuenta en cámara Neubauer, y se siembra la misma cantidad en todas las placas que se necesitan para el experimento. Las células se dejan crecer en estufa con 5% CO₂ y 37°C y al día siguiente se comienza con la sincronización. La sincronización se realizó con la incubación de Dexametasona (DEX) a concentración final de 100 nM en DMEM (sin SFB) durante 1 hora en estufa a 37°C y 5% de CO₂. Previamente se descartó el medio de cultivo y se realizó un lavado con PBS 1X. Luego de la sincronización se cambió el medio por DMEM + 5% SFB y se mantuvieron las células creciendo hasta el momento de procesarlas. A continuación, a modo de ejemplo se muestra el protocolo de sincronización y recolección de una curva de 48 h.



Esquema 11. Protocolo de sincronización. La sincronización se realizó mediante un pulso de 100 nM de dexametasona (DEX) durante una hora (barras verticales celestes). Para un muestreo de 48 horas en intervalos de 6 h se utilizaron tres días para el protocolo de sincronización y toma de muestra. El tiempo post-sincronización se lo comienza a contabilizar luego de la hora destinada a la sincronización, de modo que la muestra a tiempo 0 h está constituida por células que se procesaron inmediatamente luego de cumplirse la hora de exposición a la DEX. Al tratarse de experimentos en proliferación, luego de la sincronización las células fueron mantenidas en estufa con medio de cultivo completo con 5 % de suero (barras horizontales grises). Las células fueron procesadas en dos tandas (líneas rojas), la primera a las 9:00 h del día 3, y la segunda a las 15:00 h del mismo día.

V. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS Y AMPLIFICACIÓN POR PCR

El ARN total fue extraído utilizando TRIzol (Invitrogen #15596-026) o Tri Reagent (MRC #TR118) siguiendo las especificaciones del fabricante. El rendimiento y pureza del ARN total fue estimado mediante el cociente de la densidad óptica a 260/280 nm.

La síntesis del ADN complementario se realizó a partir de 2 µg de ARN total utilizando la enzima M-MLV (transcriptasa reversa, Promega #M1701). Para la reacción también se utilizó Oligo-dT (50 pmol, Biodynamics #B071-40), dNTPs (520 µM de cada uno, Promega #U1240) y agua DEPC (libre de nucleasas de ADN y ARN) hasta llegar a un volumen final de reacción de 25 µL. El ADNc obtenido fue guardado a -20 °C hasta su uso.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo final se realizó principalmente para evaluar los cebadores o *primers*. Se utilizaron 2 µL de ADNc por reacción, 0.75 µL de *primers* (mezcla 10 µM de *forward* y *reverse*), 0.5 µL de dNTPs 10mM (Promega #U1240) y 0.025 µL de enzima GoTaq (Promega #M3001). La reacción se llevó a cabo en un termociclador con el siguiente protocolo:

PASO	Nº CICLOS	TIEMPO	TEMPERATURA
DESNATURALIZACIÓN	1	5 min	95 °C
DESNATURALIZACIÓN	30 - 35	30 seg	95 °C
HIBRIDACIÓN		60 seg	T _m *
EXTENSIÓN		30 seg	72 °C
EXTENSIÓN	1	5 min	72 °C

Tabla 2. Protocolo de PCR. Se especifican los números de ciclos, tiempos y temperaturas utilizadas en cada etapa de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). T_m*temperatura de hibridación característica de cada primer. Ver tabla 3.

Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 2% p/v conteniendo Bromuro de Etidio para visualizar las bandas ante la exposición a luz ultravioleta en un equipo transiluminador.

Para la cuantificación de la expresión de ARNm se utilizó la técnica de PCR a tiempo real (qPCR). Por reacción se utilizaron 1.5 µL de muestra (ADNc), 7.5 µL de Mezcla Real 2X (Biodynamics #B124-500), 0.45 µL de *primers* (mezcla 10 µM de *forward* y *reverse*), 5.55 µL de agua libre de nucleasas hasta volumen final de 15 µL. La reacción se llevó a cabo usando SYBR Green (incluido en la mezcla real) en un equipo “Rotor Q Gene, QIAGEN” o en un “CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, BIO-RAD”. Las condiciones de ciclado fueron: 1 ciclo de 5 min a 95 °C; y 40 ciclos de 95 °C por 30 segundos, T_m (ver tabla 2) por 30 segundos y 72 °C por 30

segundos. La curva de *melting* fue realizada de 55 a 97 °C, con registros cada 1 °C. Para la cuantificación se realizaron curvas estándares para evaluar la eficiencia de amplificación de los diferentes *primers* utilizados. Para ello se realizaron diluciones seriadas (1:1, 1:5, 1:25 y 1:125) de una mezcla de ADNc que contenía una alícuota de cada muestra de la curva a analizar. Se utilizó el método de Pfaffl para la cuantificación, el gen *TBP* como referencia para la normalización [220]. Para el análisis circadiano se usó el tiempo 24 h como calibrador, al que arbitrariamente se asignó un valor de 1 y se relativizó la cuantificación del resto de la curva.

A continuación se muestra una tabla con los *primers* usados en las reacciones:

Gen	Número de acceso	Forward Primer (5' - 3') Reverse Primer (5' - 3')	Amplicón (pb)	T _m (°C)	Eficiencia de amplificación
<i>TBP</i>	NM_003194.5	CGGCTGTTAACTTCGCTTCC GAGCATCTCCAGCACACTCTT	129	60	0.77
<i>BMAL1</i>	NM_001351824.2	TCCTCCAGTGGCCTACTAT GCCTCATCATTACTGGGACTAC	150	60	0.98
<i>PER1</i>	NM_001159367.1	CGGATTGTCTATATTTCCGAGCA TGGGCAGTCGAGATGGTGT	142	60	0.9
<i>REV-ERBα</i>	NM_021724.5	TGGCATGGTGCTACTGTGTAAG ATGTTCTGCTGGATGCTCCGACG	114	60	0.79
<i>LIPIN1</i>	NM_001261429.1	CCAGGAAAAGAGATAAACGAAGCC AAGGGGAACTGGTCTCACAC	180	60	0.54
<i>CHOKα</i>	NM_001376221.1	GGCCAAGATCTCATCTATTGAA TGTTGGAAATAGGCATCAAACC	72	55	0.63
<i>PEMT</i>	NM_148173.2	GGGGTTGCTGGAACCTTC GAGCCACTATGTAGGTGAGGG	197	60	0.95
<i>PCYT2</i>	NM_001347615.1	GTCATCGCCGGCCTACACT GAGTCCGCTCGTGCAGGTT	85	60	1.06

Tabla 3. Primers o cebadores utilizados para la cuantificación de la expresión transcripcional por qPCR. En la tabla se presentan los nombres de los genes blancos en la primera columna, el código correspondiente a la base de datos de la NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica) en la segunda, la secuencia de los primers en la tercera, el tamaño de los fragmentos amplificados en la cuarta (unidad en pares de bases) y la temperatura de hibridación en la quinta.

VI. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

Las células fueron cultivadas como se describió previamente [221]. Para extraer proteínas se removió el medio de cultivo, se realizó un lavado con PBS 1X frío y se agregaron entre 100 y 200 μ L de buffer RIPA (Tris-HCl 50mM pH 8.0, Cloruro de Sodio 150 mM, NP-40 1 %, deoxicolato de sodio 0.5 % y dodecilsulfato de sodio 0.1 %). Se incubaron las células con el buffer durante 10 min en hielo y con agitación leve, y luego fueron removidas de la placa con un *scraper*. Una vez resuspendidas se las recuperó en un tubo eppendorf y se realizaron tres pulsos de sonicado de 5

segundos cada uno (en hielo). Para su almacenamiento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ se agregó inhibidor de proteasa (Sigma-Aldrich).

Las proteínas fueron cuantificadas por la técnica de Bradford. Entre 50 y 75 μg de proteína fueron usadas para su determinación por *Western Blot*. Para ello se utilizaron geles de poliacrilamida al 12 %, se corrió la electroforesis a 150 V durante 1 hora aproximadamente en buffer de corrida (75 mL buffer Running 8X, 8 mL SDS 10 % y agua destilada hasta volumen final de 600 mL), y por último se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana PVDF (*Polyvinylidene fluoride*) durante 1 hora a 350 A (buffer de transferencia: 80 mL buffer Running 8X, 160 mL de metanol y agua destilada hasta volumen final de 800 mL). La membrana fue bloqueada con una solución de albúmina (BSA) al 5 % en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se incubó la membrana con anticuerpos específicos durante 1 o 2 noches a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (buffer de incubación: BSA 3 %, *Tween* 20 0.1 %, glicina 1 % y azida de sodio 0.02 % en PBS 1X). Se lavó la membrana tres veces durante 15 minutos en buffer de lavado (*Tween* 20 0.1 % en PBS 1X) y luego se incubó el anticuerpo secundario correspondiente en buffer de incubación durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios utilizados (LI-COR) fueron anti-IgG de conejo (verde) y anti-IgG de ratón (rojo), ambos generados en cabra y usados en una dilución 1:20000. Una vez finalizado se repiten los tres lavados y la membrana se escanea en un equipo “*Odyssey IR Imager*” (LI-COR *Biosciences*). Las imágenes fueron cuantificadas en el software *ImageJ* y se consideró a la α -TUBULINA como proteína de referencia. A continuación, se muestra en la tabla todos los anticuerpos utilizados y sus respectivas concentraciones (WB: Western Blot, ICC: inmunocitoquímica):

Anticuerpo	Huésped	Catálogo	Dilución
PER1	Conejo	Abcam, ab-3443	1:100 (ICC)
PER2	Conejo	Abcam, ab-180655	1:150 (ICC)
BMAL1	Conejo	NOVUS, nb-100-2288	1:500 (WB)
BMAL1	Ratón	Abcam, ab-119009	1:100 (ICC)
REV-ERB α	Ratón	Santa Cruz Biotechnology, sc-100910 (RS-14)	1:100 (ICC) , 1:250 (WB)
DGAT2	Ratón	Santa Cruz Biotechnology, sc-293211 (4C-1)	1:100 (ICC) , 1:200 (WB)
CHOK α	Ratón	Santa Cruz Biotechnology, sc-376489 (B-8)	1:100 (ICC)
CCT β	Conejo	Sigma, hpa-006367, at-08082	1:200 (ICC)
PAP1	Conejo	Abcam, ab-92316 (EPR3725)	1:500 (WB)
α -TUBULINA	Ratón	Merck Millipore, DM1A	1:250 (WB)

Tabla 4. Anticuerpos utilizados para los ensayos de Western Blot (WB) e inmunocitoquímica (ICC). En la primera columna se muestran los nombres de las proteínas blanco específicas de los anticuerpos utilizados. El huésped donde se desarrolló el anticuerpo se detalla en la segunda columna, el código de catálogo en la tercera y la dilución usada en la cuarta.

VII. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOFLUORESCENCIA

La técnica de inmunocitoquímica fue llevada a cabo como se describió previamente en [93][222]. De manera breve, las células fueron fijadas durante 15 minutos en una solución de paraformaldehído al 4 % p/v en buffer PBS 1X seguido de 10 minutos en metanol. Los cubreobjetos fueron lavados con PBS y posteriormente tratados con buffer de bloqueo (BSA 0.1 %, Tween 20 0.1 % y glicina 0.1 % en PBS 1X) e incubados toda la noche a 4 °C con el anticuerpo específico (ver tabla 4). Luego, los cubreobjetos fueron lavados tres veces con PBS 1x e incubados con anticuerpos secundarios correspondientes durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios (*Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.*) anti-IgG de conejo (rojo) y anti-IgG de ratón (verde) utilizados en una dilución 1:1000 fueron generados en cabra. Finalmente, los cubreobjetos se lavaron y visualizaron mediante microscopía confocal (FV1200, *Olympus*). Los núcleos celulares fueron visualizados mediante tinción con DAPI. Se analizaron duplicados de cada condición evaluada, y de cada uno se obtuvieron varias imágenes (n=6-10), las cuales fueron analizadas utilizando el software *ImageJ*. Para la cuantificación se determinó el promedio de la media de intensidades de fluorescencia de cada campo.

VIII. DETERMINACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Las células fueron cultivadas como se describió anteriormente en la sección de “cultivos celulares”. Luego de remover el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS 1X y se las trató con Tripsina durante 5 min en estufa. Luego de inactivar la enzima con el agregado de DMEM suplementado con 10 % SFB (en una relación 3:1 respecto al volumen de Tripsina utilizado) se obtuvo el pellet celular por centrifugación, y 4×10^5 células por réplica fueron incubadas durante 40 minutos a 37 °C con 2,7-diclorofluoresceína diacetato a una concentración final de 2 μ M. Se realizó un lavado con PBS 1X y luego se midió la intensidad de fluorescencia por citometría de flujo a 530 nm. La excitación fue realizada a 485 nm [93][223], y se registraron 50000 eventos por muestra. Los controles positivos fueron realizados con una incubación durante 15 minutos de H₂O₂ (0.09 v/v). Células sin el indicador fluorescente fueron usadas como controles negativos, y se utilizó yoduro de propidio (50 μ g/mL) para discriminar la sobrevida celular. El software FlowJo fue usado para analizar la intensidad de fluorescencia (*Verity Software House, Topsham, Maine, USA*).

IX. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Las células fueron sincronizadas como se describió previamente, y las mismas fueron procesadas cada 6 horas durante 24 horas mediante tripsinización. Luego de lavar el pellet celular con PBS 1X frío se fijaron con etanol 70 % frío a 20 °C durante al menos 24 h. A continuación, se resuspendió el pellet celular en 150 µL de una solución de yoduro de propidio 50 µg/mL y 10 µg de RNAsa A (preparada en PBS 1X) [184] [93]. El análisis del ciclo celular fue llevado a cabo a partir de 50000 eventos en un citómetro de flujo (*BD Bioscience*). Se usó el software FlowJo para analizar los datos (Verity Software House, Topsham, Maine, USA).

X. DETERMINACIÓN DE GLICEROFOSFOLÍPIDOS POR CROMATOGRAFÍA EN PLACA FINA

Las células fueron crecidas y sincronizadas como se describió anteriormente y las muestras fueron obtenidas mediante tripsinización. La extracción de lípidos totales fue llevada a cabo de acuerdo a lo descrito por Chao, et al 2017 [224]. En forma resumida, la extracción se llevó a cabo con 500 µL de una mezcla metanol:agua (4:1), 400 µL de cloroformo (en dos pasos de 200 µL cada uno) y 200 µL de agua. Luego de mezclar con vórtex y centrifugar, se recolectaron 400 µL de la fase orgánica y se secaron en gas inerte N₂, se selló con *parafilm* y se guardó a -20 °C hasta su determinación.

Los glicerofosfolípidos individuales fueron separados por cromatografía en placa fina usando placas de sílica gel G previamente lavadas con cloroformo:metanol (1:1) e impregnada en H₃BO₃ 1.2 % (en etanol:agua, 1:1) (Macherey-Nagel; Duren, Germany). La fase móvil estaba constituida por acetato:cloroformo:isopropanol:KCl 0.25 %:metanol (25:25:25:9:10). Se corrieron 100 µL de cada muestra, y fueron testeados contra estándares de ácido fosfatídico (PA), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS) y esfingomielina (SM). Luego de la corrida, la placa se lavó en agua y se secó con secador. Los fosfolípidos fueron revelados en una solución de acetato cúprico 3 % preparado en una solución de ácido fosfórico 8 %. A continuación, se dejó secar la placa al aire durante 10 minutos y las bandas fueron reveladas en estufa a 170 °C durante 10 minutos. La placa fue escaneada, y a partir de la imagen se midieron las intensidades de cada banda con el software *ImageJ*.

XI. DETERMINACIÓN DEL PERFIL LIPÍDICO POR HPLC-MS

Se determinó el perfil lipídico de las células mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplado a espectrometría de masas (HPLC-MS). El equipo utilizado para la separación por HPLC (*Agilent Technologies 1200 Series*) está equipado con una bomba de gradiente (*Agilent G1312B SL Binary*), un desgasificador de solventes (*Agilent G1379B*) y un sistema automático de inyección de la muestra (*Agilent G1367D SL + WP*). La separación cromatográfica se realizó en una columna ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6 x 30 mm, 3.5 μm) de rápida resolución. Tanto las muestras como la columna fueron mantenidas a 4 °C y 40 °C respectivamente. La fase móvil estaba conformada por un gradiente de dos solventes. Solvente A: agua con 1 % de acetato de amonio 1M y 0.1 % de ácido fórmico. Solvente B: acetonitrilo:isopropanol (5:2) con 1 % de acetato de amonio 1M y 0.1 % de ácido fórmico. La velocidad de flujo fue de 0.25 mL/min y el volumen de inyección fue de 10 μL . El protocolo del gradiente de elución fue el siguiente: 0-2 min 40 % B; 2-14 min, gradiente lineal de 40 a 100 % de B y manteniendo un 100 % de B por 7 min; y 21-26 min, gradiente lineal de 100 a 40 % de B. El sistema HPLC fue acoplado a un detector de red de diodos (*Agilent G1315 C Starlight DAD*) seguido de un espectrómetro de masas (MS) Q-TOF (*MicroTOF-Q11 Series, Bruker*) equipado con una fuente de ionización con *electrospray* (ESI). Las condiciones de trabajo para la fuente de ionización fueron las siguientes: voltaje de capilar 3500 V, presión de gas de atomización 3.0 bar, flujo del gas de secado 6.0 L/min y temperatura de secado 200 °C. Los gases de nitrógeno y argón fueron usados como gases de nebulización y colisión, respectivamente. El espectro de MS fue registrado en el modo positivo en un rango entre 200 y 1500 m/z. La adquisición fue realizada usando el software *Compass*, versión 3.1, y el procesado fue hecho en el software *DataAnalysis* versión 4.1 y la base de datos *MetaboAnalyst* (<https://www.metaboanalyst.ca/>).

XII. TINCIÓN DE GOTAS LIPÍDICAS CON NILE RED

Las células fueron crecidas sobre portaobjetos. Para la marcación de gotas lipídicas (GLs) primero se removió el medio de cultivo y se fijaron las células con paraformaldehído 4 % (preparado en PBS 1X) durante 15 minutos, y luego se lavó dos veces con buffer PBS 1X. A continuación, se incubaron con una solución 1 $\mu\text{g/mL}$ de *Nile Red* (Sigma) durante 15 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. Una vez finalizada la incubación, los portaobjetos fueron lavados y visualizados al microscopio confocal con un objetivo de 60 X (FV1200, *Olympus*, Toxyo, Japón). El escáner de las GLs fue realizado en *Z-stack* para cubrir el volumen completo de las células. La frecuencia de adquisición fue de 20 planos con 0.12 μm de separación. Los núcleos

celulares fueron teñidos con DAPI. A partir de la proyección en Z de las imágenes se cuantificaron tamaño promedio, área porcentual y número de GLs utilizando el software *ImageJ*.

XIII. CUANTIFICACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS Y LACTATO

Las células fueron crecidas y sincronizadas como se describió previamente. La toma de muestra a los diferentes tiempos post-sincronización se llevó a cabo levantando las células con un *scraper* en 180 μL de PBS 1X. Una vez homogeneizado, se realizaron tres pulsos de 5 segundos de sonicado, seguido de una centrifugación. 25 μL de sobrenadante fue separado para la determinación de proteínas. Del volumen remanente, 70 μL fueron usados para la determinación de triglicéridos (TGs) con 500 μL del reactivo provisto por el kit (*TG Color reagent*), de acuerdo con las especificaciones del fabricante (*TG Color*, Wiener Lab, Argentina). La curva estándar fue llevada a cabo con glicerol. Tanto las muestras como los estándares fueron incubados durante 5 minutos a 37 °C, y determinados a 505 nm por espectrofluorometría. La cuantificación de TGs fue normalizada por el contenido de proteínas, determinadas por el método de Bradford.

Para la determinación de Lactato se utilizaron las mismas muestras que para la cuantificación de TGs. En este caso, 12 μL de muestra fueron diluidos en 500 μL finales del reactivo provisto para tal fin por el fabricante (*Lactate kit*, Wiener Lab, Argentina). La curva estándar fue realizada con DL-lactato (*Sigma*). El contenido de lactato en las muestras fue cuantificado a 550 nm por espectrofluorometría y normalizado por proteínas.

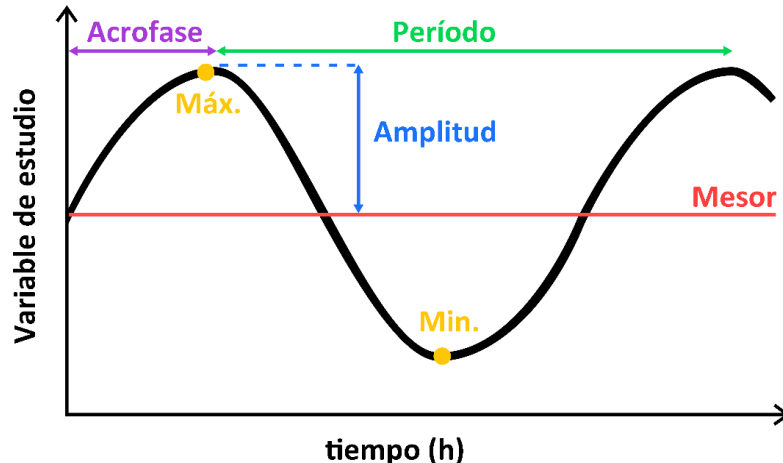
XIV. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

El análisis estadístico se realizó utilizando el *software Infostat* (versión 2017. Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) o *GraphPad Prism*. Las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza se realizaron mediante las pruebas *Shapiro-Wilks* modificado y *Levene*, respectivamente. Cuando los supuestos de distribución normal se cumplían, las comparaciones entre medias se realizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de una o dos vías para testear los efectos del tiempo o la interrupción, seguida de un post-test cuando presentaban diferencias entre medias. Cuando se infringía la normalidad de los residuos se utilizó estadística no paramétrica mediante el test de *Kruskal-Wallis* (K-W), empleando una comparación de a pares. En el caso de los experimentos que presentaron dos grupos experimentales, se realizó la comparación entre pares mediante un t-test o test no paramétrico *Mann Whitney* (M-W) cuando se infringía la normalidad de los residuos. En las comparaciones por pares se utilizaron la

prueba t de *Student* o *Bonferroni* cuando fuera apropiado en cada caso. La información fue expresada como media \pm EE (error estándar de la media). En todos los casos se consideró una diferencia significativa cuando el valor de $p < 0.05$.

XV. ANÁLISIS PERIÓDICOS CON METACYCLE

El análisis periódico de los datos se realizó en la plataforma *R Studio* (R Core Team 2017, <https://www.r-project.org>), utilizando el paquete *MetaCycle* y la función *meta2d* para la determinación de señales rítmicas [225]. Esta función incorpora múltiples métodos como *ARSER* [226], *JTK_CYCLE* [227] y *Lomb-Scargle* (LS) [228] para la detección de ritmos con ciertas particularidades. *ARSER* se usó para determinar el período de una dada oscilación. El análisis considera un período (τ) de 4 a 48 h, y significancia a $p < 0.05$. El tiempo fue considerado como factor de efecto fijo, incluyendo un componente lineal (tiempo) y un componente periódico ($2 \cdot \pi \cdot (\text{tiempo} - \omega) \cdot \tau^{-1}$), siendo ω la fase y τ el período. El componente lineal da cuenta de los efectos constantes y no periódicos del tiempo, mientras que el componente periódico da cuenta de las oscilaciones presentes en la variable. A continuación, se presenta un esquema con las variables analizadas en las oscilaciones.



Esquema 12. Variables de una curva. En el esquema se presentan las variables de las oscilaciones obtenidas a partir del ajuste periódico. El MESOR es una palabra compuesta de las iniciales *Midline Estimating Statistic Of Rhythm*, y constituye el valor medio de la variable estimada sobre la curva ajustada. La ACROFASE corresponde al tiempo transcurrido entre un punto horario de referencia y el momento en que la variable ajustada alcanza su valor máximo. El PERÍODO es el Tiempo comprendido entre dos valores análogos de la variable ajustada. La AMPLITUD es la diferencia entre el valor máximo de la variable ajustada y el mesor. Máx.: máximo. Min.: mínimo [229].

CAPÍTULO III: RESULTADOS

I. MODELO DE ESTUDIO Y DESCRIPCIÓN CIRCADIANA

Células HepG2 ciclan homogéneamente a diferentes tiempos post-sincronización

A fin de evaluar la influencia que ejerce el reloj circadiano en el metabolismo de células HepG2 proliferantes a lo largo del tiempo, en una primera instancia y a fin de caracterizar el modelo desde un aspecto clave que también presenta un perfil temporal, procedimos a analizar el ciclo de división celular. Dado que la actividad proliferativa exacerbada es una de las principales características de las células tumorales, nos pareció pertinente estudiar las células HepG2 en un estado de división activo. La proporción de células que se encuentran en las diferentes fases del ciclo celular a diferentes tiempos post-sincronización se determinó por citometría de flujo utilizando Ioduro de Propidio como marcador nuclear (para más detalles consultar la sección de Materiales y Métodos). En términos generales, las células HepG2 sincronizadas y mantenidas con un 10% de SFB presentan en promedio un 28 % de su población en fases activas del ciclo (S-G₂-M). No se observaron diferencias significativas en esta proporción a diferentes horas evaluadas post-sincronización a lo largo de las 24 horas ($p=0.5$ por ANOVA). Esta homogeneidad en las distintas fases del ciclo celular, en particular en la S y G₂/M, permite independizar el efecto de la división celular a los patrones temporales que se puedan observar en otros aspectos a nivel celular o molecular.

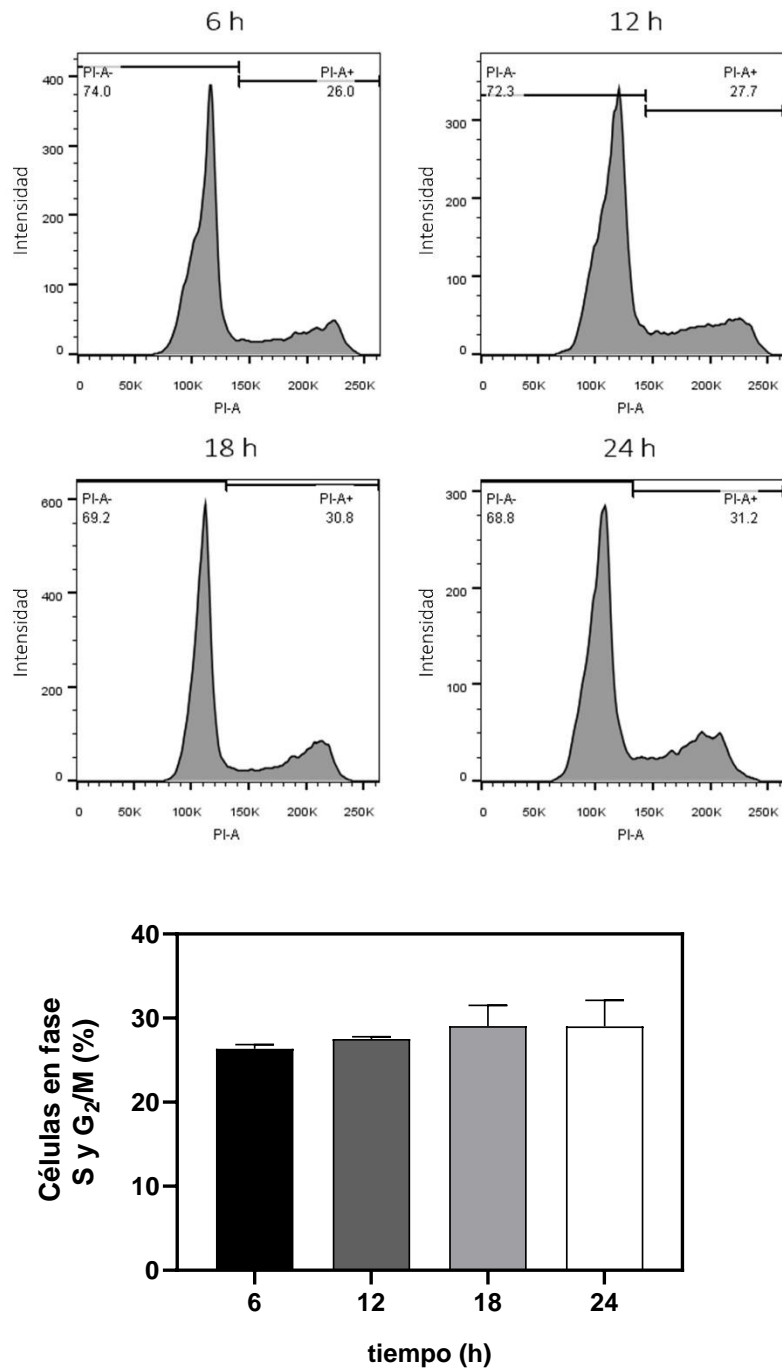


Fig. 1. Caracterización de las fases de ciclo celular en células HepG2. Las células HepG2 fueron crecidas con SFB al 10%, sincronizadas con un pulso de dexametasona 100 nM durante 1 h y luego procesadas a diferentes tiempos post-sincronización para su análisis por citometría de flujo. Los núcleos celulares fueron teñidos con Ioduro de Propidio (PI por sus siglas en inglés). **Panel superior:** se observan los histogramas resultantes de la exclusión de células muertas y dobletes. El pico de la izquierda representa el porcentaje de células en fase G₀-G₁ del ciclo celular, es decir la proporción de células arrestadas de la población, mientras que el resto del histograma representa las células que se encuentran en fase S (meseta intermedia entre picos) y G₂/M (pico derecho, ubicado aproximadamente al doble de intensidad de PI-A respecto al primero). **Panel inferior:** se presenta la cuantificación de los porcentajes de células en fases activas del ciclo celular a

los diferentes tiempos post-sincronización. En la gráfica se presenta el valor porcentual promedio de 2 mediciones \pm el error estándar. No se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos ($p=0.5$ por ANOVA).

Células HepG2 en proliferación presentan ritmos en ARNm y proteínas de genes reloj

En una primera instancia se realizó una caracterización circadiana del modelo, evaluando si las células HepG2 mantenidas en condiciones de proliferación presentaban un comportamiento oscilatorio en función del tiempo en la expresión de genes reloj. Para ello se sincronizaron las células con un pulso de Dexametasona 100 nM durante una hora (para más detalle revisar la sección de Materiales y Métodos), y se recolectaron muestras durante 48 horas, en intervalos de 6 horas. Se consideró "t0" a la muestra obtenida inmediatamente después de la sincronización con Dexametasona. Para evaluar la expresión de los genes reloj se extrajo ARNm de los distintos tiempos, y luego de realizar la retrotranscripción correspondiente se cuantificó mediante qPCR los niveles de transcritos de los genes reloj *BMAL1*, *PER1*, *PER2* y *REV-ERB α* . En todos los casos se utilizó el gen *TBP* como normalizador. Los resultados ilustrados en la Figura 2 muestran que las células HepG2 sincronizadas y mantenidas en proliferación presentan variaciones significativas en los niveles relativos de ARNm para los genes *PER1* ($p=0.006$) y *REV-ERB α* ($p=0.02$). Los valores experimentales se presentan en líneas negras continuas mientras que el ajuste periódico se muestra en línea discontinua y fue estimado con ARSER. Como se muestra en la Tabla 5, las oscilaciones presentaron períodos de ~ 14.9 , 14.3 y 18.5 h y fases de 9.5 , 6 y 6.5 h para *BMAL1*, *PER1* and *REV-ERB α* respectivamente (estimado con ARSER). Cabe destacar que los transcritos de *BMAL1* presentaron altos niveles de expresión a las 12, 24, 36-42 h post-sincronización, y bajos niveles a los tiempos 0-6, 18, 30 y 48 h, mientras que *PER1* y *REV-ERB α* presentaron patrones de expresión 6 horas adelantados respecto a los anteriores. Se detectaron altos niveles de ARNm para *PER1* a las 6, 18 y 36 h post-sincronización, mientras que los transcritos de *REV-ERB α* fueron elevados en los tiempos 6, 24 y 42 h.

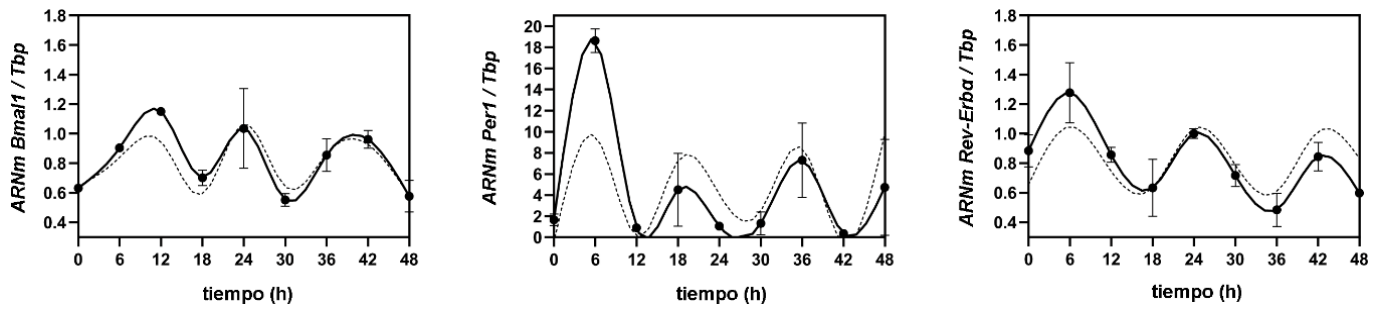


Fig. 2. Caracterización circadiana de células HepG2. Cuantificación de transcritos de genes reloj y su análisis periódico. Células HepG2 fueron cultivadas y sincronizadas con un pulso de dexametasona 100 nM de 1 h y luego procesadas a diferentes tiempos post-sincronización para su análisis circadiano. Se cuantificaron mediante qPCR los transcritos de *BMAL1*, *PER1* y *REV-ERBa*. En todos los casos se utilizó el gen *TBP* como normalizador. La cuantificación relativa fue realizada con el método Pfaffl usando el tiempo 24 h como calibrador (arbitrariamente definido como 1). En la gráfica se presenta la media de 2 mediciones \pm el error estándar. La curva estándar y las muestras se procesaron en la misma corrida en el equipo "Rotor Gene Q, QIAGEN". El ajuste periódico se muestra en las gráficas como línea discontinua (ARSER), donde se determinaron oscilaciones con períodos más cortos que 24 h. Se observaron diferencias significativas en las cuantificaciones de *PER1/TBP* y *REV-ERBa/TBP* ($p=0.006$ y $p=0.02$ por ANOVA - Bonferroni, respectivamente). El análisis periódico se muestra en la tabla 5.

Además, las células sincronizadas mantenidas en condiciones proliferativas muestran variaciones temporales significativas en los niveles proteicos para los factores de transcripción *BMAL1*, *PER1* y *PER2* (Fig. 3). Las mismas fueron evaluadas por inmunocitoquímica, y presentaron niveles máximos alrededor de las 10 – 12 h luego de la sincronización (fases) tal como se observa en los gráficos y en las microfotografías (paneles inferiores) de la Fig. 3. El período de las oscilaciones estimado con ARSER fue alrededor de 13, 23 y 15 h para *BMAL1*, *PER1* y *PER2*, respectivamente (Fig. 3, líneas de punto y Tabla 5). Además, cabe destacar que en el caso de la proteína *PER2* se observó un cambio en su localización sub-celular, presentando una acumulación nuclear (y citoplasmática) a las 4, 18, 24 y 30 horas post-sincronización a diferencia de los demás tiempos evaluados donde la misma se encuentra principalmente citoplasmática.

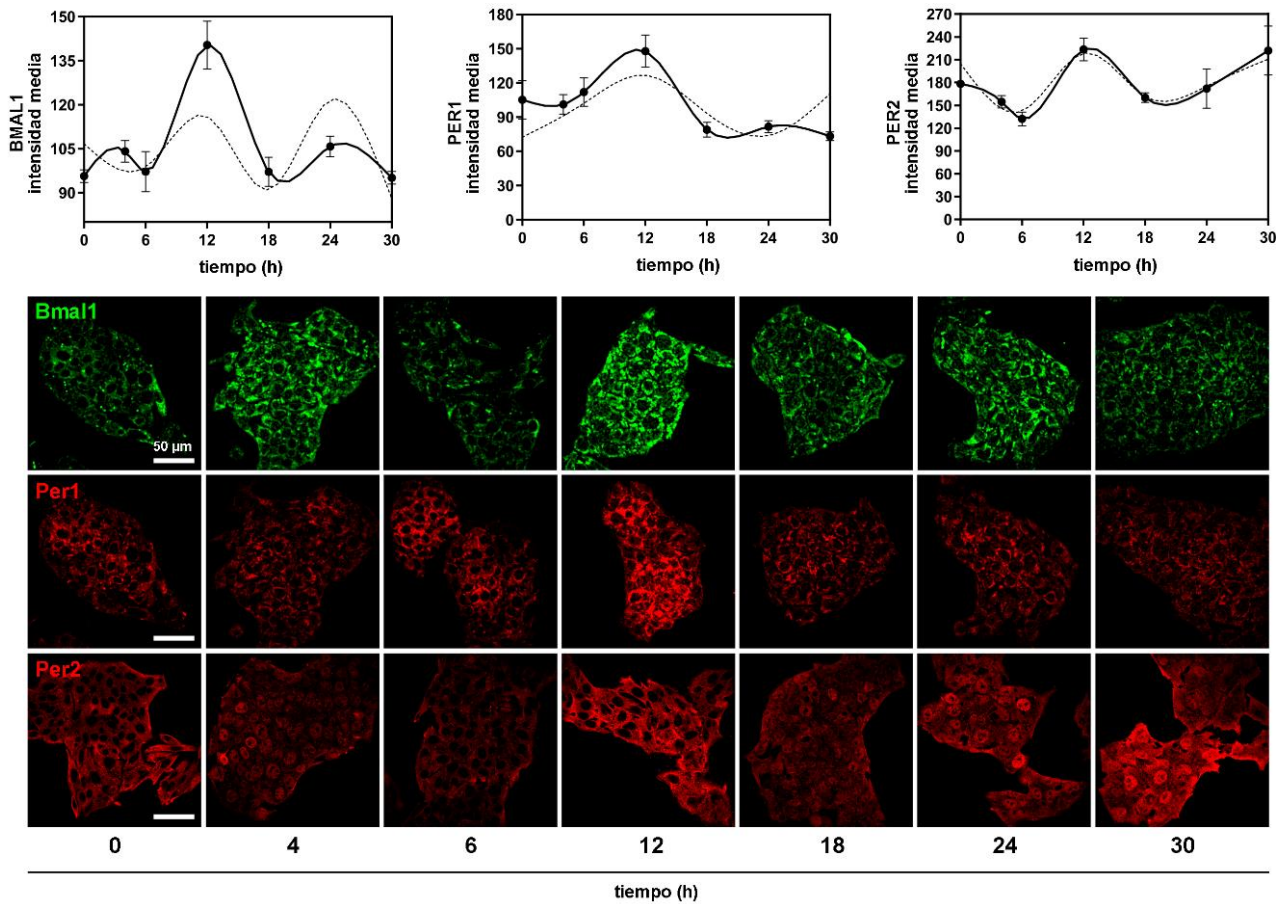


Fig. 3. Caracterización circadiana de células HepG2. Proteínas reloj y su análisis periódico. Células HepG2 fueron cultivadas y sincronizadas con un pulso de dexametasona 100 nM de 1 h y luego procesadas a diferentes tiempos post-sincronización para su análisis circadiano. Los niveles de proteína fueron determinados por inmunofluorescencia, y presentaron diferencias significativas a lo largo del tiempo para las proteínas de BMAL1, PER1 y PER2 ($p < 0.0001$ y $p = 0.0001$ por ANOVA – Bonferroni, y $p = 0.01$ por ANOVA – KW, respectivamente). En las gráficas se presenta la media \pm el error estándar por cada tiempo evaluado ($n=4$). El análisis periódico se realizó por ARSER y se muestra en la tabla 5. Barra de escala: 50 μ m. KW: Kruskal Wallis.

II. RITMOS EN LA BIOSÍNTESIS DE NOVO Y ALMACENAMIENTO LIPÍDICO

Regulación temporal del metabolismo de fosfolípidos en células HepG2

A fin de evaluar el posible control temporal de la síntesis de glicerofosfolípidos (GFLs) en células HepG2 sincronizadas y mantenidas en condiciones proliferativas, examinamos los niveles endógenos de fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE), y la expresión de dos enzimas claves involucradas en la biosíntesis de estos fosfolípidos, CHOK α y CET (codificada por el gen *PCYT2*), respectivamente. Los resultados muestran una variación significativa a lo largo del tiempo

en los niveles porcentuales de PC y PE ($p=0.02$ por ANOVA - Bonferroni, Fig. 4). Considerando la suma de los dos GFLs más abundantes como el 100%, se observó que los niveles endógenos de PC fluctuaban entre un 55 y 75 % a lo largo del tiempo, con sus niveles máximos alrededor de las 12 y 18 h post-sincronización. Los niveles de PE por su parte oscilan entre el 25 y el 45 % a lo largo del tiempo. El análisis de comparaciones de a pares determinó que los niveles de PC a las 6 h post-sincronización fueron significativamente más bajas que los niveles del pico máximo, mientras que para PE esta diferencia se registró en el tiempo 12 h, donde se observaron los valores mínimos para este fosfolípido. Además, la relación PC/PE también presentó diferencias temporales (Fig. 4) con niveles máximos a las 12 h y mínimos a las 30 h luego de la sincronización ($p=0.02$ por ANOVA - Bonferroni).

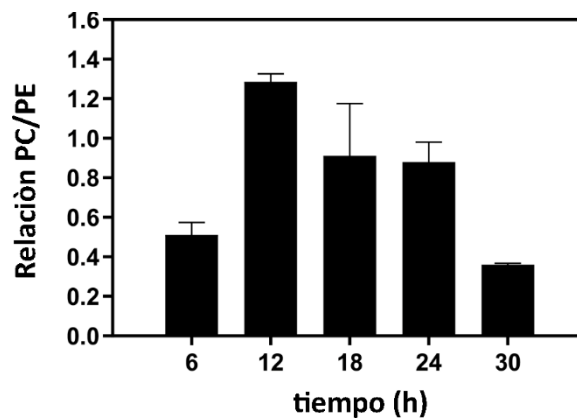


Fig. 4. Relación PC/PE. Los cultivos de células HepG2 fueron sincronizados y colectados a diferentes tiempos para la extracción de lípidos totales. El contenido de los GFLs más abundantes, PC y PE fue determinado por TLC. La relación PC/PE muestra cambios significativos a lo largo del tiempo en células HepG2 mantenidas en proliferación ($p=0.02$ por ANOVA - Bonferroni). El histograma presenta la media \pm el error estándar con un "n" representativo de 2 experimentos independientes.

Cuando se analizaron los niveles de expresión de dos enzimas claves en la biosíntesis de PC y PE, *CHOK α* y *PCYT2* respectivamente, no se observaron diferencias significativas entre los diferentes tiempos post-sincronización. Sin embargo, cuando se realizó el análisis periódico por ARSER de los datos experimentales, se identificaron oscilaciones con períodos cercanos a las 15 h (Fig. 5, líneas discontinuas; y Tabla 5).

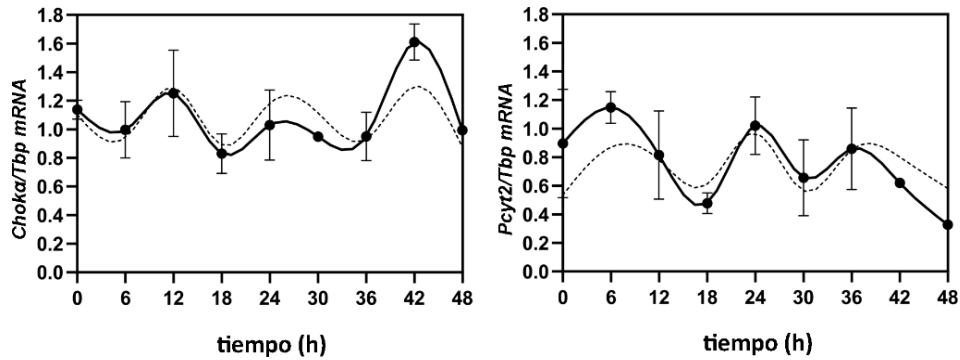


Fig. 5. Expresión de enzimas clave en la biosíntesis de PC y PE. Se evaluó la expresión de enzimas claves en la biosíntesis de PC y PE, CHOK y CET (codificada por el gen PCYT2) respectivamente. La cuantificación relativa se realizó por qPCR utilizando el método de Pfaffl y *Tbp* como gen normalizador (línea continua en los gráficos). En la gráfica se presenta la media de 2 mediciones \pm el error estándar. La curva estándar y las muestras se procesaron en la misma corrida en el equipo "Rotor Q Gene, QIAGEN". Los niveles relativos de ARNm para CHOK α y PCYT2 mostraron pequeñas diferencias a lo largo del tiempo, aunque no significativamente estadísticas ($p=0.4$ por ANOVA - KW y $p=0.3$ por ANOVA - Bonferroni, respectivamente). En el análisis periódico de los datos se determinaron oscilaciones con períodos más cortos que 24 h para ambos transcritos (línea discontinua en los gráficos, ver tabla 5 para más información).

Por otro lado, cuando se evaluaron los niveles de proteína de la enzima CHOK α se registró una aparente pero no significativa fluctuación a lo largo de las 30 h evaluadas ($p=0.2$ por ANOVA - KW), con niveles máximos al tiempo 24 h luego de la sincronización (Fig. 6). Si bien los datos no presentaron un ajuste periódico significativo ($p=0.07$) se puede estimar un período cercano a las 19 h (línea discontinua, Fig. 6, Tabla 5).

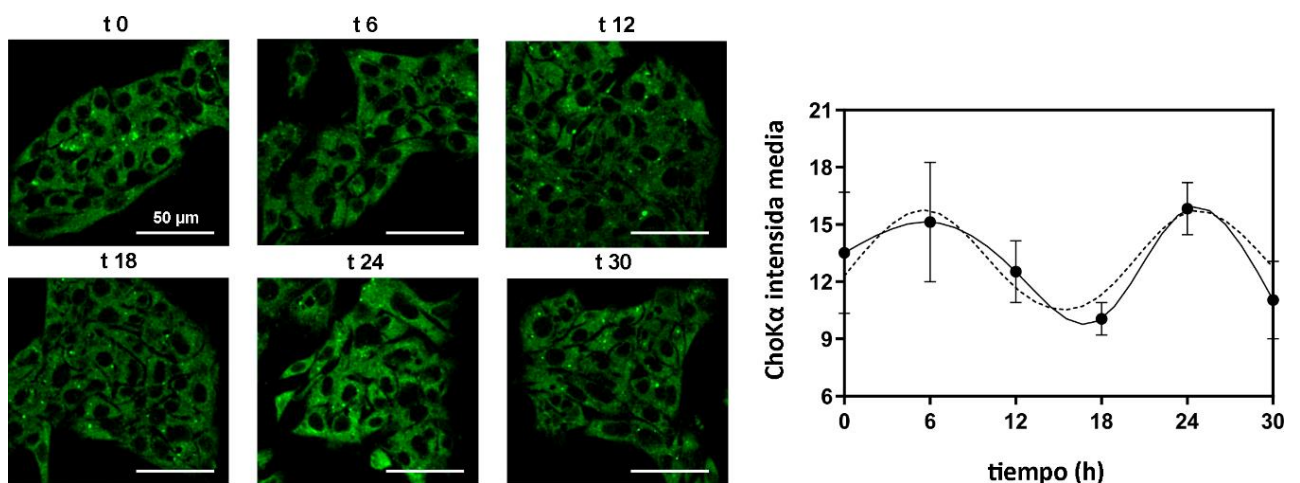


Fig. 6. Análisis temporal de la proteína CHOK. Los niveles de proteína de la enzima CHOK fueron determinados por inmunocitoquímica. La gráfica presenta la media \pm el error estándar de un número de 6 microfotografías. Se registraron niveles máximos a las 24 h post-sincronización (panel superior) aunque no

se observaron diferencias significativas a lo largo del tiempo ($p=0.2$ por ANOVA - KW). Las microfotografías muestran la proteína *CHOK α* en verde y se puede observar una localización citoplasmática (paneles inferiores). Barra de escala: 50 μm . KW: Kruskal Wallis.

Los resultados mostraron una diferencia temporal en el contenido de PC y PE a lo largo de las 30 h evaluadas post-sincronización. Estos cambios podrían asociarse a fluctuaciones en distintos pasos de la biosíntesis de estos GFLs, si bien las oscilaciones descritas no alcanzan diferencias significativas en los transcritos de *CHOK α* ni *PCYT2*, la media de los datos se ajusta significativamente a una función armónica, lo que sugiere un comportamiento oscilatorio en la expresión, aunque la dispersión de las mediciones es alta y requiere un mayor número de casos y/o experimentos.

III. **DISRUPCIÓN CIRCADIANA Y SU RELACIÓN CON EL METABOLISMO LIPÍDICO**

Descripción del modelo de disrupción

A fin de evidenciar el vínculo entre la maquinaria del reloj molecular y el metabolismo lipídico, diseñamos una estrategia de disrupción para uno de los componentes claves del reloj intrínseco de las células HepG2. Con la tecnología de edición génica CRISPR/Cas9 se realizó la disrupción del gen *BMAL1* (Fig. 7), a partir de lo cual se seleccionó y aisló una población celular de origen clonal a la que se denominó "*BMAL1-D*" o "B-D", donde "D" hace referencia a la disrupción que se generó en el gen. El modelo control se denominó "*BMAL1-wild type*", o "B-WT".

Células HepG2 crecidas en condiciones proliferativas fueron fijadas y medidas por inmunofluorescencia sin previa sincronización para evaluar el efecto de la disrupción sobre la expresión de genes reloj y controlados por el reloj "aguas abajo" en la vía. Se observó una leve reducción en los niveles de la proteína *BMAL1* en células B-D (barras grises) en comparación al modelo B-WT (barras negras) aunque la misma no alcanzó significancia estadística (Fig. 7A). Por otro lado, pudimos cuantificar una marcada reducción en genes regulados por *BMAL1*, particularmente en las proteínas PER2 y REV-ERB α ($p<0.0001$ y $p=0.002$ por t-test, respectivamente) (Fig. 7B y C, respectivamente).

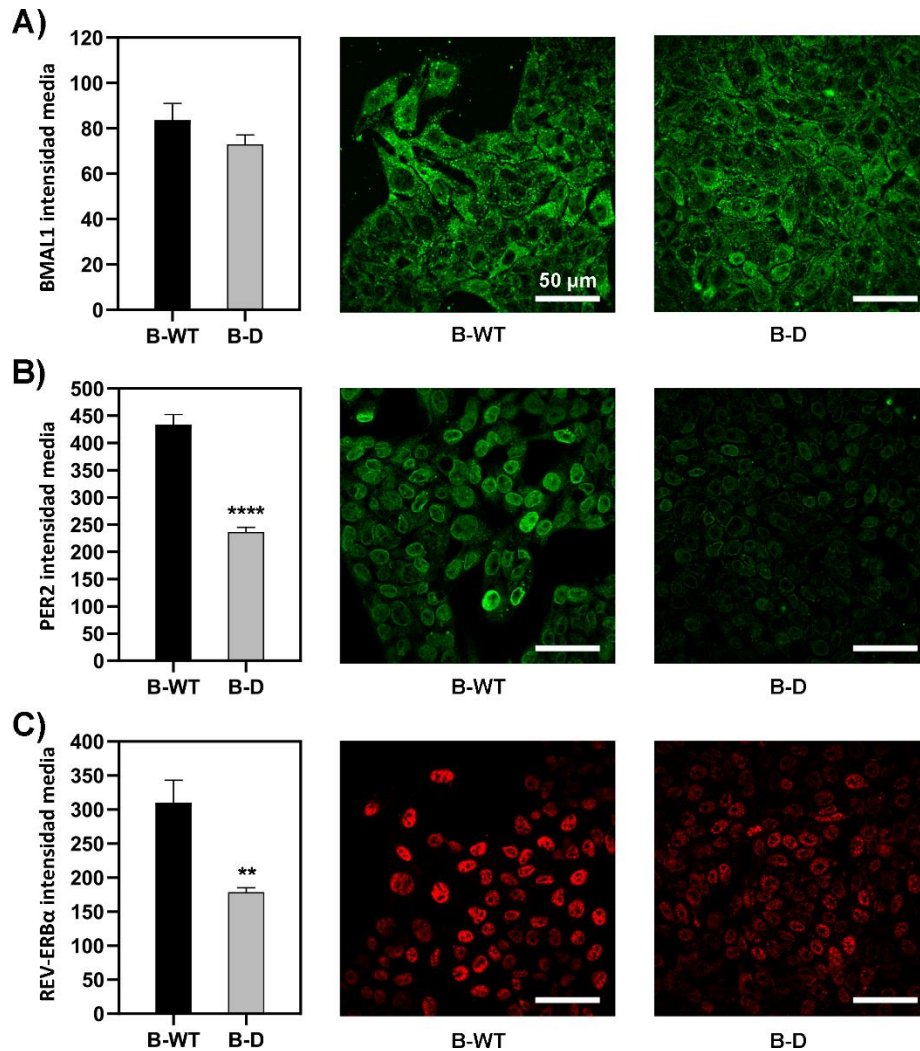


Fig. 7. Disrupción de BMAL1 y sus efectos en proteínas downstream. Las células HepG2 que presentan la disrupción del gen *BMAL1* se denominaron “B-D”. Los gráficos de barra representan la media \pm el error estándar de un “n” de 6 microfotografías por condición. A) Mediante inmunocitoquímica (ICC) se determinó que los niveles de la proteína BMAL1 mostraron una leve disminución, aunque no significativa ($p=0.2$ por *t*-test). B-C) Los genes controlados por BMAL1 a nivel de promotor PER2 (panel B, $p<0.0001$ por *t*-test) y REV-ERBa (panel C, $p=0.002$ por *t*-test) presentaron una reducción significativa a nivel de proteína en células B-D respecto a las células control B-WT. Los niveles de proteínas fueron determinados por ICC en ambos modelos celulares. KW: Kruskal Wallis. ** $p<0.01$; *** $p<0.001$; **** $p<0.0001$.

También se analizó por WB la proteína BMAL1 a fin de evaluar el efecto de la disrupción. Al igual que se observó por ICC, la cuantificación de BMAL1 en las células B-D presenta una leve disminución en comparación con las células B-WT pero que no alcanzó a ser estadísticamente significativa (Fig. 8).

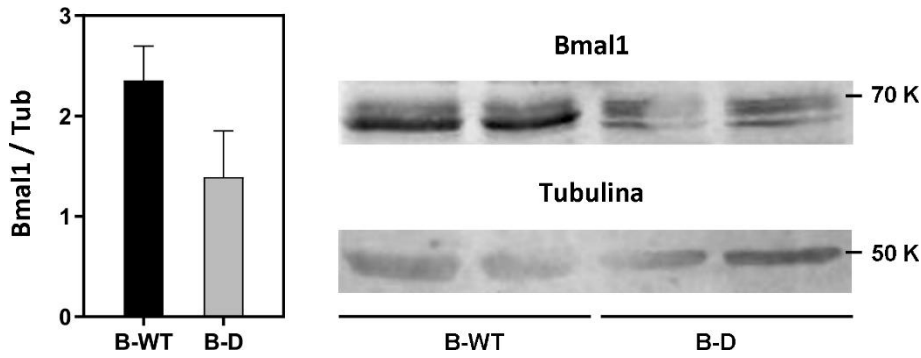


Fig. 8. Western Blot de la proteína BMAL1. En el gráfico izquierdo se presenta la cuantificación de la proteína BMAL1 (relativa a α -TUBULINA) obtenida a partir de tres experimentos independientes. La barra negra corresponde a las células B-WT y la gris a las B-D. A la derecha se muestran las bandas correspondientes a las proteínas analizadas en la membrana de uno de los experimentos, representativo de los distintos experimentos realizados. Si bien se puede observar una disminución en los niveles de la proteína en las células B-D respecto a las B-WT, la misma no alcanzó significancia estadística ($p=0.2$ por t-test).

Para complementar la descripción de la interrupción de *BMAL1* se cuantificó por qPCR el transcripto de un gel "blanco" de *BMAL1*, como lo es *REV-ERB α* . Como se observa en la Fig. 9, *REV-ERB α* presenta una marcada desregulación en su expresión en las células B-D (línea gris) respecto a las B-WT (línea negra). El análisis ANOVA de dos vías reveló un efecto significativo del tiempo ($p<0.0001$ por ANOVA de dos vías), del tipo celular ($p<0.0001$ por ANOVA de dos vías) e interacción ($p<0.0001$) con un marcado incremento en la amplitud de la oscilación en las células B-D respecto a las células control. Ambos grupos celulares por separado mostraron diferencias significativas en la cuantificación relativa del transcripto a lo largo de las 48 h evaluadas ($p=0.04$ por ANOVA –KW para ambos) y los datos experimentales se ajustaron significativamente a una oscilación armónica con un período aproximado de 18 horas (más detalles en la tabla 6A).

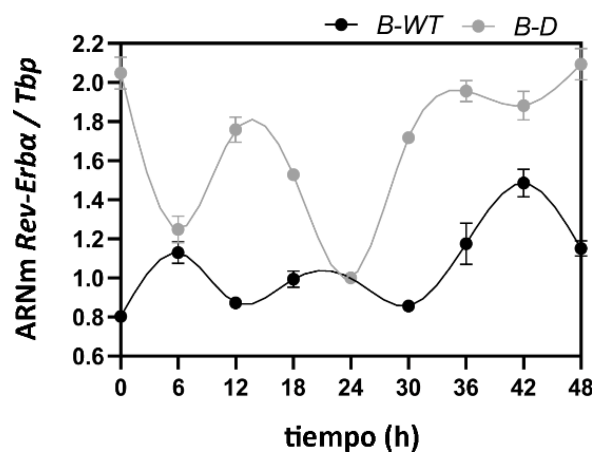


Fig. 9. Análisis de la disrupción de *BMAL1* sobre la expresión temporal de *REV-ERB α* . Las células HepG2 que presentan la disrupción del gen *BMAL1* se denominaron “B-D” y se representan en la gráfica con color gris. El modelo control (B-WT) se presentan en negro. La cuantificación de los niveles relativos de ARNm del gen *REV-ERB α* fue realizada por qPCR utilizando *TBP* como gen de referencia. En la gráfica se representa la media correspondiente a 2 mediciones por cada tiempo \pm el error estándar. La curva estándar y las muestras correspondientes a los dos modelos se procesaron en la misma corrida en el equipo “CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, BIO-RAD”. Se observó un efecto significativo tanto del tiempo como del tipo celular e interacción (WT o D) ($p < 0.0001$ por ANOVA de dos vías en todos los casos). Además, se observaron diferencias significativas a lo largo de las 48 h evaluadas post-sincronización en ambos modelos por separado ($p = 0.04$ por ANOVA – KW). Además, se registró un incremento en los transcritos de *REV-ERB α* en las células B-D respecto al control (B-WT), con una mayor amplitud y en ambos modelos períodos menores a las 24 h (ver tabla 6A para más detalles). KW: Kruskal Wallis.

Efecto de la disrupción del reloj en el metabolismo lipídico

A raíz de la disrupción generada en el gen de *BMAL1* procedimos a investigar un potencial efecto metabólico en las células B-D, particularmente en el metabolismo lipídico, y en los niveles de lactato y especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). Cuando se evaluaron los niveles endógenos de triglicéridos (TG) en ambos modelos de estudio en condiciones basales sin sincronizar, se observó una reducción significativa en las células B-D respecto a las B-WT ($p = 0.03$ por t-test) (Fig. 10, gráfico izquierdo). Luego se determinaron los niveles de TG a diferentes tiempos post-sincronización, donde se pudo determinar un efecto estadísticamente significativo del tiempo y del tipo celular por ANOVA de dos vías ($p < 0.0001$), con una interacción también significativa ($p = 0.03$). Además, se observó que la disminución de TG en células B-D se mantenía a lo largo de las 48 h evaluadas, y que ambos modelos presentaban perfiles, amplitudes y períodos diferentes (Fig. 10, gráfico derecho). En las células control, los niveles de TG mostraron fluctuaciones temporales con un período extenso de 37 h y un pico alrededor de las 25 h post-sincronización (curva de trazo negro) ($p < 0.008$ por ANOVA - KW). Cabe destacar que si bien el ajuste periódico determinó un período de 37 horas no se lo puede corroborar experimentalmente ya que sólo se evaluó a lo largo de 48 horas, siendo lo estrictamente correcto evaluar al menos 74 horas para evidenciar dos ciclos con un período de 37 horas. El modelo de disrupción B-D por su parte (Fig. 10, curva de trazo gris), también presentó diferencias significativas en sus niveles de TG a lo largo de las 48 h evaluadas ($p = 0.007$ por ANOVA – KW), con una disminución significativa en todos los tiempos respecto a las células control.

A posteriori, se determinaron otros efectos metabólicos en las células B-D a causa de la disrupción de *BMAL1*, encontrando un incremento significativo en los niveles de lactato ($p = 0.0002$ por t-test) (Fig. 10), principalmente a las 24 h post sincronización. El contenido de lactato en ambos modelos de estudio fue evaluado a lo largo del tiempo, y en ambos se

observaron diferencias significativas (B-WT, curva de trazo negro, $p=0.001$ por ANOVA - KW) (B-D, curva de trazo gris, $p=0.0004$ por ANOVA - KW). Por medio de un análisis ANOVA de dos vías se pudo determinar además un efecto significativo tanto del tiempo como del modelo celular de estudio ($p<0.0001$ en ambos casos), al igual que en su interacción ($p=0.001$). El análisis periódico de todos los datos se puede ver en detalle en la tabla 6B.

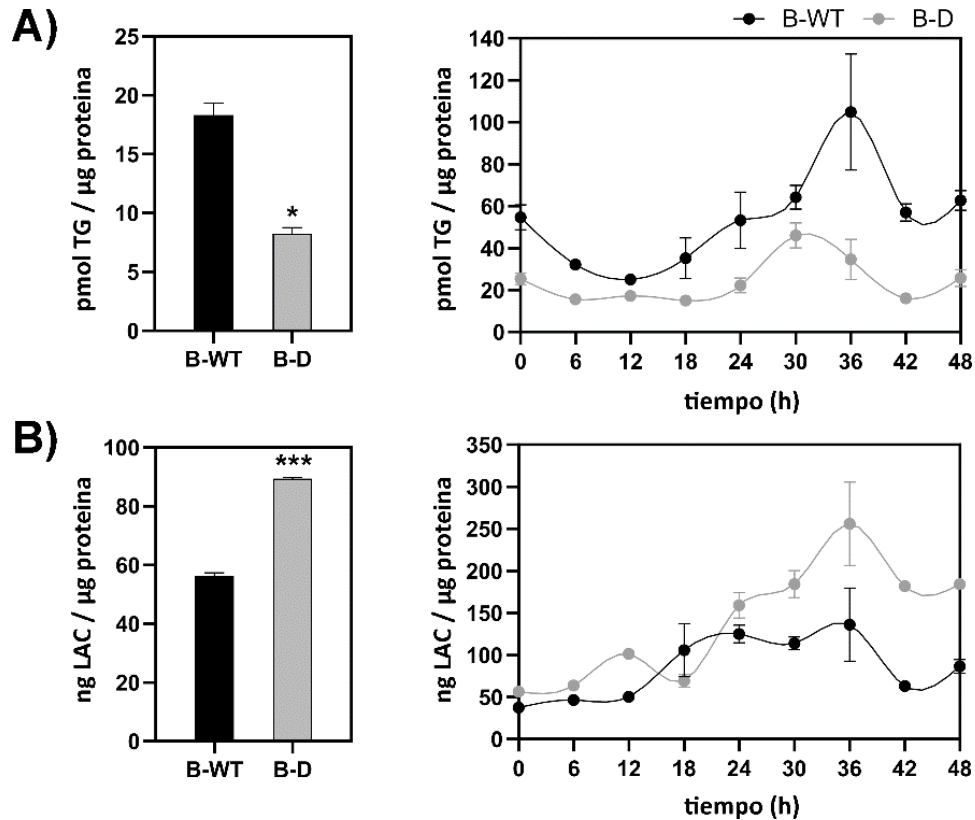


Fig. 10. Alteraciones metabólicas en células con disrupción en BMAL1 (modelo B-D). Cultivos de células B-WT y B-D fueron cultivadas y sincronizadas de manera individual, y colectadas a lo largo de 48 h para los experimentos circadianos. Los gráficos de barra corresponden a muestras sin sincronizar ($n=2/4$), mientras que las curvas fueron realizadas con muestras sincronizadas ($n=4$). En todos los casos se representa la media \pm el error estándar. Se observaron efectos significativos del tiempo y del tipo celular tanto en la determinación de triglicéridos como de lactato a lo largo del tiempo post-sincronización ($p<0.0001$ por ANOVA de dos vías). **A)** El contenido de triglicéridos (TG) presentó una disminución significativa en células no sincronizadas B-D (gráfico izquierdo, barra gris) en comparación al modelo control (B-WT, gráfico izquierdo, barra negra) ($p=0.03$ por t-test). Además, los niveles de TG presentan cambios significativos a lo largo del tiempo post-sincronización en células B-WT ($p=0.008$ por ANOVA - KW) así como también en células B-D ($p=0.007$ por ANOVA - KW). Ambas oscilaciones presentan períodos más largos que 24 h (ver tabla 6B para más detalles). **B)** Las células B-D presentan un elevado contenido de lactato en condiciones basales sin sincronización, en comparación a las células control B-WT ($p=0.0002$ por t-test) (panel izquierdo). En ambas poblaciones celulares, los niveles de lactato presentaron cambios significativos a lo largo del tiempo (B-WT, línea negra, $p=0.001$ por ANOVA - KW) (B-D, línea gris, $p=0.0004$ por ANOVA - KW) (panel derecho). Ambas curvas se ajustan a una oscilación con períodos más extensos que 24 h (ver tabla 6B para más detalles). KW: Kruskal Wallis. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

También se evaluó el estado metabólico / oxidativo de las células con o sin disrupción de *BMAL1*. Se registró una disminución significativa en los niveles de ROS en las células B-D (Fig. 11, barra gris) a las 18 h luego de la sincronización, en comparación a las células control B-WT (barra negra) (p=0.0001 por t-test).

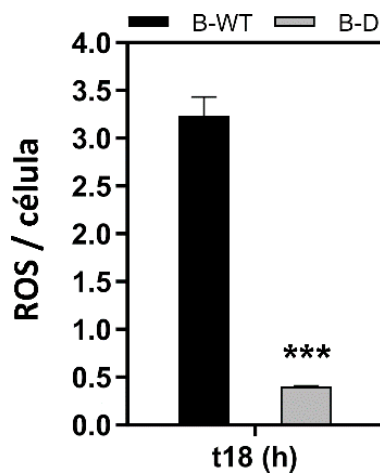


Fig. 11. Alteraciones en la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS) ante la disrupción de *BMAL1*. Las células fueron cultivadas y sincronizadas como se detalló en la sección de materiales y métodos. Se evaluó el estado de óxido-reducción por citometría utilizando 2,7-diclorofluoresceína diacetato en ambos modelos a las 18 h post-sincronización. La gráfica representa la media \pm el error estándar (n=3). Los niveles de ROS fueron significativamente menores en células B-D (barra gris) en comparación a las células control (B-WT, barra negra) (p=0.0001 por t-test). ***p < 0.001.

Control temporal sobre el metabolismo lipídico en células HepG2 B-WT y B-D

Para evaluar el efecto en el metabolismo lipídico que haya generado la disrupción de *BMAL1*, y a través de ello evidenciar el control circadiano sobre estos procesos, evaluamos la biosíntesis de glicerofosfolípidos (GFLs). Analizamos a nivel de transcripción y/o a nivel de proteína la expresión de enzimas claves para el correcto funcionamiento de estas vías, su localización intracelular y su perfil oscilatorio.

En la biosíntesis *de novo* de acilglicéridos (DG y TG) evaluamos la enzima fosfatasa PAP1, codificada por el gen *LIPIN1*, y la aciltransferasa DGAT2. La primera fue evaluada tanto a nivel de su transcripción como a nivel de proteína, por qPCR e ICC respectivamente. El análisis estadístico mediante ANOVA de dos vías reflejó que los niveles relativos de ARNm de *LIPIN1* presentaron efectos significativos del tiempo, del tipo celular (B-WT vs B-D) y de la interacción (p<0.0001). Además, se observó un incremento significativo en células B-D a lo largo de los tiempos evaluados

(Fig. 12A, panel superior, $p=0.03$ por ANOVA- KW). Sin embargo, a nivel de proteína se determinó por WB que los niveles de PAP1 (enzima codificada por el gen *LIPIN1*) eran superiores en células B-WT respecto al modelo B-D (Fig. 12B). En cuanto a la proteína DGAT2, se determinó por inmunofluorescencia que las células B-D presentaban una disminución significativa en los niveles de esta proteína respecto a las células B-WT (Fig. 12C). Ambos resultados sugieren una alteración en la biosíntesis *de novo* de acilglicéridos, siendo DG y TG dos productos claves de la vía.

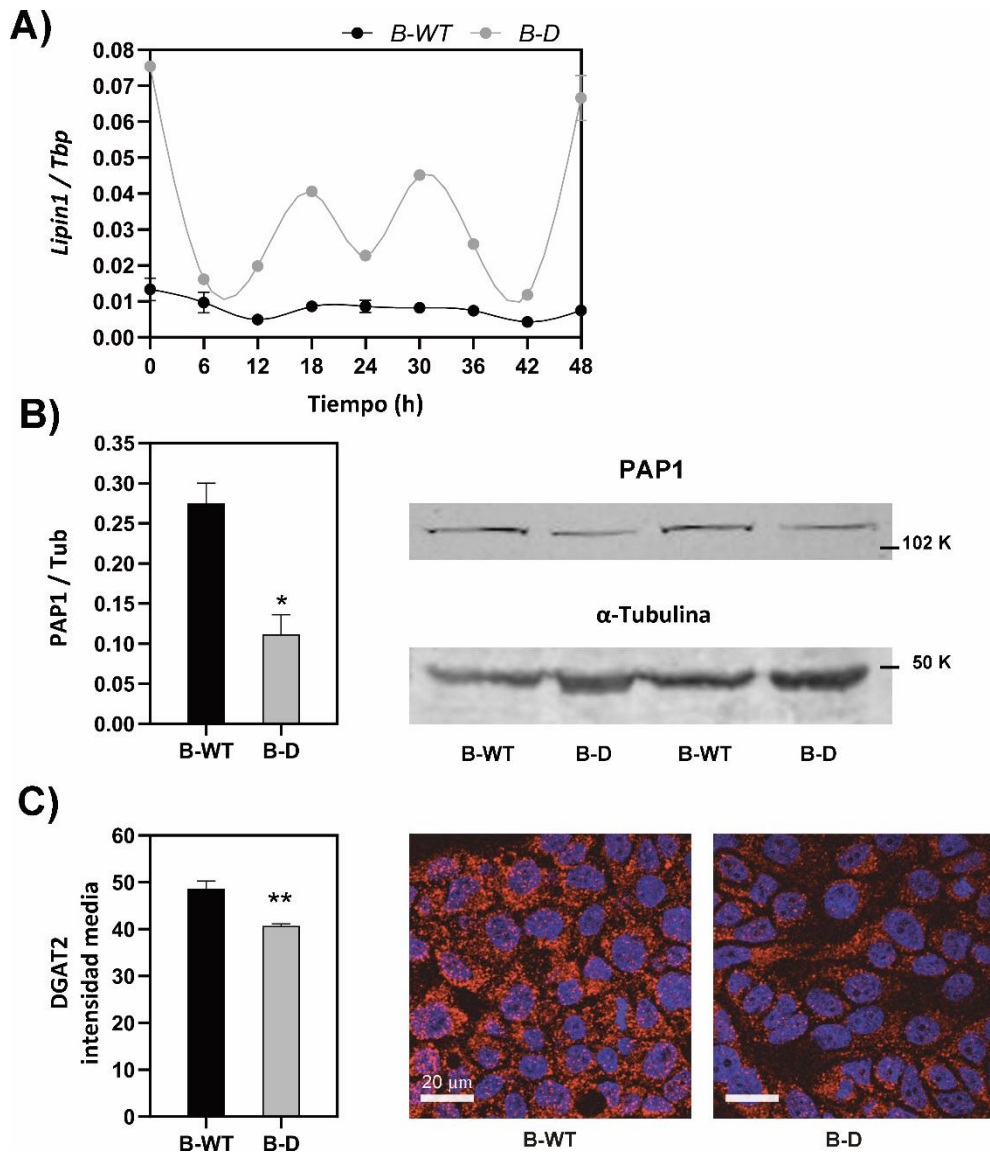


Fig. 12. Alteraciones en la biosíntesis *de novo* de acilglicéridos ante la disrupción de BMAL1. A) Se cultivaron y sincronizaron las células de acuerdo con lo descrito en la sección de Materiales y Métodos. Se cuantificó por qPCR el transcrito *LIPIN1* (gen que codifica para la enzima PAP1) en relación con el gen de referencia *TBP*. Tanto la curva estándar como las muestras correspondientes a ambas condiciones fueron determinadas en la misma corrida en el equipo “CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, BIO-RAD”.

Las células B-WT (curva negra) no presentaron diferencias significativas en los tiempos evaluados ($p=0.08$ por ANOVA – Bonferroni), pero si las células B-D (curva gris, $p=0.03$ por ANOVA- KW), en las cuales además se observó un incremento en la amplitud de la oscilación, con un perfil temporal más marcado que las células control (para más detalles referirse a la tabla 6A). **B)** Se determinó por WB la fosfatasa PAP1 y, a diferencia de lo observado con el transcripto, presentó una disminución significativa en las células B-D (barra gris) respecto al control (barra negra) ($p=0.04$ por t-test). Se utilizó α -TUBULINA como control. **C)** Mediante inmunocitoquímica se analizó la proteína DGAT2 involucrada en la formación de TG a partir de DG. Se observó una disminución significativa de la proteína en las células B-D (barra gris) respecto al control (B-WT, barra negra) ($p=0.001$ por t-test). En los gráficos se representa la media \pm el error estándar ($n=2$ en A y B; $n=6$ en C). Barra de escala: 20 μ m. KW: Kruskal Wallis. * $p<0.05$; ** $p<0.01$.

Por otro lado, se evaluó la biosíntesis *de novo* de PC, especialmente pasos claves en la llamada *vía de Kennedy*. Para esto, se analizó por qPCR los niveles de ARNm de los genes *CHOK α* y *PEMT* (*Phosphatidylethanolamine Methyltransferase*, que codifica para la proteína que genera PC a partir de la triple metilación de PE) a lo largo de 48 h post-sincronización (Fig. 13). A nivel de proteína se determinó por ICC los niveles relativos de las enzimas *CHOK α* y *CCT β* (Fig. 13C y 12D respectivamente). Los niveles relativos del transcripto de *CHOK α* presentaron efectos significativos del tiempo, del tipo celular y de la interacción ($p<0.0001$ por ANOVA de dos vías) con períodos más cortos que 24 h (Fig. 13A, Tabla 6A). Los niveles de *CHOK α* fueron significativamente menores en el modelo B-D (líneas grises) respecto al control (líneas negras), tanto a nivel de ARNm como a nivel de proteína (Fig. 13A y 13B, respectivamente). Se observó un efecto significativo del tiempo y del tipo celular a nivel de la proteína de *CHOK α* ($p=0.04$ y $p<0.0001$, respectivamente por ANOVA de dos vías), pero no así de su interacción ($p=0.5$). Por otro lado, en relación con *CCT β* , la enzima limitante de la vía se observó por ICC un cambio notorio en la fluorescencia y localización intracelular en las células B-D respecto al control (B-WT). Se pudo determinar no sólo un incremento significativo en los niveles totales de la proteína (Fig. 13D, gráfico de barras, barras grises) sino también una redistribución intracelular, con una translocación desde el citoplasma celular, lugar donde ejerce su función la enzima, al nucleolo de las células B-D (Fig. 13D, microfotografías, proteínas *CCT β* en rojo).

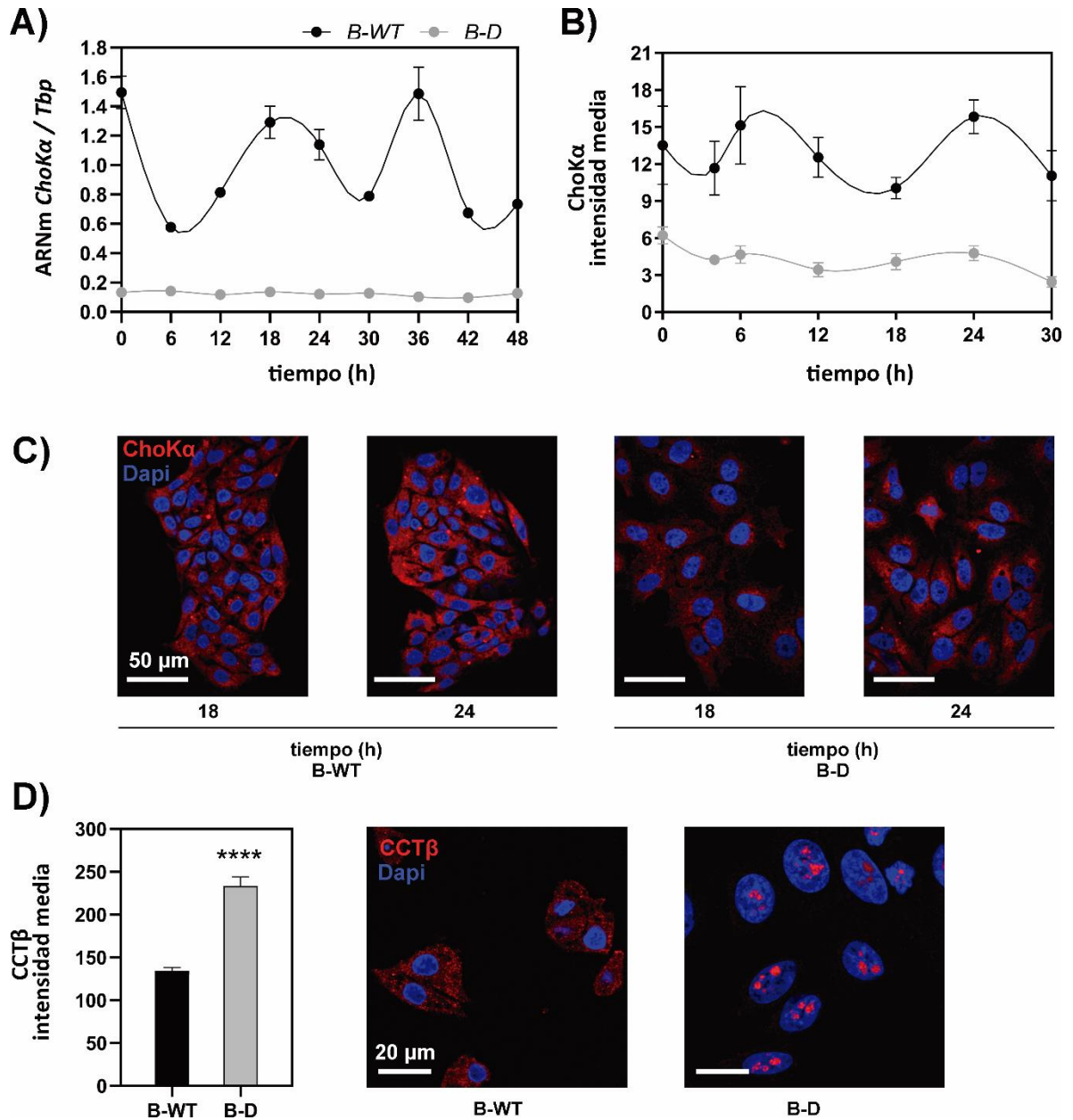


Fig. 13. Alteraciones en la vía de Kennedy ante la disrupción de BMAL1. A) Las células fueron cultivadas y sincronizadas de acuerdo con lo descrito en la sección de Materiales y Métodos. Se cuantificó por qPCR los transcritos de CHOK α (relativos al gen TBP) en ambos modelos de estudio. La gráfica representa la media \pm el error estándar para cada tiempo ($n=2$). Tanto la curva estándar como las muestras correspondientes a ambos modelos fueron determinadas en la misma corrida en el equipo "CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, BIO-RAD". Las células B-WT (línea negra) presentaron oscilaciones con diferencias significativas a lo largo de las 48 horas evaluadas ($p=0.04$ por ANOVA - KW). Por el contrario, las células B-D (línea gris) presentaron una expresión mucho menor del transcritos en comparación a las células control, y además no se observaron diferencias a lo largo de los tiempos evaluados ($p=0.09$ por ANOVA - KW). B) Se representa la cuantificación de la proteína CHOK α por inmunocitoquímica. La gráfica muestra la media \pm el error estándar para cada tiempo ($n=6$). Se registraron diferencias significativas a lo largo de las 30 horas evaluadas en las células B-D (línea gris) ($p=0.003$ por ANOVA - Bonferroni), las cuales además presentaron menor amplitud que las células B-WT. En estas últimas no se registraron diferencias temporales

post-sincronización ($p=0.2$ por ANOVA – KW). Como se observó en los niveles de ARNm, las proteínas de CHOK α presentan una disminución marcada en las células HepG2 luego de la disrupción de BMAL1. Para más información periódica referirse a la tabla 6A. C) Microfotografías representativas de la cuantificación presentada en B. Se presentan imágenes de inmunofluorescencia a los tiempos 18 y 24 horas post-sincronización. D) Inmunocitoquímica de la enzima CCT β , transferasa limitante de la vía de biosíntesis de PC (vía de Kennedy). El gráfico de barras representa la media \pm el error estándar ($n=8$). Se observa un incremento significativo en las células B-D (barra gris) con respecto a las células control ($p<0.0001$ por t-test), junto con una notable translocación de la proteína al nucléolo (puntos brillantes rojos presentes dentro de los núcleos celulares marcados con DAPI en azul). KW: Kruskal Wallis. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Por otro lado, también se analizaron los transcritos *PEMT*, que codifican para la enzima con el mismo nombre encargada de generar PC a partir de la triple metilación de PE. Los niveles relativos de ARNm presentaron oscilaciones a lo largo del tiempo con perfiles similares en ambos modelos de estudio, pero con una leve diferencia de fase (Fig. 14, tabla 6A), lo cual supone que no habría una activación diferencial de esta enzima en el modelo de disrupción. Se observó un efecto significativo del tiempo en ambos tipos de células, pero no así entre los dos modelos celulares estudiados ($p<0.0001$ y $p=0.6$, respectivamente por ANOVA de dos vías).

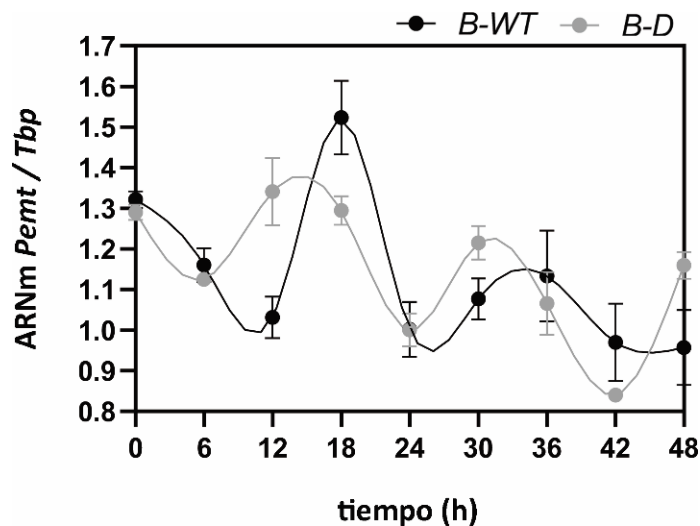


Fig. 14. Expresión relativa del gen *PEMT*. Mediante la técnica de qPCR se cuantificó la abundancia relativa del transcripto del gen *PEMT*. El gen de referencia utilizado fue el de *TBP*. En la gráfica se presenta la media \pm el error estándar para cada tiempo ($n=2$). Tanto la curva estándar como las muestras correspondientes a cada modelo fueron determinadas en la misma corrida en el equipo "CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, BIO-RAD". Las células B-D presentaron diferencias significativas a lo largo de las 48 h estudiadas ($p=0.0005$ por ANOVA – Bonferroni, línea gris) mientras que las células control no (B-WT, línea negra) ($p=0.1$ por ANOVA – KW). El efecto de la disrupción de *BMAL1* genera un cambio de fase en las células B-D respecto a las B-WT (ver tabla 6A para más detalles).

Ritmos en gotas lipídicas y el efecto de la disrupción de BMAL1

En otra serie de experimentos, se evaluó la regulación temporal en la acumulación de lípidos en las gotas lipídicas (GLs) en ambos grupos de estudio (B-WT y B-D). Las células fueron sincronizadas y procesadas como se describió previamente en la sección de Materiales y Métodos. Se evaluaron el número de GLs por célula, su tamaño y el área porcentual que ocupaban respecto al área total de la célula. El análisis se llevó a cabo a lo largo de 30 horas post-sincronización, en intervalos de 6 horas. Se analizó por ANOVA de dos vías el efecto del tiempo, del tipo celular y la interacción para cada parámetro evaluado (número, tamaño promedio y área porcentual). En relación con el número de gotas lipídicas, se observó un efecto significativo del tiempo y de la interacción ($p < 0.0001$ y $p = 0.002$, respectivamente) pero no así del tipo celular ($p = 0.1$). En cuanto al tamaño promedio, se determinaron efectos significativos del tipo celular, del tiempo y de la interacción ($p < 0.0001$, $p = 0.001$ y $p = 0.008$, respectivamente). Por último, el área porcentual también presentó efectos significativos en todos los aspectos evaluados ($p < 0.0001$ para el efecto del tiempo y del tipo celular, y $p = 0.004$ para la interacción).

Cuando evaluamos cada modelo de estudio por separado, los resultados demostraron que las GLs presentan diferencias significativas a lo largo del tiempo en los tres parámetros evaluados: número (B-WT: $p = 0.001$ por ANOVA – Bonferroni; B-D: $p = 0.0002$ por ANOVA – KW), área porcentual (B-WT: $p = 0.01$ por ANOVA – Bonferroni; B-D: $p = 0.0002$ por ANOVA – KW) y tamaño promedio (B-WT: $p = 0.04$ y B-D: $p = 0.009$, ambos por ANOVA – KW). Sin embargo, el modelo de disrupción del reloj (B-D) presentó un efecto marcado en las gotas lipídicas en la franja temporal evaluada que se diferencia de las células control. El tamaño promedio y el área porcentual de GLs en células B-D (Fig. 15A, panel central y derecho, líneas grises) fueron significativamente menores respecto al control (B-WT, líneas negras). Además, las células B-WT presentaron oscilaciones marcadas en el número y área porcentual de GLs con períodos cortos de aproximadamente 14 h (tabla 6B, Fig. 15A panel izquierdo y central, líneas negras), mientras que en las células B-D las oscilaciones en tamaño y área porcentual fueron significativamente menores y presentaron períodos más largos (tabla 6B, Fig. 15A panel central y derecho, líneas grises). En cuanto al número de GLs, si bien se determinaron diferencias estadísticas significativas a lo largo del tiempo evaluado en ambos modelos y perfiles oscilatorios similares, se observó una leve diferencia en la amplitud y la fase de las oscilaciones entre ambos grupos celulares (Tabla 6B).

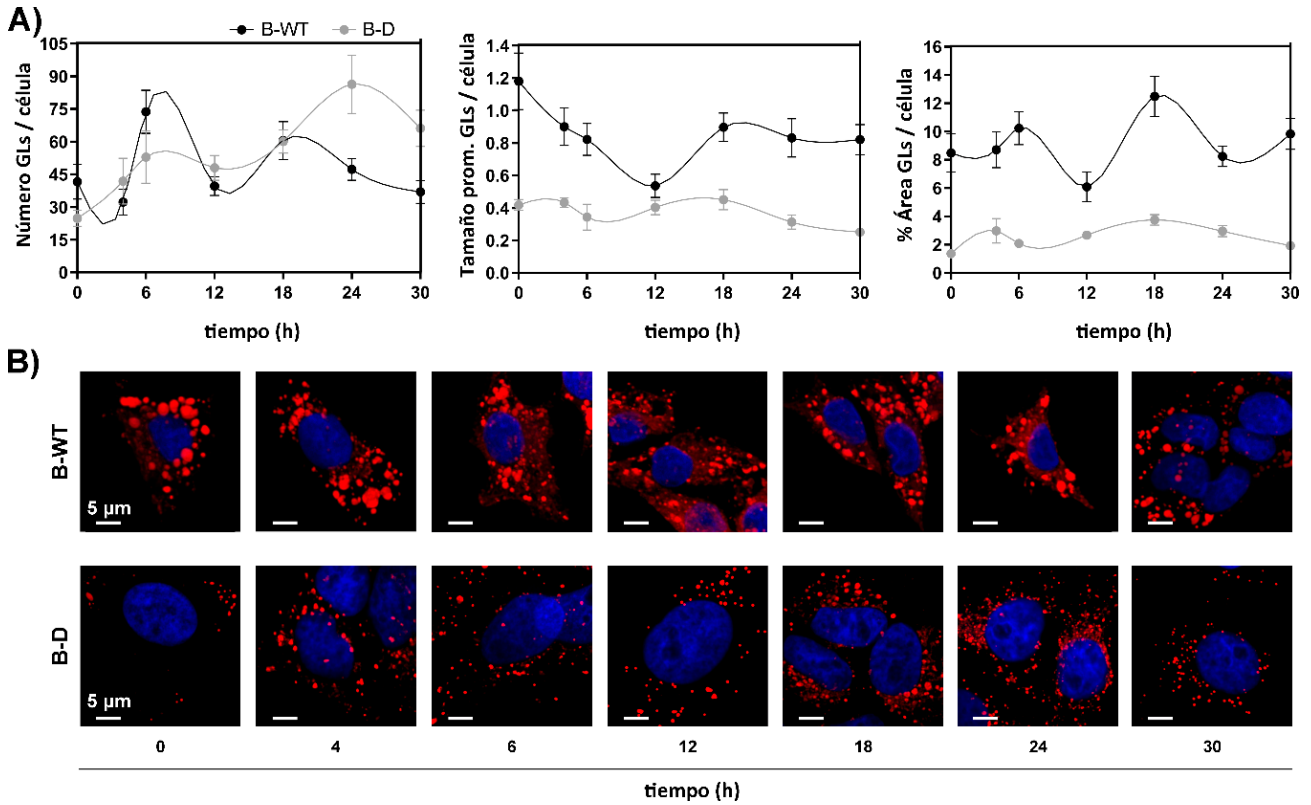


Fig. 15. Alteraciones en el almacenamiento de lípidos neutros en gotas lipídicas (GLs) luego de la disrupción de BMAL1. Las células fueron crecidas y sincronizadas como se describió en la sección de Materiales y Métodos. Luego se realizó la tinción de GLs mediante el uso de Nile Red. **A)** Los parámetros de número, tamaño promedio y área porcentual de GLs fueron evaluados a lo largo de 30 horas post-sincronización. Las gráficas representan el valor de la media \pm el error estándar de los datos a cada tiempo evaluado ($n=7-11$). Las células B-WT (curvas negras) presentaron cambios temporales en el número ($p=0.001$ por ANOVA - Bonferroni), tamaño promedio ($p=0.04$ por ANOVA - KW) y % área ($p=0.01$ por ANOVA - Bonferroni). Estas diferencias significativas a lo largo de los tiempos evaluados también se mantuvieron en las células B-D (curvas grises) (número, tamaño y % área con valores de $p=0.0002$, $p=0.0002$ y $p=0.01$, respectivamente, por ANOVA - KW). Luego de la disrupción de BMAL1 se observaron diferencias menores respecto al número de GLs, aunque se registró una reducción notoria en los parámetros de tamaño promedio y área porcentual (aproximadamente del 50 y 75%, respectivamente) en comparación a las células control. **B)** Microfotografías representativas de la morfología de las GLs a los diferentes tiempos evaluados. Los núcleos celulares se encuentran teñidos con DAPI y de color azul. Barra de escala: 5 μ m. KW: Kruskal Wallis.

Cambios en el perfil lipídico a partir de la disrupción de BMAL1

A fin de ampliar el estudio sobre el metabolismo lipídico en células proliferativas derivadas de hepatocarcinoma que presentaban un reloj intrínseco alterado (B-D) o no (B-WT), evaluamos los niveles endógenos de diferentes clases de lípidos mediante la técnica de HPLC-MS (Fig. 16). Comparamos el perfil lipídico de ambos modelos de estudio para evidenciar posibles alteraciones

en la composición lipídica desencadenadas por la interrupción de *BMAL1*. A partir de células sin sincronizar se extrajeron los lípidos totales siguiendo el protocolo detallado en Materiales y Métodos. Los iones detectados por el espectrómetro fueron identificados y agrupados en diferentes especies lipídicas como se muestra en el gráfico a continuación, a fin de analizar sus composiciones relativas:

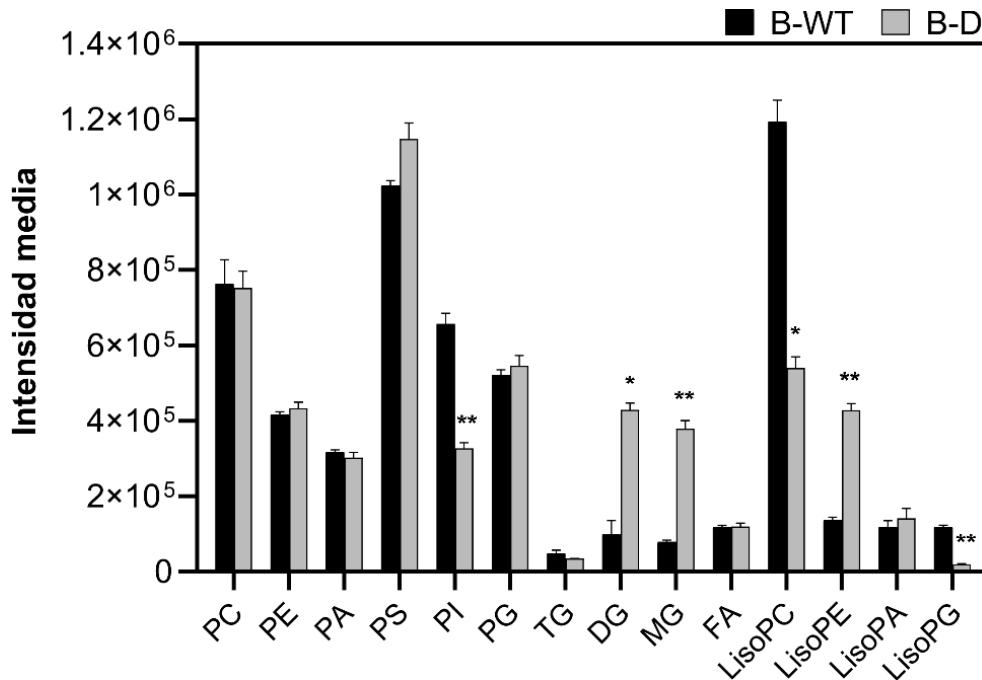
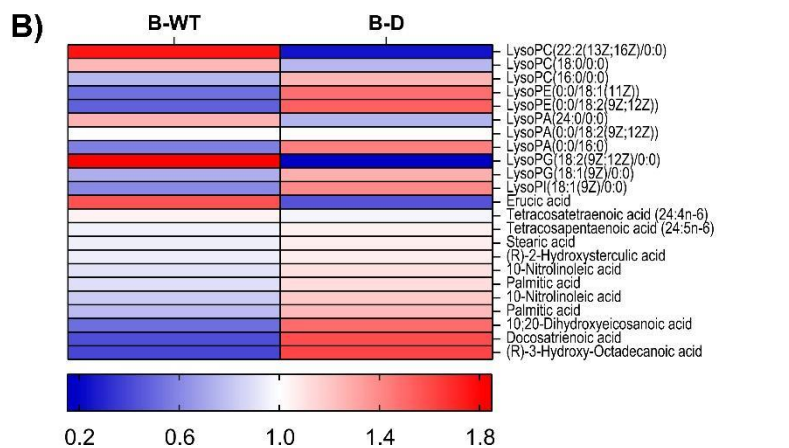
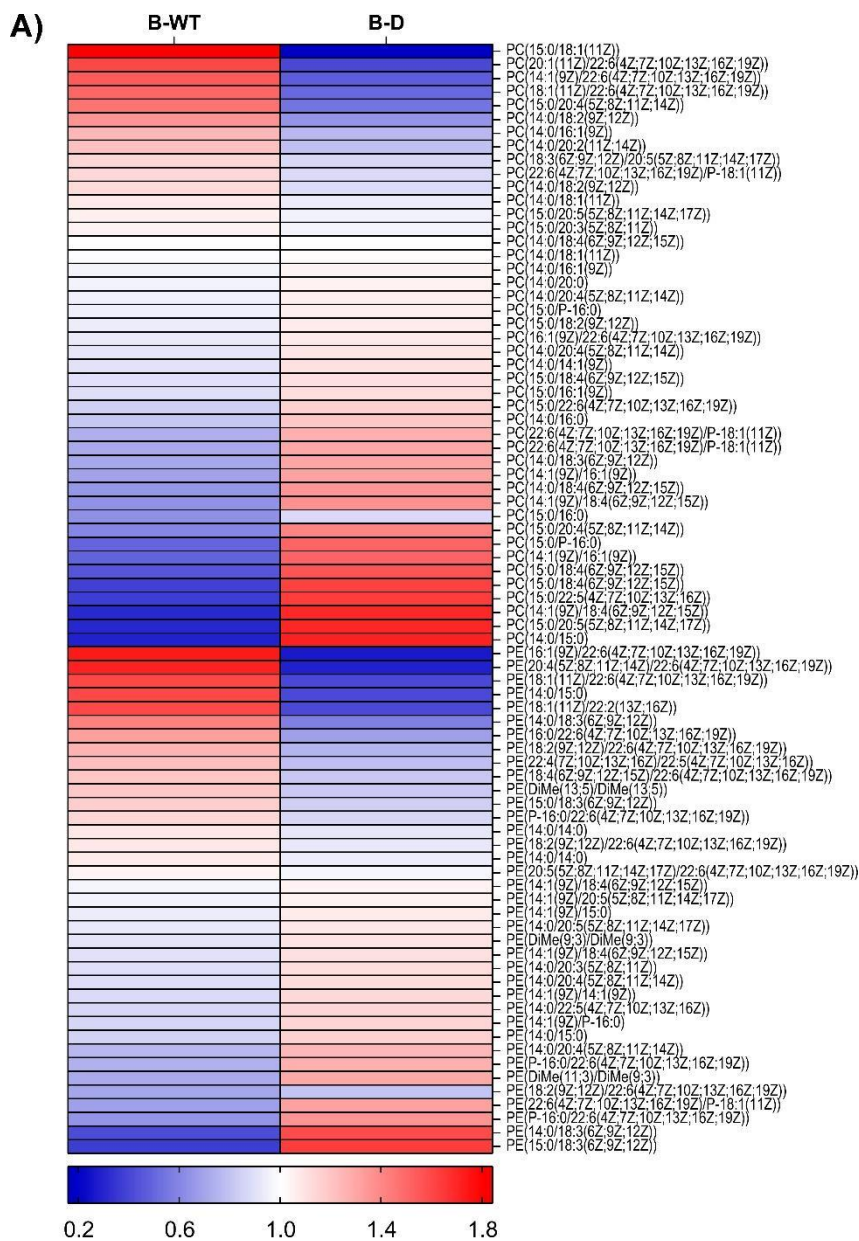


Fig. 16. Comparación del perfil lipídico en células B-WT y B-D. Se determinaron mediante HPLC-MS los lípidos presentes en cada uno de los modelos de estudio. En el gráfico se muestra la sumatoria de las intensidades medias de cada ión *m/z* detectado ($n=2$), agrupados en diferentes especies lipídicas. PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; PA: ácido fosfátido; PS: fosfatidilserina; PI: fosfatidilinositol; PG: fosfoglicéridos; TG: triglicérido; DG: diacilglicerol; MG: monoacilglicerol; FA: ácido graso. Se registró una disminución significativa en las células B-D en los niveles de PI ($p=0.009$), Liso PC ($p=0.01$) y Liso PG ($p=0.002$); y un incremento en DG ($p=0.02$), MG ($p=0.005$) y Liso PE ($p=0.004$). Diferencias analizadas estadísticamente por *t*-test. * $p<0.05$; ** $p<0.01$.

Células B-WT y B-D crecidas en condiciones proliferativas fueron procesadas por duplicado a fin de evaluar el contenido lipídico de ambos modelos. Los datos mostrados son la resultante de un único experimento realizado por duplicado para cada modelo de estudio sin sincronización previa. Como se puede observar en la Figura 16, los niveles de fosfatidilinositol (PI), liso-PC y liso-PG fueron significativamente menores en las células B-D (barras grises) respecto al control B-WT (barras negras). Por el contrario, lípidos neutros como MG y DG presentaron un incremento significativo en células B-D, al igual que los liso-PE (Fig. 16).

Cabe destacar que tanto el método de HPLC como la columna de separación utilizados, fueron puestos a punto principalmente para el análisis de fosfolípidos, moléculas que presentan una cierta polaridad en su estructura. Es por ello que esta técnica no permite detectar eficientemente lípidos polares voluminosos, tales como los triglicéridos, para lo cual se emplearon previamente otras metodologías más sencillas y eficientes.

El método de espectrometría permite analizar en detalle la composición de ácidos grasos presentes en los diferentes lípidos detectados. En la presente tabla se detallan las composiciones de ácidos grasos presentes en los principales grupos de lípidos evaluados:



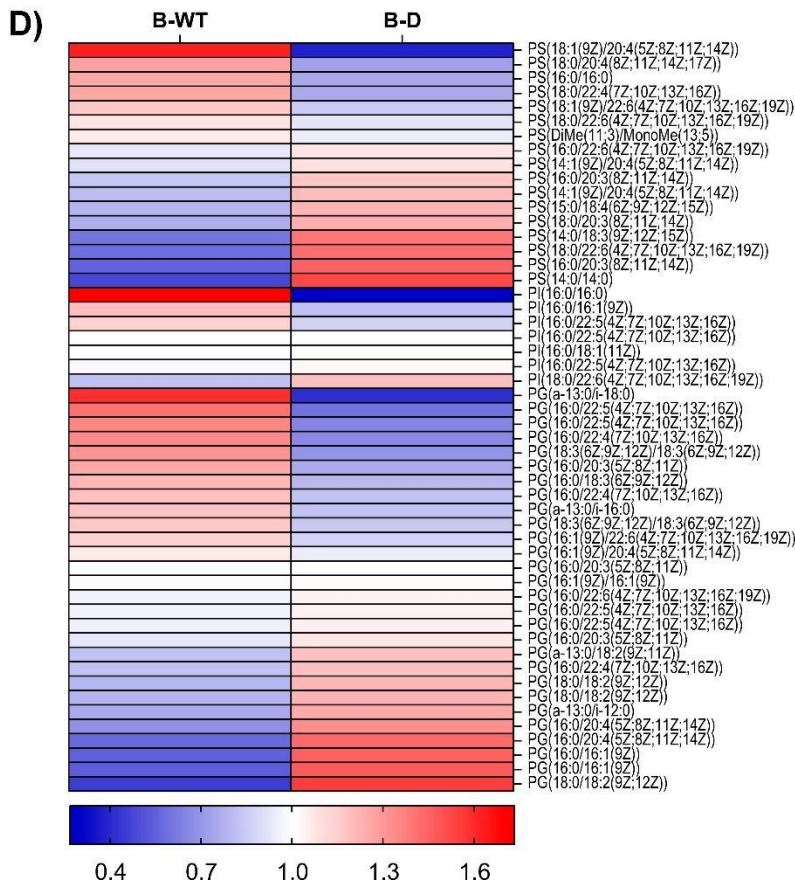
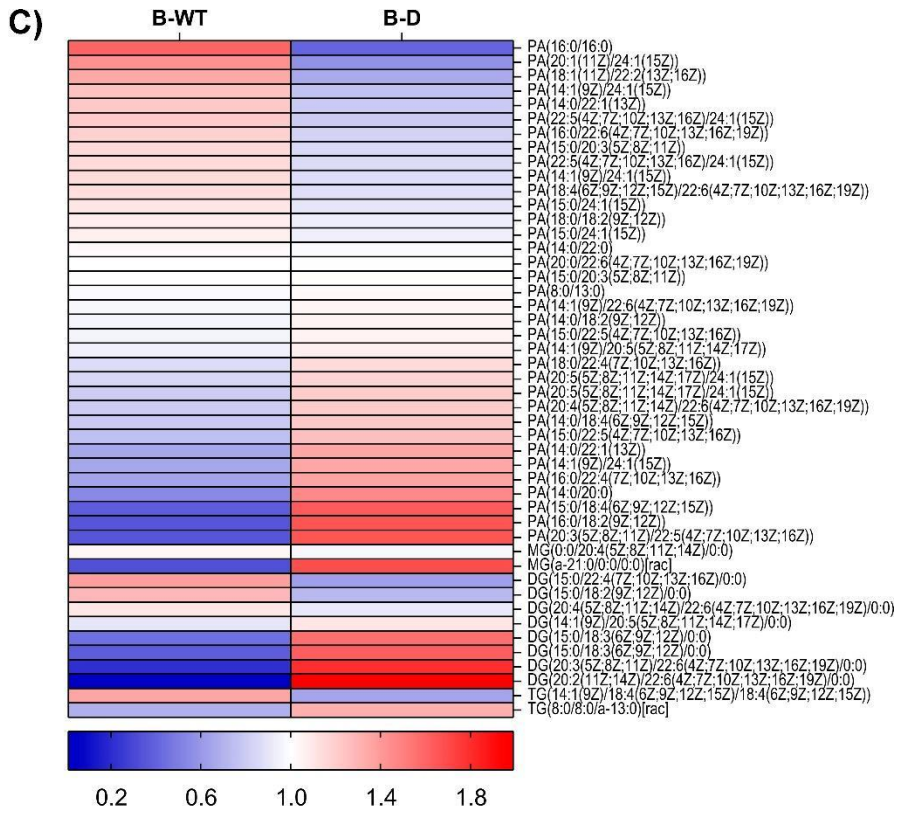


Fig.16. Composición de ácidos grasos de los lípidos principales en células B-WT y B-D. Se analizó la composición del total de lípidos fríos extraídos de acuerdo a lo especificado en la sección de materiales y métodos. Los iones m/z detectados por el equipo de espectrometría (MS) se analizaron en el programa *MetaboAnalysis* y se pudieron identificar los lípidos que se detallan a la derecha del gráfico de heatmap. En la nomenclatura se utiliza la forma (X:Y) para detallar la cantidad de carbonos que poseen los ácidos grasos que esterifican el compuesto (X) y sus insaturaciones (Y). A su vez se especifica de la forma “númeroZ” a la posición de estas insaturaciones. Se grafican los valores obtenidos en cada modelo (B-WT o B-D) ($n=2$) en función de la media entre ambos para cada lípido identificado. En color rojo se representan los valores relativos mayores y en azul los menores. Los valores cercanos a la media se presentan en color blanco, lo cual significa que no difieren entre modelos. PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; PA: ácido fosfatídico; PS: fosfatidilserina; PI: fosfatidilinositol; PG: fosfoglicéridos; TG: triglicérido; DG: diacilglicerol; MG: monoacilglicerol; FA: ácido graso.

En un análisis más exhaustivo observamos un marcado cambio en la naturaleza de las cadenas de ácidos grasos (AGs) que esterifican a algunas clases de lípidos (Fig. 17). En términos generales, los AGs de 22 carbonos con diferentes grados de insaturaciones fueron detectados en menor medida en las células B-D (color azul) respecto a las B-WT (color rojo) en los lípidos PC (22:6/-:-), PE (22:6/-:-) (Fig. 17A) y PG (Fig. 17D). Por el contrario, se observó un incremento en los ácidos grasos de 22 carbonos en los lípidos PA y DG en células B-D (color rojo) respecto al control (color azul) (Fig. 17C). Además, se determinó un incremento en los AGs de 18 carbonos en PC (18:4/-:-) (Fig. 17A), DG (18:3/-:-) (Fig. 17C), PI (18:0/-:-) y PG (18:2/-:-) (Fig. 17D) luego de la disrupción de *BMAL1* (color rojo).

También observamos un patrón interesante en lo que respecta al ácido palmítico (16:0). Las células B-D muestran una marcada disminución (color azul) en PA (16:0/16:0) (Fig. 17C), PS (16:0/16:0) y PI (16:0/16:0) (Fig. 17D), acompañado de un incremento (color rojo) en Liso-PC (16:0/0:0) y Liso-PA (16:0/0:0) (Fig. 17B).

Finalmente, uno de los lípidos que presentó una significativa reducción en las células B-D sometidas a la disrupción del reloj fue PC (14:0/20:2), que también puede ser identificada como PC (34:2) (color azul, Fig. 17A). En estudios previos se determinó que esta especie lipídica constituye un marcador urinario de obesidad, lo cual significaría un indicio clave en la perturbación del metabolismo lipídico a partir de la disrupción de *BMAL1* [230].

Efectos metabólicos ante el tratamiento con el agonista de REV-ERB “SR9009”

Como se describió previamente, existe evidencia respecto a la regulación temporal del metabolismo por parte del reloj circadiano, así como una mayor predisposición al desarrollo

tumoral ante la perturbación crónica de estos procesos. La modulación farmacológica de la maquinaria del reloj como estrategia terapéutica se evidenció recientemente con la utilización de agonistas de la proteína reloj REV-ERB (llamados SR9009 y SR9011), los cuales presentaron un efecto letal en células cancerígenas [87].

Para evaluar el efecto del tratamiento de los dos modelos celulares con el agonista SR9009, en una primera instancia se cultivaron las células como se describió anteriormente en la sección de Materiales y Métodos, y se realizó un ensayo de sobrevida celular utilizando MTT (Fig. 18, panel izquierdo), donde se evaluó la funcionalidad mitocondrial en ambos modelos de estudio. Se encontró un efecto citotóxico dosis dependiente del SR9009 en ambos tipos celulares. Mediante un análisis de ANOVA de dos vías se observaron efectos significativos del tiempo y del tipo celular ($p < 0.0001$). Tanto en células B-WT como en células B-D se determinó un efecto dosis dependiente del tratamiento con máximo efecto a 40 μM de SR9009 en la sobrevida celular y una dosis efectiva 50 alrededor de 20 μM . Es de destacar que a altas concentraciones de SR9009 (20 y 40 μM), las células B-D resultaron más resistentes al tratamiento; efectivamente se observó una disminución significativa de las células B-WT respecto a las B-D para dichos tratamientos de 20 y 40 μM ($p = 0.000008$ y $p = 0.001$ por t-test, respectivamente). Cuando se utilizó una concentración de SR9009 de 20 μM , la sobrevida celular decayó aproximadamente un 62% en las células B-WT y un 48% en las células B-D, mientras que a mayor dosis (40 μM) se observó una disminución aproximada del 82% y 75% para los modelos B-WT y B-D, respectivamente (Fig. 18, panel izquierdo). Cabe destacar que en términos generales los resultados sugieren una mayor resistencia de las células B-D ante el tratamiento citotóxico, en comparación a las células B-WT que presentan una disminución más marcada en la sobrevida celular.

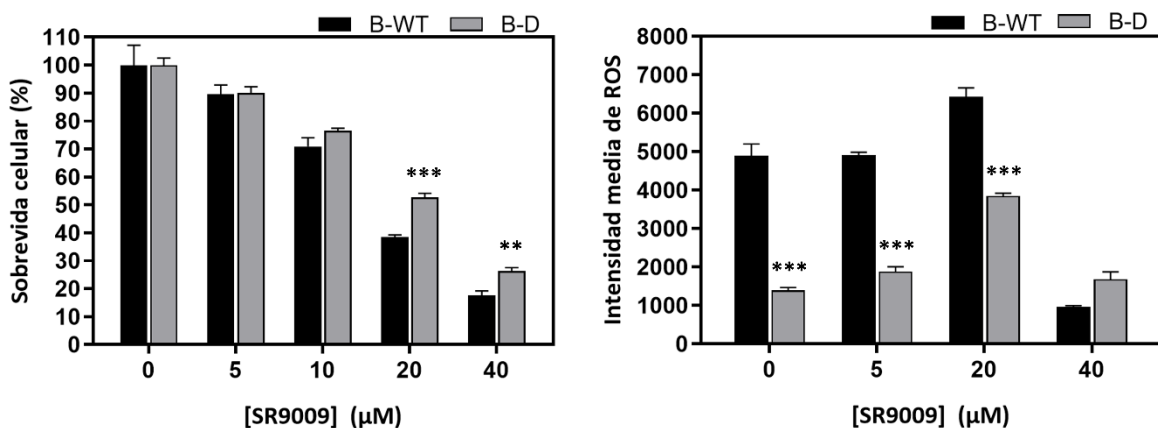


Fig. 18. Tratamiento con SR9009 durante 96 h. Se evaluó el efecto en la sobrevida celular ante el tratamiento con diferentes concentraciones del agonista de REV-ERB SR9009 en ambos modelos de estudio (panel izquierdo). En la gráfica se presenta la media \pm el error estándar a los distintos tiempos evaluados

($n=6$). A una concentración de $20 \mu\text{M}$ se observó una disminución significativa en la supervivencia de las células B-WT (barras negras) respecto a las B-D (barras grises) ($p=0.000008$ por t-test). Lo mismo se determinó para la mayor concentración evaluada, $40 \mu\text{M}$ ($p=0.001$ por t-test). También se evaluó el contenido de ROS a diferentes concentraciones (panel derecho). En la gráfica se presentan las medias \pm el error estándar a los distintos tiempos evaluados ($n=3$). Se observó una disminución significativa en las células B-D respecto a las B-WT en los tratamientos con SR9009 $5 \mu\text{M}$ ($p=0.000003$ por t-test) y $20 \mu\text{M}$ ($p=0.0001$ por t-test). Esta disminución en ROS en las células que presentan la disrupción de *BMAL1* se presentó incluso en condiciones control sin el agonista ($p=0.0002$ por t-test). No se determinaron diferencias significativas entre ambos modelos ante el tratamiento con SR9009 $40 \mu\text{M}$ ($p=0.06$ por t-test). ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

En otra serie de experimentos se determinó el contenido de especies reactivas del oxígeno (ROS) ante el tratamiento con diferentes concentraciones del agonista SR9009 (Fig. 18, panel derecho) a fin de evaluar en términos generales el efecto de esta droga sobre el metabolismo redox. Se observaron diferencias significativas entre las células B-WT y B-D no sólo en condiciones basales ($p=0.0002$ por t-test) sino también ante el tratamiento con SR9009 a concentración final de 5 y $20 \mu\text{M}$ ($p=0.000003$ y $p=0.0001$ por t-test, respectivamente). En todos los casos la cantidad de ROS fue menor en las células B-D respecto a las B-WT, al igual que se evidenció previamente en la figura 11. La disminución de la supervivencia celular asociada al incremento de la concentración de la droga puede estar relacionada con una disminución en la funcionalidad mitocondrial, denotada por el incremento de las especies reactivas del oxígeno mayoritariamente en células B-WT, lo que podría ser una señal inductora de apoptosis celular. Cuando se evaluaron los niveles de ROS luego del tratamiento con SR9009 $40 \mu\text{M}$, se observó una abrupta disminución respecto al tratamiento con SR9009 $20 \mu\text{M}$ tanto en células B-WT como en B-D (disminución del 83% y 50%, respectivamente). En estas condiciones se registró un leve aumento de ROS en las células que poseen la disrupción de *BMAL1* respecto a las células control, aunque la diferencia no fue significativa ($p=0.06$ por t-test). Estos registros podrían indicar la activación de otro tipo de mecanismo de muerte celular a concentraciones elevadas del compuesto. En conclusión, la mayor supervivencia observada en las células B-D en comparación al control (B-WT) pone de manifiesto una reducción en el efecto de la droga cuando el reloj molecular se encuentra alterado.

Por último, se determinó el contenido de gotas lipídicas en células B-WT y B-D luego del tratamiento con el agonista de REV-ERB SR9009 a una concentración de $40 \mu\text{M}$ (Fig. 19). En estas condiciones extremas del tratamiento, se observó que tanto el número, como el área porcentual y tamaño promedio de las gotas lipídicas (GLs) fueron menores en las células B-D (barras grises) respecto a las B-WT (barras negras), tal como se describió previamente. Sin embargo, cuando se evaluó el efecto del tratamiento en cada modelo por separado, en ambos se registró un

incremento tanto en el área porcentual como en el tamaño promedio de las GLs ante el tratamiento con el agonista (Fig. 19).

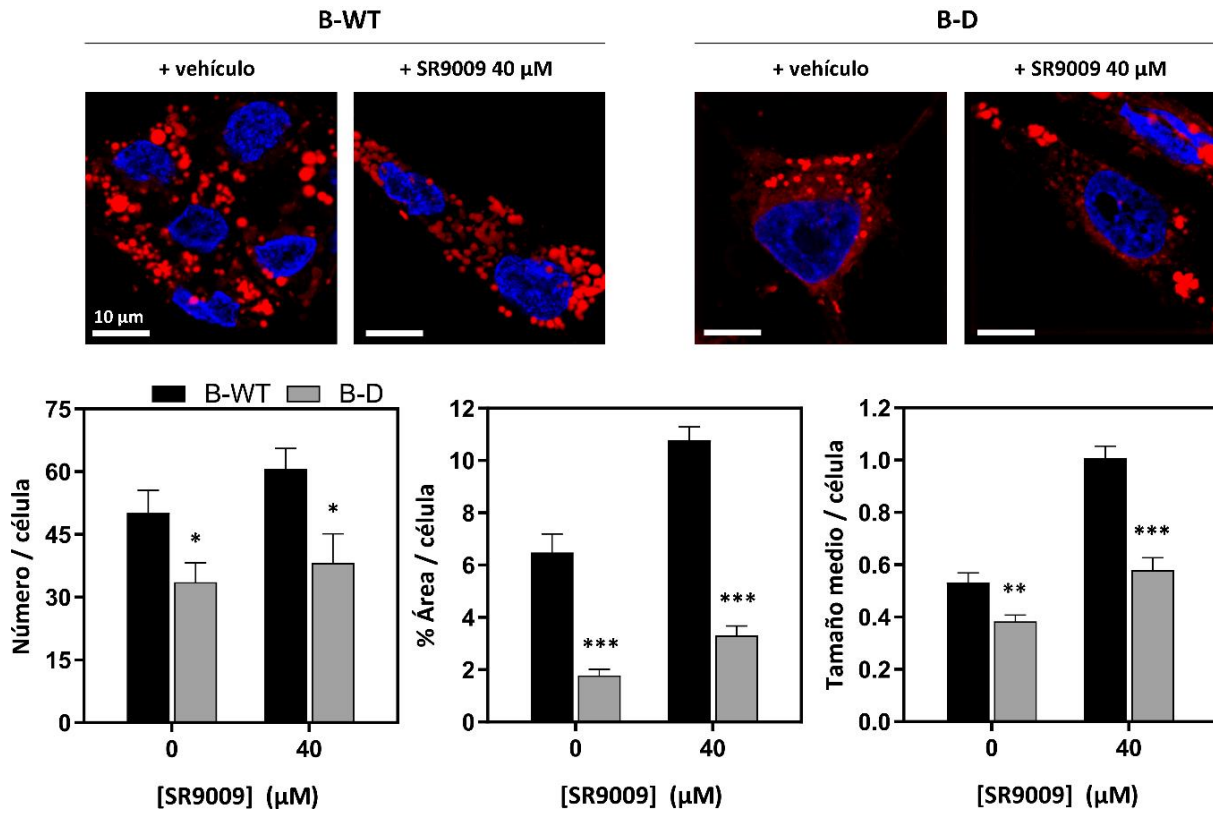


Fig. 19. Descripción de gotas lipídicas ante el tratamiento con SR9009 40 μM. Las células se trataron durante 96 h con SR9009 40 μM. Luego se fijaron las células, se marcaron las gotas lipídicas (GLs) con Nile Red y se evaluó su morfología al microscopio confocal tal como se describió en la sección de materiales y métodos. **Número:** las células B-D presentaron menores valores respecto a las B-WT tanto en condiciones control ($p=0.02$) como ante el tratamiento con SR9009 40 μM ($p=0.01$). El tratamiento con el agonista no modificó significativamente el número de GLs ni en las células B-WT ($p=0.2$) ni en las BCHO-D ($p=0.6$). **Área porcentual:** las células B-D presentaron menores valores respecto a las B-WT tanto en condiciones control ($p=0.000001$) como ante el tratamiento con SR9009 ($p=0.000001$). El tratamiento con SR9009 40 μM generó un aumento en el % área en células B-WT ($p=0.00001$) y en células B-D ($p=0.0005$) respecto al control. **Tamaño promedio:** al igual que con los demás parámetros, las células B-D presentaron una disminución significativa en el tamaño de GLs tanto en condiciones control ($p=0.002$) como ante el tratamiento con el agonista ($p=0.000001$) respecto a las células B-WT. El tratamiento con SR9009 40 μM incrementó significativamente el tamaño medio de las GLs tanto en células B-WT ($p=0.000001$) como en células B-D ($p=0.0003$). En todos los casos se grafica la media \pm el error estándar ($n=14-23$) y el análisis estadístico se realizó por la prueba de t-test. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$; **** $p<0.0001$.

IV. ANÁLISIS PERIÓDICO DE LOS DATOS. METACYCLE

Tal como se describió en la sección de Materiales y Métodos, los datos obtenidos de los experimentos “circadianos”, donde las células fueron sincronizadas y se tomaron muestras a

diferentes tiempos post-sincronización, fueron analizadas por *MetaCycle* para determinar si existía o no un efecto del tiempo en el comportamiento de los datos. En todos los casos se consideraron las medias de cada tiempo evaluado (datos experimentales) y se los ajustó a una curva armónica (función del tipo coseno), considerando diferentes parámetros como fase, amplitud y período de la oscilación. De esta forma se obtuvo para cada experimento la curva teórica que mejor se ajustaba a los datos experimentales, y de ésta se pudieron determinar los valores de período, fase, amplitud y acrofase de la oscilación, además de los valores máximos y mínimos registrados en los diferentes tiempos estudiados (para más detalles de los elementos de la curva ver la sección de Materiales y Métodos).

Genes reloj y genes controlados por el reloj en células HepG2

En una primera instancia se realizó la descripción periódica de los parámetros evaluados en las células HepG2 como las cantidades relativas de los transcritos de *BMAL1*, *PER1*, *REV-ERB α* (Fig. 1), *PCYT2* y *CHOK α* (Fig. 5); y de las proteínas *BMAL1*, *PER1*, *PER2* (Fig. 3) y *CHOK α* (Fig. 6). En la siguiente Tabla se presentan los resultados obtenidos.

Gen (<i>transcripto</i> o proteína)	Período (h)	Amplitud	Fase (h)	r ²	p-valor	Acrofase (h)	Mínimo / tiempo (h)	Máximo / tiempo (h)
<i>BMAL1/TBP</i>	14.859	0.282	9.563	0.80	0.0033	12	0.5523 / 30	1.1511 / 12
<i>PER1/TBP</i>	14.257	5.644	5.980	0.75	0.0428	6	0.3645 / 42	18.6309 / 6
<i>REV-ERBα/TBP</i>	18.539	0.258	6.547	0.96	3.44E-5	6	0.4845 / 36	1.2765 / 6
<i>PCYT2/TBP</i>	15.083	0.241	8.504	0.60	0.0260	6	0.3273 / 48	1.1478 / 6
<i>CHOKα/TBP</i>	15.083	0.239	11.505	0.52	0.0458	42	0.8296 / 18	1.6104 / 42
BMAL1	13.248	17.249	10.122	1.00	0.0003	12	95.0946 / 30	140.3685 / 12
PER1	22.855	27.378	11.416	1.00	0.0037	12	73.2808 / 30	147.7562 / 12
PER2	15.237	40.310	12.945	0.93	<u>0.1739</u>	12	132.2096 / 6	223.4508 / 12
CHOKα	19.254	2.742	5.6222	0.72	<u>0.0682</u>	24	10.0511 / 18	15.8280 / 24

Tabla 5. Análisis periódico de genes reloj y genes controlados por el reloj en células HepG2. Se llevó a cabo el análisis mediante el paquete *MetaCycle* en el software *R-Studio*. El método *ARSER* fue el elegido para evaluar el comportamiento temporal de la media de los datos (equidistantes). Un p-valor menor a 0.05 indica un ajuste significativo de los datos experimentales a la curva teórica calculada por el programa. Se presentan subrayados los valores de $p > 0.05$. Valores de r^2 cercanos a 1 representan un buen ajuste de los datos. En la primera columna los transcritos analizados están representados con letra itálica y relativos a la expresión de *TBP*, mientras que las proteínas se muestran en mayúsculas. Para más detalles ver la sección de materiales y métodos.

Cabe destacar que en el análisis periódico se obtuvieron en todos los casos períodos menores a las 24 horas de aproximadamente 16 horas (excepto para la proteína de PER1, con un período de 23 horas aproximadamente). Excepto para las proteínas de PER2 y CHOK α ($p=0.2$ y $p=0.07$, respectivamente) se obtuvieron ajustes periódicos significativos, lo cual indica que los datos evaluados muestran oscilaciones con valores de amplitud, fase y período particulares como se detalla en dicha Tabla.

Alteraciones en los ritmos luego de la disrupción de BMAL1. Modelo B-WT vs modelo B-D

El mismo análisis periódico presentado en la tabla anterior se realizó para los parámetros metabólicos y moleculares que se estudiaron luego de la disrupción del reloj (modelo B-D). Estos estudios se pueden dividir en dos grandes grupos. Por un lado, se presenta el análisis a nivel molecular de los transcritos de *REV-ERB α* (Fig. 9), *PEMT* (Fig. 14), *CHOK α* (Fig. 13A) y *LIPIN1* (Fig. 12A); y de la proteína CHOK α (Fig. 13B), todos implicados en el metabolismo lipídico (Tabla 6A). Por otro lado, se incluye el análisis a nivel celular y metabólico del metabolismo lipídico y energético, donde se evaluó la morfología de gotas lipídicas (Fig. 19), el contenido de triglicéridos y lactato (Fig. 10) (Tabla 6B). En la siguiente Tabla 6 se detallan los resultados obtenidos en este análisis.

A) Transcritos y proteínas del metabolismo lipídico

GEN (<i>transcripto</i> o <i>proteína</i>)	Período (h)	Amplitud	Fase (h)	r2	p-valor	Acrofase (h)	Mínimo / tiempo (h)	Máximo / tiempo (h)
<i>REV-ERBα/Tbp</i> (B-WT)	18.654	0.173	3.926	0.94	0.0026	42	0.8036 / 0	1.4862 / 42
<i>REV-ERBα/Tbp</i> (B-D)	17.011	0.334	15.207	0.82	0.0216	48	1.0002 / 24	2.0937 / 48
<i>PEMT/Tbp</i> (B-WT)	14.499	0.168	3.556	0.86	0.0150	18	0.9571 / 48	1.5231 / 18
<i>PEMT/Tbp</i> (B-D)	17.509	0.157	14.630	0.95	0.0018	12	0.8399 / 42	1.3411 / 12
<i>CHOKα/Tbp</i> (B-WT)	17.982	0.392	17.951	0.63	0.0218	0	0.5763 / 6	1.4943 / 0
<i>CHOKα/Tbp</i> (B-D)	14.429	0.012	3.982	0.60	<u>0.1058</u>	6	0.0970 / 42	0.1419 / 6
<i>LIPIN1/Tbp</i> (B-WT)	16.361	0.002	2.111	0.57	<u>0.1168</u>	0	0.0043 / 42	0.0134 / 0

<i>LIPIN1/Tbp</i> (B-D)	16.5414	0.024	15.939	0.96	0.0013	0	0.0118 / 42	0.0754 / 0
CHOK α (B-WT)	19.254	2.742	5.622	0.72	<u>0.0682</u>	24	10.0511 / 18	15.8280 / 24
CHOK α (B-D)	24.000	1.086	22.973	0.90	0.0143	0	2.4416 / 30	6.2195 / 0

B) Contenido y almacenamiento lipídico; y metabolismo energético

Forma de GL. Contenido de TG o LAC	Período (h)	Amplitud	Fase (h)	r ²	p-valor	Acrofase (h)	Mínimo / tiempo (h)	Máximo / tiempo (h)
Número GL (B-WT)	14.291	17.169	6.095	0.99	0.0007	6	37.0000 / 30	71.8889 / 6
Número GL (B-D)	15.393	13.048	7.274	0.92	0.0114	24	24.7857 / 0	86.3077 / 24
% Área GL (B-WT)	14.499	2.768	4.226	0.91	0.0116	18	6.0831 / 12	12.4846 / 18
% Área GL (B-D)	28.514	0.911	16.827	0.80	0.0407	18	1.3664 / 0	3.7495 / 18
Tamaño GL (B-WT)	25.700	0.213	24.830	0.56	<u>0.1330</u>	0	0.5357 / 12	1.1797 / 0
Tamaño GL (B-D)	23.482	0.078	16.846	0.97	0.0028	18	0.2509 / 30	0.4513 / 18
TG (B-WT)	37.192	21.866	33.378	0.59	0.0292	30	24.9948 / 12	104.7712 / 36
TG (B-D)	34.023	11.691	30.598	0.97	0.0007	36	14.9815 / 18	45.9808 / 30
LAC (B-WT)	42.468	35.902	26.107	0.69	0.0121	36	37.4149 / 0	135.9823 / 36
LAC (B-D)	36.963	36.714	32.203	0.37	<u>0.1039</u>	36	56.5148 / 0	256.0268 / 36

Tabla 6. Análisis periódico del efecto de la disrupción de BMAL1 en los ritmos metabólicos. Se utilizó el paquete *MetaCycle* disponible en *R-Studio* y el algoritmo *ARSER* para el ajuste periódico de los datos. **A)** Análisis de transcritos (letra itálica) o proteínas (letras mayúsculas) de genes reloj y enzimas involucradas en la biosíntesis de glicerofosfolípidos. **B)** Evaluación del efecto del tiempo en la morfología de las gotas lipídicas (GL, número, % área y tamaño promedio) y en el contenido de triglicéridos (TG) y lactato (LAC). Un p-valor menor a 0.05 indica un ajuste significativo de los datos experimentales a la curva teórica calculada por el programa. Se presentan subrayados los valores de $p > 0.05$. Valores de r^2 cercanos a 1 representan un buen ajuste de los datos. Para más detalles ver la sección de materiales y métodos.

En términos generales, en la Tabla 6A se observan períodos menores al rango circadiano (entre 20 y 28 h) denominados “ultradianos” de aproximadamente 17 horas, tal como se observa en la

Tabla 5, mientras que en las oscilaciones metabólicas presentes en el contenido de triglicéridos (TG) y lactato (LAC) presentaron períodos más largos que 24 horas (infradianos). En las células control (B-WT) se observaron ajustes periódicos significativos en todos los experimentos circadianos excepto para la cuantificación de los transcritos de *LIPIN1* (B-WT, $p=0.1$), de la proteína *CHOK α* (B-WT, $p=0.07$) y el tamaño de GLs (B-WT, $p=0.1$). Algo similar ocurrió con las células B-D, las cuales presentaron ajustes significativos en la mayoría de los análisis excepto para los transcritos de *CHOK α* (B-D, $p=0.1$) y el contenido de lactato (B-D, $p=0.1$). En cuanto al efecto de la disrupción, se observaron marcadas alteraciones en la amplitud de ciertas oscilaciones (como en el caso del transcritos y proteína de *CHOK α*). En menor medida se registraron cambios en el período y la fase de las oscilaciones o pérdida/ganancia de ritmicidad en células B-D en comparación al control (B-WT). Los detalles de cada experimento se muestran en la Tabla 6.

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Discusión

El hígado de mamíferos constituye un modelo de oscilador periférico de gran importancia para estudiar la regulación circadiana del metabolismo celular y las conexiones que puedan existir entre el reloj molecular y los procesos metabólicos, ya que se trata de un órgano clave para la homeostasis metabólica. Un importante número de evidencias demuestran que la disrupción del reloj molecular causa diversos desórdenes metabólicos conocidos como *síndrome metabólico*, que involucran patologías como la obesidad, la diabetes tipo II, hiperlipidemia, entre otras; al igual que promueve un mayor riesgo de cáncer [39][204][206][231][199].

Los resultados obtenidos en esta tesis están de acuerdo con los trabajos previos realizados con células HepG2 mantenidas en condiciones sin suero, las cuales fueron capaces de ser sincronizadas y presentaron ritmos en la expresión de genes reloj [232]. Nuestro estudio revela por primera vez que células HepG2, derivadas de hepatocarcinoma humano, mantenidas en condiciones de proliferación (10% SFB) contienen un *reloj celular* intrínseco que controla diversas funciones celulares y metabólicas, en especial aquellas relacionadas a la biosíntesis de GFLs, TGs y GLs. Es notable que el metabolismo de GFLs en hígado de mamíferos está sujeto a un control temporal preciso, como ha sido demostrado previamente en animales sincronizados a ciclos de luz/oscuridad o mantenidos en condiciones de oscuridad constantes [91]. En estos estudios se observaron variaciones temporales en el contenido endógeno de GFLs y en la actividad y niveles de expresión de enzimas claves de su biosíntesis, tales como CHOK, PAP1 y aciltransferasas. Un dato para remarcar con respecto a las observaciones de este trabajo de tesis es que las células HepG2 en proliferación fueron capaces de mantener oscilaciones autosostenidas en el tiempo luego de un pulso de sincronización con dexametasona (DEX). Esto las torna un potencial blanco terapéutico desde el punto de vista de la cronoterapia como recientemente se postuló para gliomas de diferentes orígenes [36][93][219]. Además, cabe destacar que las oscilaciones reportadas en este estudio tanto a nivel de ARNm como de proteína, en lo que respecta a genes reloj, genes controlados por el reloj y enzimas regulatorias de la biosíntesis de glicerofosfolípidos, presentan ritmos bimodales con períodos aproximados de 16 h (Tabla 5), lo cual es consistente con datos reportados previamente en otros modelos celulares [28][36][219]. Se reportaron diferencias en los períodos observados en los niveles de ARNm y de proteína en células tumorales de glioblastoma T98G que fueron sincronizadas y mantenidas en condiciones proliferativas. Se

observó un acortamiento del período en los niveles de expresión de *PER1* (cerca de las 16 horas), mientras que a nivel de proteína los períodos registrados fueron más largos (cerca de las 24 horas) [219]. A pesar de que las bases moleculares de los ritmos ultradianos (con períodos menores a las 20 h) no han sido determinadas hasta el momento, se postula que podrían deberse a una interacción entre dos componentes circadianos regulatorios diferentes (factores de transcripción, disponibilidad de nutrientes, señales extracelulares, etc.) que poseen fases opuestas [117]. Esta hipótesis pone de manifiesto la gran importancia del vínculo entre un comportamiento rítmico determinado con el metabolismo subyacente, o con procesos celulares particulares como el estado proliferativo de la célula (arresto o proliferación), en especial para las células tumorales.

Varios estudios en humanos y su contraparte en modelos animales muestran la relación molar de PC/PE como un determinante clave de la salud hepática, al punto que un desbalance de los valores normales es considerado un marcador de daño hepático. Dificultades en la síntesis de PC en el hígado y cambios en la composición hepática de GFLs se han vinculado a la enfermedad del hígado graso, como también a una falla hepática, a dificultades en la regeneración hepática luego de la cirugía y a desórdenes metabólicos [171][233]. Asimismo valores anormalmente altos o bajos en los niveles celulares de PC, PE o su relación PC/PE también han sido vinculados con la progresión de estas patologías y con problemas en el metabolismo energético y el bloqueo de la apoptosis [171]. De hecho, la relación PC/PE da cuenta de la integridad de la membrana celular y constituye un factor clave en la progresión de la esteatohepatitis, al haberse observado que una disminución en esta relación molar promueve una pérdida en la integridad de la membrana, daño celular y en última instancia una respuesta inflamatoria típica de la esteatohepatitis [234]. En otros estudios se ha demostrado que los pacientes con esteatohepatitis no alcohólica (conocida como NASH por sus siglas en inglés, *nonalcoholic steatohepatitis*) presentan relaciones molares de PC/PE más bajas que los controles sanos. Es notable la relevancia clínica que posee un correcto balance del metabolismo de GFLs en lo que respecta a patologías hepáticas. Resulta importante remarcar el control circadiano sobre diversos aspectos del metabolismo lipídico y su importancia en el mantenimiento de la homeostasis (incluyendo el metabolismo de GFLs), ya que alteraciones en el reloj biológico se vinculan con patologías metabólicas tales como hipertensión, obesidad, diabetes e hígado graso, entre otras, tal como se mencionó previamente.

En nuestro estudio, al generar una disrupción en el reloj molecular (modelo B-D), se observó un marcado cambio metabólico que afectó significativamente el estado general de las células. En términos generales este desbalance transcurrió con una disminución sustancial en procesos vinculados al metabolismo lipídico y redox, acompañado de un cambio o *switch* energético.

Particularmente pudimos registrar una disminución significativa en los niveles endógenos de triglicéridos (Fig. 10A) al igual que en la consecuente acumulación de gotas lipídicas (Fig. 15) en dichas células que presentaban la disrupción del reloj (B-D, líneas grises) en comparación a las células control (B-WT, líneas negras). Estos efectos fueron acompañados de un desbalance en la biosíntesis *de novo* de lípidos, al observar también una disminución en los niveles de expresión de la enzima PAP1 (Fig. 12), clave en la síntesis de TG, al igual que en las enzimas CHOK α y CCT β (Fig. 13) implicadas en la síntesis de PC. Considerando que la PC es un fosfolípido regulado por el reloj a través de la vía *BMAL1/REV-ERB α /CHOK α* [91][92], su disponibilidad puede ser un factor regulatorio esencial para el tamaño y número de GLs. Ciertos estudios han reportado que la relación PC/PE, como indicador de la integridad de membrana, es capaz de modular la función mitocondrial al igual que el tamaño y metabolismo de GLs como fuentes energéticas [235]. En nuestro estudio observamos una disminución generalizada del metabolismo lipídico, y en este sentido cabe destacar que detectamos un incremento en los niveles relativos de los transcritos de *LIPIN1* y *REV-ERB α* (Fig. 12A y Fig. 9, respectivamente), en contraposición a la disminución registrada a niveles de proteína (Fig. 12B y 7C, respectivamente). Podemos especular que existiría un mecanismo compensatorio que sin éxito intenta solventar el desbalance metabólico causado por la disrupción de *BMAL1* (modelo B-D) incrementando la expresión de estos transcritos. Se requiere un análisis más exhaustivo para determinar la causa de esta contraposición entre los niveles de transcritos respecto a las proteínas. Algunos de los procesos que podrían estar diferencialmente afectados en este punto son las modificaciones post-transcripcionales vinculadas a la estabilidad de los transcritos, la degradación y/o translocación de estos, el complejo de traducción, entre otros. Sin embargo, más allá de estas diferencias, la disminución significativa registrada en las proteínas de REV-ERB y PAP1 fundamenta el declive observado en términos generales en la biosíntesis de PC y en los niveles de TGs.

El desbalance metabólico presente en nuestro modelo de disrupción del reloj (B-D) se refuerza con un aparente *switch* energético, registrando elevados niveles de lactato en comparación a las células control (Fig. 10B). Si bien el lactato es producido en la mayoría de los tejidos del cuerpo humano, en condiciones normales es rápidamente captado por el hígado. En condiciones patológicas, un aumento en los niveles de lactato puede ser desencadenado por un incremento en la producción, en la disminución en su captación o una combinación de ambos [236]. Esto puede deberse principalmente a un estado hipermetabólico, a una disfunción macro y/o microcirculatoria (hipoperfusión: reducción en el flujo sanguíneo), a una disfunción mitocondrial (incluyendo la pérdida de cofactores claves), entre otros factores. La disfunción

hepática contribuye tanto al incremento en la producción como a la disminución de la captación del lactato, lo que podría explicar la acumulación observada en las células B-D [236].

En células cancerígenas se describió el cambio metabólico caracterizado por un incremento en los niveles de lactato como efecto *Warburg*. En esta condición, la principal fuente metabólica de energía proviene del citosol, donde se lleva a cabo una glicólisis anaeróbica que consta de una exacerbada tasa glucolítica (200 veces mayor respecto a las células normales) seguida de una fermentación láctica, generando lactato como producto final. Este proceso de glicólisis fermentativa se lleva a cabo incluso en condiciones aeróbicas. En cambio, en células normales la energía proviene principalmente de las mitocondrias por medio de la fosforilación oxidativa (oxidación aeróbica del piruvato). Se hipotetiza que el efecto *Warburg* provee a las células tumorales la capacidad de captar y metabolizar nutrientes de manera tal que se promueva la proliferación en lugar de una producción eficiente de energía en forma de ATP [237]. Además, la acidosis láctica ocurre cuando existe un exceso de ácido láctico en el organismo como consecuencia de varios procesos patológicos que incluyen el cáncer, convulsiones, falla hepática, falta de oxígeno prolongada y bajos niveles de azúcar en sangre. En este sentido, las células tumorales HepG2 aparentemente habrían cambiado la dirección de su metabolismo energético como resultado de la disrupción de *BMAL1* (modelo B-D) hacia la glicólisis en lugar de la generación de ATP por medio de la respiración mitocondrial. Esto se encuentra avalado no sólo por los altos niveles de lactato registrado en las células B-D en comparación al control (Fig. 10B), sino también por los bajos niveles de ROS observados luego de la disrupción de *BMAL1* (Fig. 11), los cuales son productos de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias. En otras palabras, las células B-D estarían re-direccionando su energía hacia el mantenimiento de la proliferación y división celular, en lugar de la producción eficiente de ATP. Cabe destacar que se podría profundizar el análisis del metabolismo energético por ejemplo determinando la tasa de respiración mitocondrial y glicólisis.

En nuestro estudio también observamos que ambos modelos respondieron de manera diferencial al tratamiento con el compuesto SR9009, un agonista del receptor nuclear REV-ERB con conocidos efectos en el metabolismo energético (aumento de la tasa metabólica y del consumo de oxígeno *in vivo*), lipídico (disminución en los niveles de TG y colesterol en plasma) y circadiano (retraso de fase en ratones)[118]. Las células B-D presentaron mayor resistencia a dosis altas de SR9009 en comparación a las células B-WT (Fig. 18A), acompañado de una menor acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS, Fig. 18B). Estos datos sugieren que el *switch* metabólico y energético descrito para las células B-D tendrían un efecto *buffer* ante el tratamiento, lo cual significaría una ventaja en la resistencia celular a este tipo de moduladores

metabólicos. Además, el tratamiento con SR9009 a altas concentraciones generó modificaciones en las gotas lipídicas, observando un incremento significativo en el tamaño promedio y área porcentual de las mismas (Fig. 19). Estos resultados sugieren un abordaje factible e interesante de aspectos metabólicos a través del uso de fármacos derivados de componentes del reloj circadiano, y pone de manifiesto la intrincada interconexión entre ambos sistemas.

Conclusiones

En células HepG2 (modelo B-WT) observamos:

- ✓ Ritmos en genes reloj y genes controlados por el reloj, aun manteniendo las células en condiciones proliferativas. Estas expresiones rítmicas fueron observadas tanto a nivel de proteína (BMAL1 y PER1) como de ARNm (*BMAL1*, *PER1* y *REV-ERB α*) (Fig. 1 y 2, Tabla 5).
- ✓ Variaciones estadísticamente significativas en la relación PC/PE evaluada a diferentes tiempos post-sincronización (Fig. 4).
- ✓ Ritmos en enzimas de la biosíntesis de glicerofosfolípidos, particularmente en los transcriptos de *CHOK α* y *PCYT2* (Fig. 5, Tabla 5).

Con estos resultados podemos concluir que las células tumorales HepG2 poseen un reloj intrínseco activo, aún en condiciones proliferativas que comandan patrones rítmicos no solo en genes reloj sino también en el metabolismo lipídico.

Luego de la disrupción de BMAL1 (modelo B-D) observamos:

- ✓ Una leve disminución, aunque no significativa, en los niveles de proteína de *BMAL1* (Fig. 7 y 8).
- ✓ Una disminución significativa en los genes controlados por *BMAL1*, particularmente en lo que respecta a *PER2* y *REV-ERB α* a nivel de proteína (Fig. 7).
- ✓ Una perturbación en el patrón oscilatorio del transcripto de *REV-ERB α* , tanto en su amplitud como en su fase (Tabla 6A, Fig. 10).
- ✓ Una marcada disminución en el contenido de triglicéridos en todos los tiempos evaluados post-sincronización (Fig. 10, Tabla 6B).
- ✓ Un incremento en los niveles de lactato en todos los tiempos evaluados post-sincronización (Fig. 10, Tabla 6B).

- ✓ Una disminución en las especies reactivas del oxígeno a las 18 horas post-sincronización (Fig. 11).
- ✓ Una perturbación en el patrón oscilatorio del transcripto de *LIPIN1*, tanto en la amplitud como en la fase (Fig. 12A, Tabla 5).
- ✓ Una disminución en los niveles de enzimas involucradas en la biosíntesis de acilglicéridos: PAP1 y DGAT2 (Fig. 12B y C, respectivamente).
- ✓ Una disminución en los niveles de enzimas involucradas en la biosíntesis de glicerofosfolípidos: CHOK α a nivel de proteína (Fig. 13B, Tabla 6A) y ARNm (Fig. 13A, Tabla 6A), y CCT β a nivel de proteína (Fig. 13D).
- ✓ Un cambio de fase en el perfil oscilatorio del transcripto de *PEMT* (Fig. 14, Tabla 6A).
- ✓ Variaciones temporales en el número, tamaño y área porcentual de gotas lipídicas acompañado de una marcada reducción en estos últimos dos parámetros (Fig. 15, Tabla 6B).
- ✓ Cambios en el contenido endógeno de algunos glicerolípidos: disminución de PI, Liso-PC y Liso-PG e incremento de DG, MG y Liso-PE mostraron un incremento (Fig. 16).
- ✓ Cambios en la composición de ácidos grasos de algunos glicerolípidos (Fig. 17).
- ✓ Una respuesta diferencial ante el tratamiento con el agonista de *REV-ERBs* SR9009: mayor resistencia celular, menor acumulación de ROS y de gotas lipídicas respecto al control B-WT (Fig. 18 y 19).

Como conclusión general, nuestras observaciones demuestran que las células HepG2 cultivadas en condiciones de proliferación mantienen un reloj funcional que controla temporalmente el metabolismo. Las modificaciones observadas en el metabolismo lipídico luego de la disrupción de *BMAL1*, un componente clave del reloj molecular (células B-D), no sólo resaltan el vínculo existente entre el sistema circadiano y el metabolismo lipídico, sino que también revelan una susceptibilidad metabólica de las células HepG2 a la perturbación circadiana, lo cual puede ser aprovechado en esquemas de cronoterapia para mejorar la eficacia terapéutica. Aunque estudios futuros son necesarios para comprender en profundidad el desbalance metabólico generado en las células B-D, en base a los resultados de este trabajo de tesis podemos hipotetizar que existe un *switch* metabólico en este modelo en pos de favorecer la supervivencia celular. Particularmente en lo que respecta al aumento de lactato y a la disminución de ROS en las células B-D (efecto *Warburg*), se presentaría un contexto favorable para mantener la división celular activa. Además, a pesar que se registró un declive significativo en la biosíntesis *de novo*

tanto de PC (vía de *Kennedy*, Fig. 13) como de TG (Fig. 12), y que no se vio afectada la cantidad relativa de PC en el modelo de disrupción respecto al control a un tiempo particular (Fig. 15), se puede especular que las células B-D podrían activar mecanismos de autofagia que les permitan mantener el flujo de metabolitos necesarios para la proliferación, aún en condiciones donde existe un deterioro en la biosíntesis de GFLs. Además pudimos observar que las modificaciones en el metabolismo lipídico en el modelo de disrupción de *BMAL1* se produjeron incluso a nivel de la composición de ácidos grasos de diversos fosfolípidos, lo cual determinaría propiedades fisicoquímicas de membranas modificadas y en una última instancia podría estar vinculado a funciones celulares alteradas, como por ejemplo la actividad mitocondrial. De todos los cambios registrados la disminución de PC (34:2) fue la más relevante, ya que estudios previos consideran a esta molécula como un marcador de obesidad [230].

En general, a partir de nuestras observaciones y sumado a evidencias previas, resulta claro que la síntesis de GFLs y una correcta regulación circadiana son esenciales para la supervivencia de las células tumorales y en particular para la proliferación y el crecimiento de las células HepG2. Cabe destacar que alteraciones en el reloj biológico que transcurren con cambios en los niveles y/o proporción de GFLs y TGs desencadenan trastornos metabólicos como hígado graso, obesidad y resistencia a la insulina; y tienen implicancias celulares importantes tal como se demuestra en nuestro modelo de células B-D luego de la disrupción de *BMAL1*. Esta alteración circadiana es capaz de perturbar gravemente el metabolismo de las células tumorales HepG2 (modelo B-D), lo que las convierte en un novedoso blanco terapéutico para la cronoterapia y un interesante modelo para estudios metabólicos adicionales.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. J. L. and P. J. D. . Dunlap, J. C., *Chronobiology : biological timekeeping. Sunderland, Mass., Sinauer Associates.* 2004.
- [2] C. A. Czeisler and J. J. Gooley, "Sleep and circadian rhythms in humans," *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, vol. 72, pp. 579–597, 2007, doi: 10.1101/SQB.2007.72.064.
- [3] A. Zarrinpar, A. Chaix, and S. Panda, "Daily Eating Patterns and Their Impact on Health and Disease," *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 27, no. 2, pp. 69–83, Feb. 2016, doi: 10.1016/J.TEM.2015.11.007.
- [4] U. Albrecht, "Orchestration of gene expression and physiology by the circadian clock," *J. Physiol. Paris*, vol. 100, no. 5–6, pp. 243–251, Nov. 2006, doi: 10.1016/J.JPHYSPARIS.2007.05.004.
- [5] J. J. Gooley, "Circadian regulation of lipid metabolism," *Proc. Nutr. Soc.*, vol. 75, no. 4, pp. 440–450, Nov. 2016, doi: 10.1017/S0029665116000288.
- [6] D. A. Golombek and R. E. Rosenstein, "Physiology of circadian entrainment," *Physiol. Rev.*, vol. 90, no. 3, pp. 1063–1102, Jul. 2010, doi: 10.1152/PHYSREV.00009.2009.
- [7] M. E. Guido, D. Goguen, L. De Guido, H. A. Robertson, and B. Rusak, "Circadian and photic regulation of immediate-early gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus," *Neuroscience*, vol. 90, no. 2, pp. 555–571, Feb. 1999, doi: 10.1016/S0306-4522(98)00467-9.
- [8] C. Dibner, U. Schibler, and U. Albrecht, "The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks," *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 72, pp. 517–549, Mar. 2010, doi: 10.1146/ANNUREV-PHYSIOL-021909-135821.
- [9] M. K. Bunger *et al.*, "Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals," *Cell*, vol. 103, no. 7, pp. 1009–1017, Dec. 2000, doi: 10.1016/S0092-8674(00)00205-1.
- [10] N. Gekakis *et al.*, "Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism," *Science*, vol. 280, no. 5369, pp. 1564–1569, Jun. 1998, doi: 10.1126/SCIENCE.280.5369.1564.
- [11] M. Reick, J. A. Garcia, C. Dudley, and S. L. McKnight, "NPAS2: an analog of clock operative

- in the mammalian forebrain," *Science*, vol. 293, no. 5529, pp. 506–509, Jul. 2001, doi: 10.1126/SCIENCE.1060699.
- [12] E. A. Griffin, D. Staknis, and C. J. Weitz, "Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock," *Science*, vol. 286, no. 5440, pp. 768–771, Oct. 1999, doi: 10.1126/SCIENCE.286.5440.768.
- [13] K. Kume *et al.*, "mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop," *Cell*, vol. 98, no. 2, pp. 193–205, Jul. 1999, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81014-4.
- [14] C. Lee, J. P. Etchegaray, F. R. A. Cagampang, A. S. I. Loudon, and S. M. Reppert, "Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock," *Cell*, vol. 107, no. 7, pp. 855–867, Dec. 2001, doi: 10.1016/S0092-8674(01)00610-9.
- [15] T. K. Sato *et al.*, "Feedback repression is required for mammalian circadian clock function," *Nat. Genet.*, vol. 38, no. 3, pp. 312–319, Mar. 2006, doi: 10.1038/NG1745.
- [16] R. Saini, M. Jaskolski, and S. J. Davis, "Circadian oscillator proteins across the kingdoms of life: structural aspects," *BMC Biol.* 2019 171, vol. 17, no. 1, pp. 1–39, Feb. 2019, doi: 10.1186/S12915-018-0623-3.
- [17] E. J. Eide *et al.*, "Control of mammalian circadian rhythm by CKepsilon-regulated proteasome-mediated PER2 degradation," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 25, no. 7, pp. 2795–2807, Apr. 2005, doi: 10.1128/MCB.25.7.2795-2807.2005.
- [18] S. I. H. Godinho *et al.*, "The after-hours mutant reveals a role for Fbxl3 in determining mammalian circadian period," *Science*, vol. 316, no. 5826, pp. 897–900, May 2007, doi: 10.1126/SCIENCE.1141138.
- [19] T. Shirogane, J. Jin, X. L. Ang, and J. W. Harper, "SCFbeta-TRCP controls clock-dependent transcription via casein kinase 1-dependent degradation of the mammalian period-1 (Per1) protein," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 29, pp. 26863–26872, Jul. 2005, doi: 10.1074/JBC.M502862200.
- [20] S. M. Siepka *et al.*, "Circadian mutant Overtime reveals F-box protein FBXL3 regulation of cryptochrome and period gene expression," *Cell*, vol. 129, no. 5, pp. 1011–1023, Jun. 2007, doi: 10.1016/J.CELL.2007.04.030.
- [21] S. H. Yoo *et al.*, "Competing E3 ubiquitin ligases govern circadian periodicity by degradation of CRY in nucleus and cytoplasm," *Cell*, vol. 152, no. 5, pp. 1091–1105, Feb. 2013, doi: 10.1016/J.CELL.2013.01.055.

- [22] C. Crumbley, Y. Wang, D. J. Kojetin, and T. P. Burris, "Characterization of the core mammalian clock component, NPAS2, as a REV-ERB α /ROR α target gene," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 46, pp. 35386–35392, Nov. 2010, doi: 10.1074/JBC.M110.129288.
- [23] N. Preitner *et al.*, "The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator," *Cell*, vol. 110, no. 2, pp. 251–260, Jul. 2002, doi: 10.1016/S0092-8674(02)00825-5.
- [24] Y. Adamovich, R. Aviram, and G. Asher, "The emerging roles of lipids in circadian control," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1851, no. 8, pp. 1017–1025, Aug. 2015, doi: 10.1016/j.bbaliip.2014.11.013.
- [25] X. Yang *et al.*, "Nuclear receptor expression links the circadian clock to metabolism," *Cell*, vol. 126, no. 4, pp. 801–810, Aug. 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.06.050.
- [26] C. Crumbley and T. P. Burris, "Direct regulation of CLOCK expression by REV-ERB," *PLoS One*, vol. 6, no. 3, 2011, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0017290.
- [27] S. Panda *et al.*, "Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock," *Cell*, vol. 109, no. 3, pp. 307–320, May 2002, doi: 10.1016/S0092-8674(02)00722-5.
- [28] M. E. Guido, N. M. Monjes, P. M. Wagner, and G. A. Salvador, "Circadian Regulation and Clock-Controlled Mechanisms of Glycerophospholipid Metabolism from Neuronal Cells and Tissues to Fibroblasts," *Mol. Neurobiol.*, vol. 59, no. 1, pp. 326–353, Jan. 2022, doi: 10.1007/s12035-021-02595-4.
- [29] T. Bollinger and U. Schibler, "Circadian rhythms - from genes to physiology and disease," *Swiss Med. Wkly.*, vol. 144, Jul. 2014, doi: 10.4414/SMW.2014.13984.
- [30] A. Stangherlin, E. Seinkmane, and J. S. O'Neill, "Understanding circadian regulation of mammalian cell function, protein homeostasis, and metabolism," *Curr. Opin. Syst. Biol.*, vol. 28, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.coisb.2021.100391.
- [31] R. S. Edgar *et al.*, "Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms," *Nature*, vol. 485, no. 7399, pp. 459–464, May 2012, doi: 10.1038/NATURE11088.
- [32] J. S. O'Neill and A. B. Reddy, "Circadian clocks in human red blood cells," *Nature*, vol. 469, no. 7331, pp. 498–504, Jan. 2011, doi: 10.1038/NATURE09702.
- [33] S. Ray and A. B. Reddy, "Cross-talk between circadian clocks, sleep-wake cycles, and metabolic networks: Dispelling the darkness," *Bioessays*, vol. 38, no. 4, pp. 394–405, Apr.

- 2016, doi: 10.1002/BIES.201500056.
- [34] I. Robinson and A. B. Reddy, "Molecular mechanisms of the circadian clockwork in mammals," *FEBS Lett.*, vol. 588, no. 15, pp. 2477–2483, Aug. 2014, doi: 10.1016/J.FEBSLET.2014.06.005.
- [35] J. S. O'Neill *et al.*, "Circadian rhythms persist without transcription in a eukaryote," *Nature*, vol. 469, no. 7331, pp. 554–558, Jan. 2011, doi: 10.1038/NATURE09654.
- [36] P. M. Wagner *et al.*, "Proliferative Glioblastoma Cancer Cells Exhibit Persisting Temporal Control of Metabolism and Display Differential Temporal Drug Susceptibility in Chemotherapy," *Mol. Neurobiol.*, vol. 56, no. 2, pp. 1276–1292, Feb. 2019, doi: 10.1007/S12035-018-1152-3.
- [37] W. Ying, "NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 10, no. 2, pp. 179–206, Feb. 2008, doi: 10.1089/ARS.2007.1672.
- [38] G. Rey *et al.*, "The Pentose Phosphate Pathway Regulates the Circadian Clock," *Cell Metab.*, vol. 24, no. 3, pp. 462–473, Sep. 2016, doi: 10.1016/J.CMET.2016.07.024.
- [39] E. Maury, K. M. Ramsey, and J. Bass, "Circadian rhythms and metabolic syndrome: from experimental genetics to human disease," *Circ. Res.*, vol. 106, no. 3, pp. 447–462, Feb. 2010, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.208355.
- [40] K. M. Ramsey *et al.*, "Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD⁺ biosynthesis," *Science*, vol. 324, no. 5927, pp. 651–654, May 2009, doi: 10.1126/SCIENCE.1171641.
- [41] Y. Nakahata, S. Sahar, G. Astarita, M. Kaluzova, and P. Sassone-Corsi, "Circadian control of the NAD⁺ salvage pathway by CLOCK-SIRT1," *Science*, vol. 324, no. 5927, pp. 654–657, May 2009, doi: 10.1126/SCIENCE.1170803.
- [42] G. Ramadori *et al.*, "SIRT1 deacetylase in POMC neurons is required for homeostatic defenses against diet-induced obesity," *Cell Metab.*, vol. 12, no. 1, pp. 78–87, Jul. 2010, doi: 10.1016/J.CMET.2010.05.010.
- [43] J. Rutter, M. Reick, L. C. Wu, and S. L. McKnight, "Regulation of clock and NPAS2 DNA binding by the redox state of NAD cofactors," *Science*, vol. 293, no. 5529, pp. 510–514, Jul. 2001, doi: 10.1126/SCIENCE.1060698.
- [44] G. Asher *et al.*, "SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2

- deacetylation," *Cell*, vol. 134, no. 2, pp. 317–328, Jul. 2008, doi: 10.1016/J.CELL.2008.06.050.
- [45] Y. Nakahata *et al.*, "The NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control," *Cell*, vol. 134, no. 2, pp. 329–340, Jul. 2008, doi: 10.1016/J.CELL.2008.07.002.
- [46] M. M. Bellet, S. Masri, G. Astarita, P. Sassone-Corsi, M. A. Della Della Fazia, and G. Servillo, "Histone Deacetylase SIRT1 Controls Proliferation, Circadian Rhythm, and Lipid Metabolism during Liver Regeneration in Mice," *J. Biol. Chem.*, vol. 291, no. 44, pp. 23318–23329, Oct. 2016, doi: 10.1074/JBC.M116.737114.
- [47] M. Roth and W. Y. Chen, "Sorting out functions of sirtuins in cancer," *Oncogene*, vol. 33, no. 13, pp. 1609–1620, Mar. 2014, doi: 10.1038/ONC.2013.120.
- [48] S. Masri *et al.*, "Partitioning circadian transcription by SIRT6 leads to segregated control of cellular metabolism," *Cell*, vol. 158, no. 3, pp. 659–672, Jul. 2014, doi: 10.1016/J.CELL.2014.06.050.
- [49] C. B. Peek *et al.*, "Circadian clock NAD⁺ cycle drives mitochondrial oxidative metabolism in mice," *Science*, vol. 342, no. 6158, 2013, doi: 10.1126/SCIENCE.1243417.
- [50] G. Asher, H. Reinke, M. Altmeyer, M. Gutierrez-Arcelus, M. O. Hottiger, and U. Schibler, "Poly(ADP-ribose) polymerase 1 participates in the phase entrainment of circadian clocks to feeding," *Cell*, vol. 142, no. 6, pp. 943–953, 2010, doi: 10.1016/J.CELL.2010.08.016.
- [51] S. D. Jordan and K. A. Lamia, "AMPK at the crossroads of circadian clocks and metabolism," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 366, no. 2, pp. 163–169, Feb. 2013, doi: 10.1016/J.MCE.2012.06.017.
- [52] J. H. Um *et al.*, "AMPK regulates circadian rhythms in a tissue- and isoform-specific manner," *PLoS One*, vol. 6, no. 3, 2011, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0018450.
- [53] K. A. Lamia *et al.*, "AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation," *Science*, vol. 326, no. 5951, pp. 437–440, Oct. 2009, doi: 10.1126/SCIENCE.1172156.
- [54] H. U. Jee *et al.*, "Activation of 5'-AMP-activated kinase with diabetes drug metformin induces casein kinase Iε-dependent degradation of clock protein mPer2," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 29, pp. 20794–20798, Jul. 2007, doi: 10.1074/JBC.C700070200.

- [55] N. P. Hoyle and J. S. O'Neill, "Oxidation-reduction cycles of peroxiredoxin proteins and nontranscriptional aspects of timekeeping," *Biochemistry*, vol. 54, no. 2, pp. 184–193, Jan. 2015, doi: 10.1021/BI5008386.
- [56] A. B. Reddy and G. Rey, "Metabolic and nontranscriptional circadian clocks: eukaryotes," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 83, pp. 165–189, 2014, doi: 10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-060713-035623.
- [57] Y. Wu *et al.*, "Reciprocal Regulation between the Circadian Clock and Hypoxia Signaling at the Genome Level in Mammals," *Cell Metab.*, vol. 25, no. 1, pp. 73–85, Jan. 2017, doi: 10.1016/J.CMET.2016.09.009.
- [58] C. B. Peek *et al.*, "Circadian Clock Interaction with HIF1 α Mediates Oxygenic Metabolism and Anaerobic Glycolysis in Skeletal Muscle," *Cell Metab.*, vol. 25, no. 1, pp. 86–92, Jan. 2017, doi: 10.1016/J.CMET.2016.09.010.
- [59] Y. Adamovich *et al.*, "Oxygen and Carbon Dioxide Rhythms Are Circadian Clock Controlled and Differentially Directed by Behavioral Signals," *Cell Metab.*, vol. 29, no. 5, pp. 1092–1103.e3, May 2019, doi: 10.1016/J.CMET.2019.01.007.
- [60] Y. Adamovich, B. Ladeuix, M. Golik, M. P. Koeners, and G. Asher, "Rhythmic Oxygen Levels Reset Circadian Clocks through HIF1 α ," *Cell Metab.*, vol. 25, no. 1, pp. 93–101, Jan. 2017, doi: 10.1016/J.CMET.2016.09.014.
- [61] J. M. Philpott *et al.*, "Casein kinase 1 dynamics underlie substrate selectivity and the PER2 circadian phosphoswitch," *Elife*, vol. 9, Feb. 2020, doi: 10.7554/ELIFE.52343.
- [62] Q. J. Meng *et al.*, "Setting clock speed in mammals: the CK1 epsilon tau mutation in mice accelerates circadian pacemakers by selectively destabilizing PERIOD proteins," *Neuron*, vol. 58, no. 1, pp. 78–88, Apr. 2008, doi: 10.1016/J.NEURON.2008.01.019.
- [63] H. C. Causton, K. A. Feeney, C. A. Ziegler, and J. S. O'Neill, "Metabolic Cycles in Yeast Share Features Conserved among Circadian Rhythms," *Curr. Biol.*, vol. 25, no. 8, pp. 1056–1062, Apr. 2015, doi: 10.1016/J.CUB.2015.02.035.
- [64] M. Putker *et al.*, "CRYPTOCHROMES confer robustness, not rhythmicity, to circadian timekeeping," *EMBO J.*, vol. 40, no. 7, Apr. 2021, doi: 10.15252/EMBJ.2020106745.
- [65] T. Hirota, W. G. Lewis, A. C. Liu, W. L. Jae, P. G. Schultz, and S. A. Kay, "A chemical biology approach reveals period shortening of the mammalian circadian clock by specific inhibition of GSK-3 β ," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 52, pp. 20746–20751, Dec. 2008, doi: 10.1073/PNAS.0811410106.

- [66] A. D. Beale *et al.*, "Casein Kinase 1 Underlies Temperature Compensation of Circadian Rhythms in Human Red Blood Cells," *J. Biol. Rhythms*, vol. 34, no. 2, pp. 144–153, Apr. 2019, doi: 10.1177/0748730419836370.
- [67] A. Kohsaka *et al.*, "High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice," *Cell Metab.*, vol. 6, no. 5, pp. 414–421, Nov. 2007, doi: 10.1016/J.CMET.2007.09.006.
- [68] I. Schmutz, J. A. Ripperger, S. Baeriswyl-Aebischer, and U. Albrecht, "The mammalian clock component PERIOD2 coordinates circadian output by interaction with nuclear receptors," *Genes Dev.*, vol. 24, no. 4, pp. 345–357, Feb. 2010, doi: 10.1101/GAD.564110.
- [69] T. K. Sato *et al.*, "A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock," *Neuron*, vol. 43, no. 4, pp. 527–537, Aug. 2004, doi: 10.1016/J.NEURON.2004.07.018.
- [70] S. Zvonic *et al.*, "Characterization of peripheral circadian clocks in adipose tissues," *Diabetes*, vol. 55, no. 4, pp. 962–970, 2006, doi: 10.2337/DIABETES.55.04.06.DB05-0873.
- [71] I. P. Torra *et al.*, "Circadian and glucocorticoid regulation of Rev-erba expression in liver," *Endocrinology*, vol. 141, no. 10, pp. 3799–3806, 2000, doi: 10.1210/endo.141.10.7708.
- [72] E. Raspé *et al.*, "Identification of Rev-erbalph as a physiological repressor of apoC-III gene transcription," *J. Lipid Res.*, vol. 43, no. 12, pp. 2172–2179, Dec. 2002, doi: 10.1194/JLR.M200386-JLR200.
- [73] E. Raspé *et al.*, "Transcriptional Regulation of Apolipoprotein C-III Gene Expression by the Orphan Nuclear Receptor RORa," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 4, pp. 2865–2871, Jan. 2001, doi: 10.1074/jbc.M004982200.
- [74] N. Vu-Dac *et al.*, "The nuclear receptors peroxisome proliferator-activated receptor alpha and Rev-erbalph mediate the species-specific regulation of apolipoprotein A-I expression by fibrates," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 40, pp. 25713–25720, Oct. 1998, doi: 10.1074/JBC.273.40.25713.
- [75] S. N. Ramakrishnan, P. Lau, L. J. Burke, and G. E. O. Muscat, "Rev-erbbeta regulates the expression of genes involved in lipid absorption in skeletal muscle cells: evidence for cross-talk between orphan nuclear receptors and myokines," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 10, pp. 8651–8659, Mar. 2005, doi: 10.1074/JBC.M413949200.
- [76] L. Yin *et al.*, "Rev-erba, a heme sensor that coordinates metabolic and circadian pathways," *Science (80-.)*, vol. 318, no. 5857, pp. 1786–1789, Dec. 2007, doi:

- 10.1126/science.1150179.
- [77] J. Delezie *et al.*, “The nuclear receptor REV-ERB α is required for the daily balance of carbohydrate and lipid metabolism,” *FASEB J.*, vol. 26, no. 8, pp. 3321–3335, Aug. 2012, doi: 10.1096/FJ.12-208751.
- [78] P. Lau, R. L. Fitzsimmons, M. A. Pearen, M. J. Watt, and G. E. O. Muscat, “Homozygous staggerer (sg/sg) mice display improved insulin sensitivity and enhanced glucose uptake in skeletal muscle,” *Diabetologia*, vol. 54, no. 5, pp. 1169–1180, May 2011, doi: 10.1007/S00125-011-2046-3.
- [79] C. Fontaine *et al.*, “The orphan nuclear receptor Rev-Erb α is a peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma target gene and promotes PPARgamma-induced adipocyte differentiation,” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 39, pp. 37672–37680, Sep. 2003, doi: 10.1074/JBC.M304664200.
- [80] J. Wang and M. A. Lazar, “Bifunctional role of Rev-erbalph in adipocyte differentiation,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 28, no. 7, pp. 2213–2220, Apr. 2008, doi: 10.1128/MCB.01608-07.
- [81] A. Chawlas and M. A. Lazar, “THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Induction of Rev-ErbA α , an Orphan Receptor Encoded on the Opposite Strand of the α -Thyroid Hormone Receptor Gene, during Adipocyte Differentiation*,” vol. 268, no. 22, pp. 16265–16269, 1993, doi: 10.1016/S0021-9258(19)85415-7.
- [82] D. Feng *et al.*, “A circadian rhythm orchestrated by histone deacetylase 3 controls hepatic lipid metabolism,” *Science*, vol. 331, no. 6022, pp. 1315–1319, Mar. 2011, doi: 10.1126/SCIENCE.1198125.
- [83] E. Woldt *et al.*, “Rev-erb- α modulates skeletal muscle oxidative capacity by regulating mitochondrial biogenesis and autophagy,” *Nat. Med.*, vol. 19, no. 8, pp. 1039–1046, Aug. 2013, doi: 10.1038/NM.3213.
- [84] H. Cho *et al.*, “Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB- α and REV-ERB- β ,” *Nature*, vol. 485, no. 7396, pp. 123–127, May 2012, doi: 10.1038/NATURE11048.
- [85] C. Scheiermann, Y. Kunisaki, and P. S. Frenette, “Circadian control of the immune system,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 13, no. 3, pp. 190–198, Mar. 2013, doi: 10.1038/nri3386.
- [86] E. Vieira *et al.*, “The clock gene Rev-erb α regulates pancreatic β -cell function: modulation by leptin and high-fat diet,” *Endocrinology*, vol. 153, no. 2, pp. 592–601, Feb. 2012, doi: 10.1210/EN.2011-1595.

- [87] G. Sulli *et al.*, “Pharmacological activation of REV-ERBs is lethal in cancer and oncogene-induced senescence,” *Nature*, vol. 553, no. 7688, pp. 351–355, Jan. 2018, doi: 10.1038/NATURE25170.
- [88] K. Bensaad *et al.*, “Fatty acid uptake and lipid storage induced by HIF-1 α contribute to cell growth and survival after hypoxia-reoxygenation,” *Cell Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 349–365, Oct. 2014, doi: 10.1016/J.CELREP.2014.08.056.
- [89] Y. Guo *et al.*, “Functional genomic screen reveals genes involved in lipid-droplet formation and utilization,” *Nature*, vol. 453, no. 7195, pp. 657–661, May 2008, doi: 10.1038/NATURE06928.
- [90] W. Fei *et al.*, “A role for phosphatidic acid in the formation of ‘supersized’ lipid droplets,” *PLoS Genet.*, vol. 7, no. 7, Jul. 2011, doi: 10.1371/JOURNAL.PGEN.1002201.
- [91] L. D. Gorné, V. A. Acosta-Rodríguez, S. J. Pasquaré, G. A. Salvador, N. M. Giusto, and M. E. Guido, “The mouse liver displays daily rhythms in the metabolism of phospholipids and in the activity of lipid synthesizing enzymes,” *Chronobiol. Int.*, vol. 32, no. 1, pp. 11–26, Feb. 2015, doi: 10.3109/07420528.2014.949734.
- [92] A. Gréchez-Cassiau, C. Feillet, S. Guérin, and F. Delaunay, “The hepatic circadian clock regulates the choline kinase α gene through the BMAL1-REV-ERB α axis,” *Chronobiol. Int.*, vol. 32, no. 6, pp. 774–784, Jul. 2015, doi: 10.3109/07420528.2015.1046601.
- [93] P. M. Wagner, N. M. Monjes, and M. E. Guido, “Chemotherapeutic Effect of SR9009, a REV-ERB Agonist, on the Human Glioblastoma T98G Cells,” *ASN Neuro*, vol. 11, 2019, doi: 10.1177/1759091419892713.
- [94] S. Raghuram *et al.*, “Identification of Heme as the Ligand for the Orphan Nuclear Receptors REV-ERB α and REV-ERB β .”
- [95] P. Lau, R. L. Fitzsimmons, S. Raichur, S. C. M. Wang, A. Lechtken, and G. E. O. Muscat, “The orphan nuclear receptor, ROR α , regulates gene expression that controls lipid metabolism: staggerer (SG/SG) mice are resistant to diet-induced obesity,” *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 26, pp. 18411–18421, Jun. 2008, doi: 10.1074/JBC.M710526200.
- [96] Y. Takeda, H. S. Kang, M. Angers, and A. M. Jetten, “Retinoic acid-related orphan receptor γ directly regulates neuronal PAS domain protein 2 transcription in vivo,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 39, no. 11, pp. 4769–4782, Jun. 2011, doi: 10.1093/NAR/GKQ1335.
- [97] Y. Takeda, H. S. Kang, F. B. Lih, H. Jiang, W. S. Blaner, and A. M. Jetten, “Retinoid acid-related orphan receptor γ , ROR γ , participates in diurnal transcriptional regulation of lipid

- metabolic genes," *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. 16, pp. 10448–10459, Sep. 2014, doi: 10.1093/NAR/GKU766.
- [98] A. Mamontova *et al.*, "Severe atherosclerosis and hypoalphalipoproteinemia in the staggerer mouse, a mutant of the nuclear receptor RORalpha," *Circulation*, vol. 98, no. 24, pp. 2738–2743, Dec. 1998, doi: 10.1161/01.CIR.98.24.2738.
- [99] P. Lau, S. J. Nixon, R. G. Parton, and G. E. O. Muscat, "RORalpha regulates the expression of genes involved in lipid homeostasis in skeletal muscle cells: caveolin-3 and CPT-1 are direct targets of ROR," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 35, pp. 36828–36840, Aug. 2004, doi: 10.1074/JBC.M404927200.
- [100] Y. Takeda, R. Jothi, V. Birault, and A. M. Jetten, "RORγ directly regulates the circadian expression of clock genes and downstream targets in vivo," *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, no. 17, pp. 8519–8535, Sep. 2012, doi: 10.1093/NAR/GKS630.
- [101] H. Sugimoto, M. Bakovic, S. Yamashita, and D. E. Vance, "Identification of transcriptional enhancer factor-4 as a transcriptional modulator of CTP:phosphocholine cytidyltransferase alpha," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 15, pp. 12338–12344, Apr. 2001, doi: 10.1074/JBC.M100090200.
- [102] S. Alex *et al.*, "Short-chain fatty acids stimulate angiotensin-like 4 synthesis in human colon adenocarcinoma cells by activating peroxisome proliferator-activated receptor γ," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 33, no. 7, pp. 1303–1316, Apr. 2013, doi: 10.1128/MCB.00858-12.
- [103] G. Krey *et al.*, "Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay," *Mol. Endocrinol.*, vol. 11, no. 6, pp. 779–791, 1997, doi: 10.1210/MEND.11.6.0007.
- [104] M. V. Liberato *et al.*, "Medium chain fatty acids are selective peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) γ activators and pan-PPAR partial agonists," *PLoS One*, vol. 7, no. 5, May 2012, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0036297.
- [105] T. M. McIntyre *et al.*, "Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARγ agonist," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 1, pp. 131–136, Jan. 2003, doi: 10.1073/PNAS.0135855100.
- [106] J. N. Van Der Veen, S. Lingrell, R. P. Da Silva, R. L. Jacobs, and D. E. Vance, "The concentration of phosphatidylethanolamine in mitochondria can modulate ATP production and glucose metabolism in mice," *Diabetes*, vol. 63, no. 8, pp. 2620–2630, 2014, doi: 10.2337/DB13-0993.

- [107] S. Supale, N. Li, T. Brun, and P. Maechler, "Mitochondrial dysfunction in pancreatic β cells," *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 23, no. 9, pp. 477–487, Sep. 2012, doi: 10.1016/J.TEM.2012.06.002.
- [108] A. Johri and M. F. Beal, "Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 342, no. 3, pp. 619–630, Sep. 2012, doi: 10.1124/JPET.112.192138.
- [109] A. A. Noga, Y. Zhao, and D. E. Vance, "An unexpected requirement for phosphatidylethanolamine N-methyltransferase in the secretion of very low density lipoproteins," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 44, pp. 42358–42365, Nov. 2002, doi: 10.1074/JBC.M204542200.
- [110] B. N. Finck and D. P. Kelly, "PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease," *J. Clin. Invest.*, vol. 116, no. 3, pp. 615–622, Mar. 2006, doi: 10.1172/JCI27794.
- [111] J. L. Estall *et al.*, "Sensitivity of lipid metabolism and insulin signaling to genetic alterations in hepatic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha expression," *Diabetes*, vol. 58, no. 7, pp. 1499–1508, Jul. 2009, doi: 10.2337/DB08-1571.
- [112] M. D. Li, C. M. Li, and Z. Wang, "The Role of Circadian Clocks in Metabolic Disease," *Yale J. Biol. Med.*, vol. 85, no. 3, p. 387, 2012, Accessed: Feb. 22, 2022. [Online]. Available: [/pmc/articles/PMC3447202/](#)
- [113] D. E. Ayala, R. C. Hermida, L. Garciat, T. Iglesias, and C. Lodeiro, "Multiple component analysis of plasma growth hormone in children with standard and short stature," *Chronobiol. Int.*, vol. 7, no. 3, pp. 217–220, 1990, doi: 10.3109/07420529009056977.
- [114] B. BJERNER, A. HOLM, and A. SWENSSON, "Diurnal variation in mental performance; a study of three-shift workers," *Br. J. Ind. Med.*, vol. 12, no. 2, pp. 103–110, Apr. 1955, doi: 10.1136/OEM.12.2.103.
- [115] R. BROUGHTON and J. MULLINGTON, "Circasemidian sleep propensity and the phase-amplitude maintenance model of human sleep/wake regulation," *J. Sleep Res.*, vol. 1, no. 2, pp. 93–98, 1992, doi: 10.1111/J.1365-2869.1992.TB00017.X.
- [116] C. Vollmers, S. Gill, L. DiTacchio, S. R. Pulivarthy, H. D. Le, and S. Panda, "Time of feeding and the intrinsic circadian clock drive rhythms in hepatic gene expression," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 50, pp. 21453–21458, Dec. 2009, doi: 10.1073/PNAS.0909591106.

- [117] M. E. Hughes *et al.*, “Harmonics of circadian gene transcription in mammals,” *PLoS Genet.*, vol. 5, no. 4, Apr. 2009, doi: 10.1371/JOURNAL.PGEN.1000442.
- [118] L. A. Solt *et al.*, “Regulation of Circadian Behavior and Metabolism by Synthetic REV-ERB Agonists,” *Nature*, vol. 485, no. 7396, p. 62, May 2012, doi: 10.1038/NATURE11030.
- [119] W. A. Hoogerwerf *et al.*, “Transcriptional profiling of mRNA expression in the mouse distal colon,” *Gastroenterology*, vol. 135, no. 6, pp. 2019–2029, 2008, doi: 10.1053/J.GASTRO.2008.08.048.
- [120] R. Zhang, N. F. Lahens, H. I. Ballance, M. E. Hughes, and J. B. Hogenesch, “A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 45, pp. 16219–16224, Nov. 2014, doi: 10.1073/PNAS.1408886111.
- [121] T. Kimura, W. Jennings, and R. M. Epand, “Roles of specific lipid species in the cell and their molecular mechanism,” *Prog. Lipid Res.*, vol. 62, pp. 75–92, Apr. 2016, doi: 10.1016/J.PLIPRES.2016.02.001.
- [122] “PubChem.” <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed Feb. 15, 2022).
- [123] “LIPID MAPS.” <https://www.lipidmaps.org/> (accessed Feb. 15, 2022).
- [124] S. J. Singer and G. L. Nicolson, “The fluid mosaic model of the structure of cell membranes,” *Science*, vol. 175, no. 4023, pp. 720–731, 1972, doi: 10.1126/SCIENCE.175.4023.720.
- [125] W. K. Subczynski, M. Pasenkiewicz-Gierula, J. Widomska, L. Mainali, and M. Raguz, “High Cholesterol/Low Cholesterol: Effects in Biological Membranes: A Review,” *Cell Biochem. Biophys.*, vol. 75, no. 3–4, pp. 369–385, Dec. 2017, doi: 10.1007/S12013-017-0792-7.
- [126] W. K. Subczynski *et al.*, “Hydrophobic barriers of lipid bilayer membranes formed by reduction of water penetration by alkyl chain unsaturation and cholesterol,” *Biochemistry*, vol. 33, no. 24, pp. 7670–7681, Jun. 1994, doi: 10.1021/BI00190A022.
- [127] X. Yang, W. Sheng, G. Y. Sun, and J. C. M. Lee, “Effects of fatty acid unsaturation numbers on membrane fluidity and α -secretase-dependent amyloid precursor protein processing,” *Neurochem. Int.*, vol. 58, no. 3, pp. 321–329, Feb. 2011, doi: 10.1016/J.NEUINT.2010.12.004.
- [128] E. P. Kennedy and S. B. Weisst, “THE FUNCTION OF CYTIDINE COENZYMES IN THE BIOSYNTHESIS OF PHOSPHOLIPIDES*,” *J. Biol. Chem.*, vol. 222, pp. 193–214, 1956, doi: 10.1016/S0021-9258(19)50785-2.
- [129] W. E. M. Lands, “METABOLISM OF GLYCEROLIPIDES: A COMPARISON OF LECITHIN AND

- TRIGLYCERIDE SYNTHESIS*," 1958, doi: 10.1016/S0021-9258(18)70453-5.
- [130] B. Wang and P. Tontonoz, "Phospholipid Remodeling in Physiology and Disease," *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 81, p. 165, Feb. 2019, doi: 10.1146/ANNUREV-PHYSIOL-020518-114444.
- [131] Z. Li and D. E. Vance, "Phosphatidylcholine and choline homeostasis," *J. Lipid Res.*, vol. 49, no. 6, pp. 1187–1194, Jun. 2008, doi: 10.1194/JLR.R700019-JLR200.
- [132] D. Gallego-Ortega, T. Gómez del Pulgar, F. Valdés-Mora, A. Cebrián, and J. C. Lacal, "Involvement of human choline kinase alpha and beta in carcinogenesis: a different role in lipid metabolism and biological functions," *Adv. Enzyme Regul.*, vol. 51, no. 1, pp. 183–194, 2011, doi: 10.1016/J.ADVENZREG.2010.09.010.
- [133] K. Glunde, Z. M. Bhujwalla, and S. M. Ronen, "Choline metabolism in malignant transformation," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 11, no. 12, pp. 835–848, Dec. 2011, doi: 10.1038/NRC3162.
- [134] C. Kent, "Regulatory enzymes of phosphatidylcholine biosynthesis: a personal perspective," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1733, no. 1, pp. 53–66, Mar. 2005, doi: 10.1016/J.BBALIP.2004.12.008.
- [135] H. Marcucci, L. Paoletti, S. Jackowski, and C. Banchio, "Phosphatidylcholine biosynthesis during neuronal differentiation and its role in cell fate determination," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 33, pp. 25382–25393, Aug. 2010, doi: 10.1074/JBC.M110.139477.
- [136] W. Araki and R. J. Wurtman, "How is membrane phospholipid biosynthesis controlled in neural tissues?," *J. Neurosci. Res.*, vol. 51, no. 6, pp. 667–674, Mar. 1998, doi: 10.1002/(sici)1097-4547(19980315)51:6<667::aid-jnr1>3.0.co;2-9.
- [137] C. Aoyama, H. Liao, and K. Ishidate, "Structure and function of choline kinase isoforms in mammalian cells," *Prog. Lipid Res.*, vol. 43, no. 3, pp. 266–281, May 2004, doi: 10.1016/J.PLIPRES.2003.12.001.
- [138] G. Wu and D. E. Vance, "Choline kinase and its function," *Biochem. Cell Biol.*, vol. 88, no. 4, pp. 559–564, 2010, doi: 10.1139/O09-160.
- [139] M. Karim, P. Jackson, and S. Jackowski, "Gene structure, expression and identification of a new CTP:phosphocholine cytidyltransferase beta isoform," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1633, no. 1, pp. 1–12, Jul. 2003, doi: 10.1016/S1388-1981(03)00067-2.
- [140] N. O. Favale, M. C. Fernández-Tome, L. G. Pescio, and N. B. Sterin-Speziale, "The rate-limiting enzyme in phosphatidylcholine synthesis is associated with nuclear speckles under

- stress conditions," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1801, no. 11, pp. 1184–1194, Nov. 2010, doi: 10.1016/J.BBALIP.2010.07.003.
- [141] Z. Pavlovic and M. Bakovic, "Regulation of Phosphatidylethanolamine Homeostasis—The Critical Role of CTP:Phosphoethanolamine Cytidylyltransferase (Pcyt2)," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 2, pp. 2529–2550, Feb. 2013, doi: 10.3390/IJMS14022529.
- [142] P. Mitchell, "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism," *Nature*, vol. 191, no. 4784, pp. 144–148, 1961, doi: 10.1038/191144A0.
- [143] C. D. Baker, W. B. Ball, E. N. Pryce, and V. M. Gohil, "Specific requirements of nonbilayer phospholipids in mitochondrial respiratory chain function and formation," *Mol. Biol. Cell*, vol. 27, no. 14, pp. 2161–2171, Jul. 2016, doi: 10.1091/MBC.E15-12-0865.
- [144] J. Ren, L. Pulakat, A. Whaley-Connell, and J. R. Sowers, "Mitochondrial biogenesis in the metabolic syndrome and cardiovascular disease," *J. Mol. Med. (Berl)*, vol. 88, no. 10, pp. 993–1001, Oct. 2010, doi: 10.1007/S00109-010-0663-9.
- [145] B. E. Baysal *et al.*, "Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma," *Science*, vol. 287, no. 5454, pp. 848–851, Feb. 2000, doi: 10.1126/SCIENCE.287.5454.848.
- [146] A. L. Lehninger, "Lehninger principles of biochemistry, Second Edition," *W H Free.*, 1993, Accessed: Feb. 22, 2022. [Online]. Available: https://books.google.com/books/about/Lehninger_Principles_of_Biochemistry.html?hl=es&id=5Ek9J4p3NfkC
- [147] M. A. Welte and A. P. Gould, "Lipid droplet functions beyond energy storage," *Biochim. Biophys. acta. Mol. cell Biol. lipids*, vol. 1862, no. 10 Pt B, pp. 1260–1272, Oct. 2017, doi: 10.1016/J.BBALIP.2017.07.006.
- [148] F. Wilfling, J. T. Haas, T. C. Walther, and R. V. F. Jr, "Lipid droplet biogenesis," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 29, no. 1, pp. 39–45, 2014, doi: 10.1016/J.CEB.2014.03.008.
- [149] E. Jarc and T. Petan, "Focus: Organelles: Lipid Droplets and the Management of Cellular Stress," *Yale J. Biol. Med.*, vol. 92, no. 3, p. 435, 2019, Accessed: Jan. 18, 2022. [Online]. Available: </pmc/articles/PMC6747940/>
- [150] A. Efeyan, W. C. Comb, and D. M. Sabatini, "Nutrient-sensing mechanisms and pathways," *Nature*, vol. 517, no. 7534, pp. 302–310, Jan. 2015, doi: 10.1038/NATURE14190.

- [151] D. G. Hardie, F. A. Ross, and S. A. Hawley, "AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 13, no. 4, pp. 251–262, Apr. 2012, doi: 10.1038/NRM3311.
- [152] D. M. Muoio, K. Seefeld, L. A. Witters, and R. A. Coleman, "AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target.," *Biochem. J.*, vol. 338, no. Pt 3, p. 783, Mar. 1999, doi: 10.1042/0264-6021:3380783.
- [153] D. Garcia and R. J. Shaw, "AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance," *Mol. Cell*, vol. 66, no. 6, pp. 789–800, Jun. 2017, doi: 10.1016/J.MOLCEL.2017.05.032.
- [154] S. C. Lin and D. G. Hardie, "AMPK: Sensing Glucose as well as Cellular Energy Status," *Cell Metab.*, vol. 27, no. 2, pp. 299–313, Feb. 2018, doi: 10.1016/J.CMET.2017.10.009.
- [155] S. M. Jeon, N. S. Chandel, and N. Hay, "AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress," *Nature*, vol. 485, no. 7400, pp. 661–665, 2012, doi: 10.1038/NATURE11066.
- [156] W. M. Henne, M. L. Reese, and J. M. Goodman, "The assembly of lipid droplets and their roles in challenged cells," *EMBO J.*, vol. 37, no. 12, Jun. 2018, doi: 10.15252/EMBJ.201898947.
- [157] E. Dubots *et al.*, "TORC1 regulates Pah1 phosphatidate phosphatase activity via the Nem1/Spo7 protein phosphatase complex," *PLoS One*, vol. 9, no. 8, Aug. 2014, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0104194.
- [158] A. D. Barbosa *et al.*, "Lipid partitioning at the nuclear envelope controls membrane biogenesis," *Mol. Biol. Cell*, vol. 26, no. 20, pp. 3641–3657, Oct. 2015, doi: 10.1091/MBC.E15-03-0173.
- [159] E. Currie, A. Schulze, R. Zechner, T. C. Walther, and R. V. Farese, "Cellular fatty acid metabolism and cancer," *Cell Metab.*, vol. 18, no. 2, pp. 153–161, Aug. 2013, doi: 10.1016/J.CMET.2013.05.017.
- [160] J. A. Menendez and R. Lupu, "Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 7, no. 10, pp. 763–777, Oct. 2007, doi: 10.1038/NRC2222.
- [161] T. Petan, E. Jarc, and M. Jusović, "Lipid Droplets in Cancer: Guardians of Fat in a Stressful World," *Molecules*, vol. 23, no. 8, 2018, doi: 10.3390/MOLECULES23081941.

- [162] S. Koizume and Y. Miyagi, "Lipid Droplets: A Key Cellular Organelle Associated with Cancer Cell Survival under Normoxia and Hypoxia," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 9, Sep. 2016, doi: 10.3390/IJMS17091430.
- [163] A. G. Cabodevilla *et al.*, "Cell survival during complete nutrient deprivation depends on lipid droplet-fueled β -oxidation of fatty acids," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 39, pp. 27777–27788, Sep. 2013, doi: 10.1074/JBC.M113.466656.
- [164] M. Liu and P. Chen, "Proliferation-inhibiting pathways in liver regeneration (Review)," *Mol. Med. Rep.*, vol. 16, no. 1, pp. 23–35, Jul. 2017, doi: 10.3892/MMR.2017.6613.
- [165] Z. Cui and M. Houweling, "Phosphatidylcholine and cell death," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1585, no. 2–3, pp. 87–96, Dec. 2002, doi: 10.1016/S1388-1981(02)00328-1.
- [166] D. E. Vance and J. E. Vance, "Physiological consequences of disruption of mammalian phospholipid biosynthetic genes," *J. Lipid Res.*, vol. 50 Suppl, no. Suppl, Apr. 2009, doi: 10.1194/JLR.R800048-JLR200.
- [167] V. P. Skipski, M. Barclay, R. K. Barclay, V. A. Fetzer, J. J. Good, and F. M. Archibald, "Lipid composition of human serum lipoproteins," *Biochem. J.*, vol. 104, no. 2, pp. 340–352, 1967, doi: 10.1042/BJ1040340.
- [168] H. J. Verkade, D. G. Fast, A. E. Rusinol, D. G. Scraba, and D. E. Vance, "Impaired biosynthesis of phosphatidylcholine causes a decrease in the number of very low density lipoprotein particles in the Golgi but not in the endoplasmic reticulum of rat liver," *J. Biol. Chem.*, vol. 268, no. 33, pp. 24990–24996, 1993, doi: 10.1016/s0021-9258(19)74561-x.
- [169] W. Rawicz, K. C. Olbrich, T. McIntosh, D. Needham, and E. A. Evans, "Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers," *Biophys. J.*, vol. 79, no. 1, pp. 328–339, 2000, doi: 10.1016/S0006-3495(00)76295-3.
- [170] T. Hashidate-Yoshida *et al.*, "Fatty acid remodeling by LPCAT3 enriches arachidonate in phospholipid membranes and regulates triglyceride transport," *Elife*, vol. 4, 2015, doi: 10.7554/ELIFE.06328.
- [171] Z. Li *et al.*, "The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis," *Cell Metab.*, vol. 3, no. 5, pp. 321–331, May 2006, doi: 10.1016/J.CMET.2006.03.007.
- [172] C. J. Walkey, L. Yu, L. B. Agellon, and D. E. Vance, "Biochemical and evolutionary significance of phospholipid methylation," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 42, pp. 27043–27046, Oct. 1998, doi: 10.1074/JBC.273.42.27043.

- [173] C. Mold, C. P. Rodgers, R. L. Richards, C. R. Alving, and H. Gewurz, "Interaction of C-reactive protein with liposomes. III. Membrane requirements for binding," *J. Immunol.*, vol. 126, no. 3, pp. 856–860, 1981, Accessed: Jan. 24, 2022. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7462634/>
- [174] I. M. Hafez and P. R. Cullis, "Roles of lipid polymorphism in intracellular delivery," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 47, no. 2–3, pp. 139–148, Apr. 2001, doi: 10.1016/S0169-409X(01)00103-X.
- [175] F. Gilardi *et al.*, "Genome-wide analysis of SREBP1 activity around the clock reveals its combined dependency on nutrient and circadian signals," *PLoS Genet.*, vol. 10, no. 3, 2014, doi: 10.1371/JOURNAL.PGEN.1004155.
- [176] G. Le Martelot *et al.*, "REV-ERB α participates in circadian SREBP signaling and bile acid homeostasis," *PLoS Biol.*, vol. 7, no. 9, 2009, doi: 10.1371/JOURNAL.PBIO.1000181.
- [177] M. Lehrke and M. A. Lazar, "The many faces of PPAR γ ," *Cell*, vol. 123, no. 6, pp. 993–999, Dec. 2005, doi: 10.1016/J.CELL.2005.11.026.
- [178] S. Li *et al.*, "Genome-wide coactivation analysis of PGC-1 α identifies BAF60a as a regulator of hepatic lipid metabolism," *Cell Metab.*, vol. 8, no. 2, pp. 105–117, Aug. 2008, doi: 10.1016/J.CMET.2008.06.013.
- [179] J. J. McCarthy *et al.*, "Identification of the circadian transcriptome in adult mouse skeletal muscle," *Physiol. Genomics*, vol. 31, no. 1, pp. 86–95, Sep. 2007, doi: 10.1152/PHYSIOLGENOMICS.00066.2007.
- [180] C. Scholtes and V. Giguère, "Transcriptional control of energy metabolism by nuclear receptors," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2022, pp. 1–21, May 2022, doi: 10.1038/s41580-022-00486-7.
- [181] M. E. Guido, E. Garbarino Pico, and B. L. Caputto, "Circadian regulation of phospholipid metabolism in retinal photoreceptors and ganglion cells," *J. Neurochem.*, vol. 76, no. 3, pp. 835–845, 2001, doi: 10.1046/J.1471-4159.2001.00081.X.
- [182] E. Garbarino-Pico *et al.*, "Synthesis of retinal ganglion cell phospholipids is under control of an endogenous circadian clock: daily variations in phospholipid-synthesizing enzyme activities," *J. Neurosci. Res.*, vol. 76, no. 5, pp. 642–652, Jun. 2004, doi: 10.1002/JNR.20126.
- [183] E. Garbarino-Pico *et al.*, "Rhythms of glycerophospholipid synthesis in retinal inner nuclear layer cells," *Neurochem. Int.*, vol. 47, no. 4, pp. 260–270, Sep. 2005, doi:

- 10.1016/J.NEUINT.2005.04.024.
- [184] V. A. Acosta-Rodríguez *et al.*, “Daily rhythms of glycerophospholipid synthesis in fibroblast cultures involve differential enzyme contributions,” *J. Lipid Res.*, vol. 54, no. 7, pp. 1798–1811, Jul. 2013, doi: 10.1194/JLR.M034264.
- [185] S. Marquez *et al.*, “The metabolism of phospholipids oscillates rhythmically in cultures of fibroblasts and is regulated by the clock protein PERIOD 1,” *FASEB J.*, vol. 18, no. 3, pp. 519–521, 2004, doi: 10.1096/FJ.03-0417FJE.
- [186] A. Balsalobre, F. Damiola, and U. Schibler, “A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells,” *Cell*, vol. 93, no. 6, pp. 929–937, Jun. 1998, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81199-X.
- [187] K. Eckel-Mahan and P. Sassone-Corsi, “Metabolism control by the circadian clock and vice versa,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 16, no. 5, pp. 462–467, May 2009, doi: 10.1038/NSMB.1595.
- [188] Y. Adamovich *et al.*, “Circadian clocks and feeding time regulate the oscillations and levels of hepatic triglycerides,” *Cell Metab.*, vol. 19, no. 2, pp. 319–330, Feb. 2014, doi: 10.1016/J.CMET.2013.12.016.
- [189] G. Asher and U. Schibler, “Crosstalk between components of circadian and metabolic cycles in mammals,” *Cell Metab.*, vol. 13, no. 2, pp. 125–137, Feb. 2011, doi: 10.1016/J.CMET.2011.01.006.
- [190] J. Bass and J. S. Takahashi, “Circadian integration of metabolism and energetics,” *Science*, vol. 330, no. 6009, pp. 1349–1354, Dec. 2010, doi: 10.1126/SCIENCE.1195027.
- [191] R. Dallmann, A. U. Viola, L. Tarokh, C. Cajochen, and S. A. Brown, “The human circadian metabolome,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 7, pp. 2625–2629, Feb. 2012, doi: 10.1073/PNAS.1114410109.
- [192] K. L. Eckel-Mahan, V. R. Patel, R. P. Mohny, K. S. Vignola, P. Baldi, and P. Sassone-Corsi, “Coordination of the transcriptome and metabolome by the circadian clock,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 14, pp. 5541–5546, Apr. 2012, doi: 10.1073/PNAS.1118726109/-/DCSUPPLEMENTAL/PNAS.201118726SI.PDF.
- [193] S. Shimba *et al.*, “Deficient of a clock gene, brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), induces dyslipidemia and ectopic fat formation,” *PLoS One*, vol. 6, no. 9, Sep. 2011, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0025231.


- [194] F. W. Turek *et al.*, “Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice,” *Science*, vol. 308, no. 5724, pp. 1043–1045, May 2005, doi: 10.1126/SCIENCE.1108750.
- [195] B. Grimaldi *et al.*, “PER2 controls lipid metabolism by direct regulation of PPAR γ ,” *Cell Metab.*, vol. 12, no. 5, pp. 509–520, Nov. 2010, doi: 10.1016/J.CMET.2010.10.005.
- [196] A. Bugge *et al.*, “Rev-erba and Rev-erb β coordinately protect the circadian clock and normal metabolic function,” *Genes Dev.*, vol. 26, no. 7, pp. 657–667, Apr. 2012, doi: 10.1101/GAD.186858.112.
- [197] F. Hatanaka *et al.*, “Genome-wide profiling of the core clock protein BMAL1 targets reveals a strict relationship with metabolism,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 30, no. 24, pp. 5636–5648, Dec. 2010, doi: 10.1128/MCB.00781-10.
- [198] G. Rey, F. Cesbron, J. Rougemont, H. Reinke, M. Brunner, and F. Naef, “Genome-wide and phase-specific DNA-binding rhythms of BMAL1 control circadian output functions in mouse liver,” *PLoS Biol.*, vol. 9, no. 2, Feb. 2011, doi: 10.1371/JOURNAL.PBIO.1000595.
- [199] S. Sookoian, C. Gemma, T. F. Gianotti, A. Burgueño, G. Castaño, and C. J. Pirola, “Genetic variants of Clock transcription factor are associated with individual susceptibility to obesity,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 87, no. 6, pp. 1606–1615, Jun. 2008, doi: 10.1093/AJCN/87.6.1606.
- [200] G. Sulli, M. T. Y. Lam, and S. Panda, “Interplay between Circadian Clock and Cancer: New Frontiers for Cancer Treatment,” *Trends in cancer*, vol. 5, no. 8, pp. 475–494, Aug. 2019, doi: 10.1016/J.TRECAN.2019.07.002.
- [201] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “Hallmarks of cancer: the next generation,” *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, Mar. 2011, doi: 10.1016/J.CELL.2011.02.013.
- [202] R. C. Anafi, L. J. Francey, J. B. Hogenesch, and J. Kim, “CYCLOPS reveals human transcriptional rhythms in health and disease,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 114, no. 20, pp. 5312–5317, May 2017, doi: 10.1073/PNAS.1619320114.
- [203] L. V. M. de Assis, G. S. Kinker, M. N. Moraes, R. P. Markus, P. A. Fernandes, and A. M. de L. Castrucci, “Expression of the Circadian Clock Gene BMAL1 Positively Correlates With Antitumor Immunity and Patient Survival in Metastatic Melanoma,” *Front. Oncol.*, vol. 8, no. JUN, Jun. 2018, doi: 10.3389/FONC.2018.00185.
- [204] J. S. Takahashi, H. K. Hong, C. H. Ko, and E. L. McDearmon, “The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 9, no. 10, pp. 764–775, Oct. 2008, doi: 10.1038/NRG2430.

- [205] S. Sookoian *et al.*, “Effects of rotating shift work on biomarkers of metabolic syndrome and inflammation,” *J. Intern. Med.*, vol. 261, no. 3, pp. 285–292, Mar. 2007, doi: 10.1111/J.1365-2796.2007.01766.X.
- [206] C. B. Green, J. S. Takahashi, and J. Bass, “The meter of metabolism,” *Cell*, vol. 134, no. 5, pp. 728–742, Sep. 2008, doi: 10.1016/J.CELL.2008.08.022.
- [207] X. L. Huang, C. J. Fu, and R. F. Bu, “Role of circadian clocks in the development and therapeutics of cancer,” *J. Int. Med. Res.*, vol. 39, no. 6, pp. 2061–2066, Dec. 2011, doi: 10.1177/147323001103900601.
- [208] W. Huang, K. M. Ramsey, B. Marcheva, and J. Bass, “Circadian rhythms, sleep, and metabolism,” *J. Clin. Invest.*, vol. 121, no. 6, pp. 2133–2141, Jun. 2011, doi: 10.1172/JCI46043.
- [209] A. D. Laposky, J. Bass, A. Kohsaka, and F. W. Turek, “Sleep and circadian rhythms: Key components in the regulation of energy metabolism,” *FEBS Lett.*, vol. 582, no. 1, pp. 142–151, Jan. 2008, doi: 10.1016/j.febslet.2007.06.079.
- [210] T. Kubo *et al.*, “Prospective cohort study of the risk of prostate cancer among rotating-shift workers: findings from the Japan collaborative cohort study,” *Am. J. Epidemiol.*, vol. 164, no. 6, pp. 549–555, Sep. 2006, doi: 10.1093/AJE/KWJ232.
- [211] S. Masri and P. Sassone-Corsi, “The emerging link between cancer, metabolism, and circadian rhythms,” *Nat. Med.*, vol. 24, no. 12, pp. 1795–1803, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41591-018-0271-8.
- [212] J. C. Lacal and J. M. Campos, “Preclinical characterization of RSM-932A, a novel anticancer drug targeting the human choline kinase alpha, an enzyme involved in increased lipid metabolism of cancer cells,” *Mol. Cancer Ther.*, vol. 14, no. 1, pp. 31–39, Jan. 2015, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0531.
- [213] T. P. Burris, “Nuclear hormone receptors for heme: REV-ERBalpha and REV-ERBbeta are ligand-regulated components of the mammalian clock,” *Mol. Endocrinol.*, vol. 22, no. 7, pp. 1509–1520, Jul. 2008, doi: 10.1210/ME.2007-0519.
- [214] D. K. Nomura, J. Z. Long, S. Niessen, H. S. Hoover, S. W. Ng, and B. F. Cravatt, “Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis,” *Cell*, vol. 140, no. 1, pp. 49–61, Jan. 2010, doi: 10.1016/J.CELL.2009.11.027.
- [215] K. A. Dyar *et al.*, “Atlas of Circadian Metabolism Reveals System-wide Coordination and Communication between Clocks,” *Cell*, vol. 174, no. 6, pp. 1571–1585.e11, Sep. 2018, doi:

- 10.1016/J.CELL.2018.08.042.
- [216] A. Srivastava and P. Mannam, "Warburg revisited: lessons for innate immunity and sepsis," *Front. Physiol.*, vol. 6, no. MAR, 2015, doi: 10.3389/FPHYS.2015.00070.
- [217] L. Mao *et al.*, "Melatonin suppression of aerobic glycolysis (Warburg effect), survival signalling and metastasis in human leiomyosarcoma," *J. Pineal Res.*, vol. 60, no. 2, pp. 167–177, Mar. 2016, doi: 10.1111/JPI.12298.
- [218] D. E. Blask *et al.*, "Light exposure at night disrupts host/cancer circadian regulatory dynamics: impact on the Warburg effect, lipid signaling and tumor growth prevention," *PLoS One*, vol. 9, no. 8, Aug. 2014, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0102776.
- [219] P. M. Wagner, C. G. Prucca, F. N. Velazquez, L. G. Sosa Alderete, B. L. Caputto, and M. E. Guido, "Temporal regulation of tumor growth in nocturnal mammals: In vivo studies and chemotherapeutical potential," *FASEB J.*, vol. 35, no. 2, Feb. 2021, doi: 10.1096/FJ.202001753R.
- [220] M. W. Pfaffl, "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR," *Nucleic Acids Res.*, vol. 29, no. 9, p. E45, 2001, doi: 10.1093/NAR/29.9.E45.
- [221] M. N. Rios, N. A. Marchese, and M. E. Guido, "Expression of Non-visual Opsins Opn3 and Opn5 in the Developing Inner Retinal Cells of Birds. Light-Responses in Müller Glial Cells," *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 13, Aug. 2019, doi: 10.3389/FNCEL.2019.00376.
- [222] L. P. Morera, N. M. Díaz, and M. E. Guido, "Horizontal cells expressing melanopsin x are novel photoreceptors in the avian inner retina," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 113, no. 46, pp. 13215–13220, Nov. 2016, doi: 10.1073/pnas.1608901113.
- [223] E. Eruslanov and S. Kusmartsev, "Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry," *Methods Mol. Biol.*, vol. 594, pp. 57–72, 2010, doi: 10.1007/978-1-60761-411-1_4.
- [224] H. C. Chao *et al.*, "Using precursor ion scan of 184 with liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry for concentration normalization in cellular lipidomic studies," *Anal. Chim. Acta*, vol. 971, pp. 68–77, Jun. 2017, doi: 10.1016/J.ACA.2017.03.033.
- [225] S. Nakagawa and H. Schielzeth, "A general and simple method for obtaining R2 from generalized linear mixed-effects models," *Methods Ecol. Evol.*, vol. 4, no. 2, pp. 133–142, Feb. 2013, doi: 10.1111/J.2041-210X.2012.00261.X.

- [226] R. Yang and Z. Su, "Analyzing circadian expression data by harmonic regression based on autoregressive spectral estimation," *Bioinformatics*, vol. 26, no. 12, Jun. 2010, doi: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTQ189.
- [227] M. E. Hughes, J. B. Hogenesch, and K. Kornacker, "JTK_CYCLE: an efficient nonparametric algorithm for detecting rhythmic components in genome-scale data sets," *J. Biol. Rhythms*, vol. 25, no. 5, pp. 372–380, Oct. 2010, doi: 10.1177/0748730410379711.
- [228] E. F. Glynn, J. Chen, and A. R. Mushegian, "Detecting periodic patterns in unevenly spaced gene expression time series using Lomb-Scargle periodograms," *Bioinformatics*, vol. 22, no. 3, pp. 310–316, Feb. 2006, doi: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTI789.
- [229] Y. Touitou and E. Haus, "Aging of the human endocrine and neuroendocrine time structure," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 719, no. 1, pp. 378–397, 1994, doi: 10.1111/J.1749-6632.1994.TB56844.X.
- [230] K. Cho *et al.*, "Combined untargeted and targeted metabolomic profiling reveals urinary biomarkers for discriminating obese from normal-weight adolescents," *Pediatr. Obes.*, vol. 12, no. 2, pp. 93–101, Apr. 2017, doi: 10.1111/IJPO.12114.
- [231] O. Froy, "Metabolism and circadian rhythms--implications for obesity," *Endocr. Rev.*, vol. 31, no. 1, pp. 1–24, Feb. 2010, doi: 10.1210/ER.2009-0014.
- [232] T. Takiguchi, M. Tomita, N. Matsunaga, H. Nakagawa, S. Koyanagi, and S. Ohdo, "Molecular basis for rhythmic expression of CYP3A4 in serum-shocked HepG2 cells," *Pharmacogenet. Genomics*, vol. 17, no. 12, pp. 1047–1056, Dec. 2007, doi: 10.1097/FPC.OB013E3282F12A61.
- [233] J. N. van der Veen, J. P. Kennelly, S. Wan, J. E. Vance, D. E. Vance, and R. L. Jacobs, "The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease," *Biochim. Biophys. Acta. Biomembr.*, vol. 1859, no. 9 Pt B, pp. 1558–1572, Sep. 2017, doi: 10.1016/J.BBAMEM.2017.04.006.
- [234] L. J. Niebergall and D. E. Vance, "The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine does not predict integrity of growing MT58 Chinese hamster ovary cells," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1821, no. 2, pp. 324–334, Feb. 2012, doi: 10.1016/J.BBALIP.2011.10.018.
- [235] R. V. Farese and T. C. Walther, "Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T," *Cell*, vol. 139, no. 5, pp. 855–860, Nov. 2009, doi: 10.1016/J.CELL.2009.11.005.
- [236] L. W. Andersen, J. Mackenhauer, J. C. Roberts, K. M. Berg, M. N. Cocchi, and M. W.

- Donnino, "Etiology and therapeutic approach to elevated lactate levels," *Mayo Clin. Proc.*, vol. 88, no. 10, pp. 1127–1140, 2013, doi: 10.1016/J.MAYOCP.2013.06.012.
- [237] M. G. V. Heiden, L. C. Cantley, and C. B. Thompson, "Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation," *Science*, vol. 324, no. 5930, pp. 1029–1033, May 2009, doi: 10.1126/SCIENCE.1160809.

The image features a black background with several clusters of HepG2 cells. Each cell is outlined in red and filled with a multi-color fluorescence pattern, primarily in shades of blue, green, and yellow, representing lipid metabolism. The text is centered in the upper half of the page.

Los estudios abordados en este trabajo de tesis doctoral demuestran que células HepG2 (derivadas de hepatocarcinoma humano) cultivadas en condiciones de proliferación mantienen un reloj funcional que controla temporalmente el metabolismo. Luego de la disrupción de BMAL1, un componente clave del reloj molecular, se observaron marcadas alteraciones en el metabolismo lipídico, lo cual no sólo resalta el vínculo existente entre ambos sistemas, sino que también revela una susceptibilidad metabólica de estas células tumorales a la perturbación circadiana. A partir de nuestras observaciones y sumado a evidencias previas, pudimos determinar que la síntesis de glicerofosfolípidos y una correcta regulación circadiana son esenciales para la supervivencia de las células tumorales y en particular para la proliferación y el crecimiento de las células HepG2. Cabe destacar que alteraciones en el reloj biológico que transcurren con cambios en los niveles y/o proporción de glicerofosfolípidos y triglicéridos desencadenan trastornos metabólicos como hígado graso, obesidad y resistencia a la insulina; y tienen implicancias celulares importantes tal como se demuestra en nuestros estudios luego de la disrupción de BMAL1. Esto pone de manifiesto que un reloj funcional continúa operativo en células tumorales en proliferación, lo que las vuelve susceptibles a perturbaciones que puedan afectar significativamente su metabolismo y hacerlas blanco de quimioterapia.