



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO  
CRONOBIOLOGÍA DE LA REGULACIÓN  
METABÓLICA**

Autor: Joaquín Puerro Corral

D.N.I.: 51471575-J

Tutor: Ángel Agís Torres

Convocatoria: Junio 2016

## ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	3
<b>Introducción y antecedentes</b> .....	3
<b>Objetivos</b> .....	4
<b>Material y métodos</b> .....	4
<b>Discusión</b> .....	5
<i>Regulación intrínseca y extrínseca</i> .....	5
<i>Influencia del NAD<sup>+</sup></i> .....	5
Modificaciones post-traduccionales del reloj circadiano en las que interviene el NAD <sup>+</sup> .....	6
<i>Estado redox</i> .....	6
<i>Acetilación</i> .....	6
<i>ADP-Ribosilación</i> .....	7
Procesos no dependientes de NAD <sup>+</sup> .....	7
<i>Kinasas dependientes de AMP (AMPK)</i> .....	7
<i>O-GlcNAcilación</i> .....	7
<i>Hemo y especies reactivas</i> .....	8
NAD <sup>+</sup> como sensor nutricional. Otros sensores nutricionales .....	9
NAD <sup>+</sup> en la regulación bioenergética mitocondrial .....	10
<i>Regulación del metabolismo de carbohidratos por el reloj circadiano</i> .....	10
<i>Regulación del metabolismo de lípidos por el reloj circadiano</i> .....	12
<i>Regulación del metabolismo de proteínas y aminoácidos por el reloj circadiano</i> .....	13
<i>Control del reloj circadiano sobre la división celular</i> .....	14
<i>Influencia del reloj circadiano sobre sistema inmune y la enfermedad</i> .....	15
<b>Conclusión</b> .....	16
<b>Bibliografía</b> .....	17

## RESUMEN

El organismo, a pesar de presentar una aparente continuidad, se regula siguiendo una serie de ciclos circadianos que ocurren de coordinadamente entre los distintos procesos que ocurren en los órganos y células. Ello se hace posible gracias a la existencia de los llamados “genes reloj” orquestados por el núcleo supraquiasmático (SCN), el cual adapta los procesos externos como el ciclo de luz/oscuridad con los internos. Estos genes se co-expresan en la práctica totalidad de los tejidos, y sus productos interactúan recíprocamente a nivel translacional y transcripcional para generar oscilaciones mediante una serie de ciclos de retroalimentación. Además, existen un conjunto de procesos post-traduccionales que hacen que estos ciclos circadianos sean posibles, gracias a una serie de moléculas como la nicotinamida difosfato ( $\text{NAD}^+$ ), las quinasas dependientes de AMP (AMPK) o el grupo hemo, que participan en dichos procesos interactuando de diferentes maneras con algunos de los genes reloj. Los procesos regulados por estos genes y moléculas incluyen el mantenimiento de los niveles de macronutrientes en plasma, así como su síntesis y destrucción de manera coordinada; la bioenergética mitocondrial, la presencia de un tipo de célula inmunitaria o los síntomas de algunas enfermedades. La desregulación de estos procesos puede conllevar a una ruptura de la homeostasis en el organismo y al padecimiento de enfermedades como obesidad, aterogénesis o síndrome metabólico, y por ello se hace de vital importancia conocer el funcionamiento de estos para evitar cualquier alteración.

## INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La demanda energética y su aporte fluctúan como una función a lo largo del día, de manera concomitante con los ciclos de vigilia/sueño y de ayuno/alimentación. Ello hace que haya una variación en el metabolismo diario. Los parámetros metabólicos varían diariamente, y estos van desde los niveles circulantes de nutrientes y el uso de sustratos, el gasto energético y la termogénesis (Bailey, et al. 2014).

Por ejemplo, en humanos y roedores aumenta la temperatura y el gasto energético cuando nos despertamos, coincidentes con comportamientos para obtener un efecto termogénico positivo (aumento de actividad física y la ingesta de alimentos) (Alberts, et al. 2006; Bray, et al. 2013; Yang, et al. 2010). Por otro lado, los parámetros pueden ser menos predecibles para animales en su hábitat natural, en los que la actividad física se anticipa mientras se despiertan para realizar acciones como buscar comida o evitar ser cazados como presa. Los organismos además, gracias a su flexibilidad metabólica son capaces de mantener la homeostasis sea o no exitosa la búsqueda de alimento durante el periodo activo. Los factores endocrinos juegan un gran papel en este proceso, señalizando los periodos de actividad y alimentación. Sin embargo, se está observando que otros factores como el reloj autónomo celular también contribuyen a establecer los ritmos diarios metabólicos, lo cual le permite a la célula, órgano u organismo anticipar estímulos diarios predecibles antes de su aparición (Bailey, et al. 2014).

El sistema de sincronización circadiano en mamíferos se compone de varios relojes endógenos, permitiendo variar las funciones fisiológicas en función de la fase del día. El núcleo supraquiasmático (SCN) está formado por varios relojes celulares acoplados que pueden generar oscilaciones (Welsh, et al. 1995). Sus neuronas reciben la información directa de la retina mediante fotorreceptores y la vía retino-oftalámica para sincronizarse al ciclo de 24 horas de luz/oscuridad (Meijer, et al. 2003). Así, el SCN orchestra la ritmicidad en muchos aspectos del metabolismo, fisiología y comportamiento por vía neuronal y humoral, en un periodo de 24 horas (Delezie, et al. 2011).

El funcionamiento circadiano depende de un mecanismo del núcleo del reloj que requiere los llamados “*genes reloj*”. Estos se co-expresan en prácticamente todos los tejidos, y sus productos interactúan recíprocamente a nivel translacional y transcripcional para generar oscilaciones (Delezie, et al. 2011). Los genes controlados por reloj incluyen, entre otros, aquellos que codifican proteínas a nivel de transcripción, traducción, ciclos celulares/supervivencia y metabolismo. Se ha comprobado que un gran número de rutas metabólicas son reguladas por el reloj circadiano, de manera directa (por ejemplo, una enzima regulada transcripcionalmente por los genes reloj) o indirecta (por ejemplo la regulación de la liberación de los factor endocrinos influyen en tejidos activos metabólicamente en función de la hora del día) (Bailey, et al. 2014). Se ha demostrado que la destrucción del SCN en ratas elimina la periodicidad de ingesta, pues tras analizar el transcriptoma de su hígado, se descubrió que el 9% de sus 20.000 genes oscilan de manera circadiana bajo el control del SCN, los cuales se encargan de la modulación del comportamiento y del metabolismo (Oishi, et al. 2003), y se estima que entre un 8% y un 13% en todas las células del organismo (Bray, et al. 2008; Kornmann, et al. 2007).

Se han observado al menos 3 ciclos de retroalimentación conectados:

1. CLOCK (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput) y BMAL-1 [Brain and Muscle Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator (ARNT)-Like 1] son dos factores de transcripción que se dimerizan formando un heterodímero que activa la transcripción de los genes *Per* (Period) y *Cry* (gen criptocromo) positivamente, al unirse específicamente a una región del ADN donde se localiza su promotor, conocida como “*E-box*”, siendo la secuencia de nucleótidos de dicho promotor CACGTG.
2. Al llegar a una concentración crítica, las proteínas PER y CRY entran al núcleo e inhiben la transcripción mediada por CLOCK:BMAL-1, inhibiendo por tanto su propia transcripción.
3. El ciclo de conexión incluye a los receptores Rors (Retinoic acid-related Orphan Receptors) y su capacidad para activar *Bmall* o su análogo neuronal *Npas 2* (Neural PAS domain-containing protein 2); y a los Rev-Erbs (reverse viral erythroblastis oncogene products) y su capacidad para inhibir *Bmal-1*, *Clock* y *Npas-2* mediante los receptores ROR (*Retinoic acid-related Orphan Receptors*). Este ciclo asegura la puesta a punto de los ritmos circadianos (Preitner, et al. 2002; Guillaumond, et al. 2005; Crumbley, et al. 2010; Lee, et al. 2001)

## OBJETIVOS

En este trabajo se pretenderá conocer:

- ❖ En primer lugar la manera en la que se regulan los relojes circadianos de manera coordinada, gracias a determinadas moléculas y mecanismos post-traduccionales que afectan a la estabilización, degradación y localización subcelular de las proteínas de reloj y sus genes.
- ❖ A continuación se contemplará la manera en la que estos relojes influyen en el metabolismo a nivel de nutrientes y otros aspectos del organismo como la inmunidad.
- ❖ En última instancia, se verán algunas de las consecuencias que pueden desencadenarse por el descontrol de los relojes, demostrándose de esta manera su importancia para mantener la homeostasis del organismo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha usado la base de datos PubMed como herramienta de consulta de artículos y recopilación bibliográfica de datos.

## DISCUSIÓN

### **Regulación intrínseca y extrínseca del metabolismo**

Cada vez se está evidenciando más que los ritmos de 24 horas en varios procesos biológicos, incluyendo el metabolismo, están mediados no sólo por factores ambientales (es decir, extrínsecos), sino también por influencias endógenas (intrínsecos). La disociación de estas dos influencias se hace posible cuando las condiciones ambientales son constantes durante el curso del día (Aschoff 1965; Pittendrigh y Daan 1976). Las oscilaciones dependientes de la hora del día en los ritmos endocrino y metabólico se asocian y han sido clásicamente atribuidos a las fluctuaciones en los comportamientos diarios, y diversos estudios han propuesto una relación directa entre los dos (Bailey, et al. 2014).

Por ejemplo, en cuanto al sistema endocrino: las oscilaciones en el plasma de cortisol y TSH se mantienen incluso cuando a los humanos se les impide el sueño (Van Cauter, et al. 1999); y los niveles de adrenalina e inhibidor del activador del plasminógeno 1 siguen los mismos ritmos aún cuando se somete a los humanos a días contiguos de 20 o 28 horas (conocido como asincronía forzada) (Scheer, et al. 2010; Scheer y Shea 2013). En cuanto al metabolismo, los niveles oscilatorios de glucosa se mantuvieron con un sometimiento a asincronía forzada, demostrando que los niveles de hidratos de carbono no son simplemente secundarios a la actividad física o a la ingesta (Scheer, et al. 2009). Todo ello sugiere que las oscilaciones diarias en parámetros específicos no dependen sólo de factores ambientales, sino también (al menos en parte) a un sistema endógeno, el ciclo circadiano, el cual, además de lo dicho, se puede decir que facilita temporalmente respuestas apropiadas a través del control de los procesos celulares a lo largo del día (Bailey, et al. 2014).

### **Influencia del NAD<sup>+</sup>**

El NAD<sup>+</sup> es una molécula que además de funcionar como intermediario en innumerables mecanismos redox en el organismo, goza de importancia por su papel en la señalización celular, en modificaciones post-traduccionales.

#### *Control circadiano*

Las dos vías que controlan los niveles de esta molécula son la de biosíntesis a partir de triptófano y la ruta de recuperación, la cual sirve para preservar los niveles de NAD<sup>+</sup> cuando se utiliza como cofactor en reacciones de señalización (Imai 2010).

Cuando el NAD<sup>+</sup> es consumido se degrada a NAM (nicotinamida monofosfato), el cual mediante una serie de enzimas y una molécula de ATP se reciclará para volver a ser utilizado. Este ciclo se realiza de manera rítmica, ya que el gen de una de las enzimas, la NAMPT (nicotinamida fosforibosil transferasa), que es limitante de este proceso, se regula por el heterodímero CLOCK:BMAL-1 y su unión a dicho gen. De esta manera oscilan los niveles de NAD<sup>+</sup> y por tanto las reacciones que dependen de él (Nakahata, et al. 2009; Ramsey, et al. 2009). De acuerdo con experimentos realizados, los ritmos diarios de NAD<sup>+</sup> y NAMPT no existen en tejidos ni células en los que el reloj circadiano no funciona, y la inhibición farmacológica de NAMPT además reduce las oscilaciones de NAD<sup>+</sup> (Nakahata, et al. 2009; Peek, et al. 2003; Ramsey, et al. 2009). Todo ello demuestra que el reloj molecular juega un importante papel en la regulación de los niveles de NAD<sup>+</sup>, el cual, por otro lado retroalimenta y regula la activa la actividad del reloj como intermediario de muchos procesos.

Aun así, todavía existen vacíos en cuanto a la biología de esta molécula que necesita atención: por ejemplo no se sabe el papel concreto del reloj molecular en distintas subzonas celulares (núcleo, citosol, mitocondrias) en cuanto a la regulación de distintas cantidades de  $\text{NAD}^+$ , lo cual es importante orientado al conocimiento del control del metabolismo a nivel microambiental y de orgánulos. Además, los métodos de medida usados en alguno de los estudios podrían ser inválidos ya que estos niveles se pueden alterar durante el fraccionamiento celular, y también sería necesario que los investigadores aporten datos sobre el estado nutricional, la estrategia de alimentación, el tipo de dieta y condiciones ambientales usadas en los experimentos, ya que todos estos factores pueden impactar en los ritmos de  $\text{NAD}^+$  (Bailey, et al. 2014).

### Modificaciones post-traduccionales del reloj circadiano en las que interviene el $\text{NAD}^+$

Varios experimentos demuestran que el metabolismo no es consecuencia del efecto del reloj, sino que varios procesos metabólicos influyen en la función y sincronización de este (Peek, et al. 2012; Sahar y Sassone-Corsi 2012). Un ejemplo de ello es el recambio proteico. Para que el reloj funcione, los componentes deben ser sintetizados y degradados de una manera dependiente de la hora del día.

#### *Estado redox*

La unión del heterodímero CLOCK:BMAL-1 podría estar influida por la relación  $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ . Altos niveles de  $\text{NAD(P)H}$  aumentan la unión de este heterodímero (o de NPAS-2:BMAL-1) a la “e-box” del DNA, mientras que el  $\text{NAD(P)}^+$  la disminuye (Rutter, et al. 2001).

Notablemente, altos niveles de mRNA de lactato deshidrogenasa A (*LDHA*) se acumulan en células transfectadas con vectores de expresión que codifican NPAS-2 y BMAL-1, demostrando que la *LDHA* es diana de NPAS-2:BMAL-1. (Rutter, et al. 2001). LDH juega un papel crítico en el mantenimiento del estado redox celular, pues el  $\text{NAD}^+$  cataliza la reacción de esta en la conversión de lactato a piruvato, y el  $\text{NADH}$  la reacción inversa. Así, *LDH*, un gen diana de NPAS-2:BMAL-1, tiene la habilidad de retroalimentar y regular la actividad de reloj cambiando el potencial redox celular *in vivo* (Yoshii, et al. 2013).

#### *Acetilación*

Los niveles intracelulares de  $\text{NAD}^+$  oscilan significativamente, debido a la regulación de NAMPT por parte de CLOCK:BMAL-1. SIRT-1 (sirtuina 1) es una desacetilasa de histonas que contribuye al silenciamiento de genes y a una gran cantidad de procesos biológicos como la gluconeogénesis, sensibilidad y secreción de insulina, regulación de lípidos... Recientemente se ha sugerido que SIRT-1 desacetila BMAL-1 y PER-2 de una manera dependiente de  $\text{NAD}^+$  (Asher, et al. 2008; Nakahata, et al. 2008), contrarrestando así la actividad de acetilasa de CLOCK, también importante para la función de reloj (Doi, et al. 2006). SIRT-1 también regula los niveles de  $\text{NAD}^+$  porque es reclutado para el promotor *NAMPT* (Nakahata, et al. 2009; Ramsey, et al. 2009).

Existen evidencias que sugieren que los niveles de  $\text{NAD}^+$  influyen en el reloj circadiano *in vivo*, informando de que ratones sin CD-38 (“Cluster of Differentiation 38”; es una exoenzima cuya función es la transformación de  $\text{NAD}^+$  en ADP-ribosa) tienen el comportamiento circadiano alterado, así como una expresión alterada de genes metabólicos y de reloj en el hígado (Sahar, et al. 2011).

## *ADP-Ribosilación*

Este es otro mecanismo mediado por  $\text{NAD}^+$  para la regulación del reloj, y también involucra a PARP-1 (poli [ADP-ribosa] polimerasa 1) (Ascher y Schibler 2011), una proteína que se conoce porque cataliza la transferencia de unidades de ADP-ribosa desde el  $\text{NAD}^+$  a varias proteínas diana (Kraus y Hottiger, 2013). PARP-1 se une a CLOCK y lo poli-ADP-ribosila, disminuyendo de ese modo su unión al DNA. Por el contrario, la pérdida de PARP-1 mejora la unión de CLOCK:BMAL-1 al DNA, lo que se vio que altera la expresión de varios genes de reloj. Mientras que la actividad de PARP-1 muestra cambios diurnos, su ritmo de actividad persiste en hígados en los que se ha interrumpido la actividad de reloj, sugiriendo una mediación de factores extrínsecos (Asher, et al. 2010).

En realidad, los experimentos muestran que PARP-1 es potencialmente regulada por el tiempo de alimentación, pues el pico de la poli-ADP-ribosilación de PARP-1 puede ser desplazado por protocolos estrictos de ingesta. Por lo tanto, a diferencia de la SIRT-1, las oscilaciones circadianas en  $\text{NAD}^+$  probablemente no son responsables de los ritmos de actividad de PARP-1, ya que las oscilaciones de  $\text{NAD}^+$ , la actividad de NAMPT y de PARP-1 no están sincronizadas, lo cual significa que los ritmos de actividad de PARP-1 no necesitan la actividad de CLOCK:BMAL-1. Sin embargo, estos resultados apoyan un mecanismo en el que la actividad de PARP-1 conecta el estado de nutricional con los cambios de fase de los relojes periféricos (Asher, et al. 2010).

## *Procesos no dependientes de $\text{NAD}^+$*

### *Kinasas dependientes de AMP (AMPK)*

Las AMPK son otro sensor metabólico clave para la transmisión de señales dependientes de nutrientes y energía al reloj molecular (Jordan y Lamia 2013). Esta actúa como un sensor de energía, siendo extremadamente sensible a la relación AMP/ATP en la célula. Las AMPK catalizan la fosforilación de las proteínas represoras de reloj CRY-1 y CRY-2, haciéndolas diana de la destrucción proteosomal (Lamia, et al. 2009), y también tienen como diana a las proteínas PER para degradarlas. Los ratones sin AMPK- $\alpha$  tienen niveles altos de PER-2, apoyando la hipótesis de que la AMPK impacta en el reloj circadiano *in vivo* (Um, et al. 2007).

Parece que existe una conexión mecánica entre SIRT-1 y AMPK, pues hay estudios que muestran que SIRT-1 desacetila una enzima hepática para activar AMPK (Lan, et al. 2008). Colectivamente, estas observaciones llevan a la hipótesis de que AMPK puede reprogramar los relojes circadianos periféricos durante los estados fisiológicos y fisiopatológicos.

### *O-GlcNAcilación*

La modificación de proteínas por la “O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine” (O-GlcNAc) ha emergido como un nuevo regulador que une el metabolismo y el reloj circadiano. La O-GlcNAcilación de proteínas se regula por el balance entre la O-GlcNAc transferasa (OGT, cataliza la adición de O-GlcNAc a residuos proteicos) y la O-GlcNAcase (OGA, hidroliza los residuos de O-GlcNAc) (Hart, et al. 2011). El sustrato para la O-GlcNAcilación es un componente muy energético, el UDP-NAcetilglucosamina, un producto de la vía biosintética de la hexosamina (Bailey, et al. 2014).

Los estudios muestran variaciones diarias coordinadas con el metabolismo de la glucosa, OGT y OGA, con un pico en la O-GlcNAcilación de proteínas cardiacas en el medio de la fase activa (por la noche en los ratones). Estos cambios diurnos no se dieron en cardiomiocitos en mutantes *Clock<sup>Δ19</sup>*, sugiriendo que estas vías se encuentran bajo control directo del reloj (Young, et al. 2002). Además, ha demostrado que BMAL-1 es diana de la O-GlcNAcilación y la inhibición de OGA cambia la fase del reloj circadiano en el corazón (Durgan, et al. 2011).

Estudios relacionados en *Drosophila* y ratones apoyan el papel de esta modificación post-traducciona en la regulación del reloj circadiano, pues la O-GlcNAcilación de CLOCK y PER-2 afecta a sus actividades transcripcionales, y altera la sincronización del reloj (Kaasik, et al. 2013; Kim, et al. 2012). La O-GlcNAcilación también previene a BMAL-1 y CLOCK de su degradación, inhibiendo la ubiquitinación. La destrucción de la OGT hepática disminuye los transcritos de BMAL-1 en la fase activa y alteró los ritmos diurnos en la homeostasis de la glucosa, por afección de la expresión de genes que intervienen en la vía gluconeogénica (Li, et al. 2013). Todo ello demuestra que la O-GlcNAc es una señal metabólica que conecta el metabolismo con el reloj circadiano.

### *Hemo y especies reactivas*

La proteína férrica hemo influye en la función de reloj uniéndose a distintos componentes de reloj, incluyéndose CRY-1, CRY-2, NPAS-2 y REV ERB- $\alpha$  (Burris 2008). Por ejemplo, cuando se une a los receptores nucleares REV ERB va a conllevar a la represión de genes diana como *Bmal-1* por reclutamiento de un complejo co-represor (Raghuram, et al. 2007).

La enzima limitante de la velocidad de síntesis de hemo, la  $\delta$ -aminolevulinato sintasa (ALAS-1), muestra un ritmo circadiano a nivel génico debido a la activación por NPAS-2 y PGC-1 $\alpha$  (“Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha”), resultando en una oscilación mediada por el reloj circadiano en los niveles de hemo (Handschin, et al. 2005; Kaasik y Lee 2004). La unión de hemo a REV ERB- $\alpha$  por el contrario inhibe su propia biosíntesis a través de la inhibición de PGC-1 $\alpha$  mediada por el propio REV ERB- $\alpha$ . Así, el metabolismo de hemo mantiene sus niveles en rangos fisiológicos y se constituye un ciclo de retroalimentación metabólico adicional en el reloj molecular (Wu, et al. 2009).

Una característica importante del grupo hemo es su habilidad para unir moléculas gaseosas señalizadoras, incluyéndose el NO (óxido nítrico), CO (monóxido de carbono) y H<sub>2</sub>S (sulfuro de hidrógeno), cuyas habilidades para influir en el reloj molecular se vio por primera vez cuando la unión de CO al grupo hemo de NPAS-2 disminuyó la formación del heterodímero NPAS-2:BMAL-1 *in vitro* (Dioum, et al. 2002). Así, la regulación transcripcional de REV ERB puede ser influenciada de manera similar por la interacción de hemo con estas moléculas gaseosas (Pardee, et al. 2009). Otro estudio ha expandido el conocimiento de este concepto, mostrando que el estado redox de un tiol disulfuro controla la afinidad de hemo al dominio de ligando al que se une en REV ERB- $\beta$  con una unión más fuerte o más débil (Gupta y Ragsdale 2011). Como los cambios del tiol disulfuro son sensibles a modificaciones post-traduccionales por parte de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS, RNS), las condiciones que implican estrés oxidativo pueden causar perturbaciones en las vías controladas por REV ERB, incluida la del reloj (Bailey, et al. 2014).

En su conjunto, estos resultados sugieren fuertemente que la interacción de hemo con múltiples especies gaseosas reactivas puede ser importante para el mantenimiento de la función de reloj, y que la producción aumentada de especies reactivas podría desregular el reloj. La importancia del

control a este nivel se hace más fuerte con los últimos informes sobre las perirredoxinas, la principal enzima detoxificadora de  $H_2O_2$ , la cual tiene un ciclo de 24 horas en el estado de oxidación de su sitio catalítico (Edgar, et al. 2012). De hecho, estudios futuros deberían estar dirigidos a la comprensión de la regulación circadiana de las vías enzimáticas responsables de la producción y eliminación de las moléculas de señalización gaseosas y otras especies reactivas (como las ROS), como evidencia de apoyo creciente en su papel en la función de reloj.

#### *NAD<sup>+</sup> como sensor nutricional. Otros sensores nutricionales*

La estrecha relación entre el sistema de sincronización circadiano y el metabolismo también es subrayado por el papel de los sensores de nutrientes. Las adaptaciones del reloj a las reacciones metabólicas es probable que se logre mediante la contribución directa de los reguladores de adaptación de nutrientes. Evidencias recientes han demostrado que cambios locales en la energía celular, como las reacciones redox, pueden intervenir sobre la expresión circadiana de genes de reloj del núcleo, con los consiguientes receptores nucleares (Delezie y Challet 2011).

El  $NAD^+$ , su forma reducida NADH y sus formas fosforiladas ( $NADP^+$ , NADPH) son coenzimas que se pueden encontrar en todas las células vivientes. Como se ha explicado anteriormente, los heterodímeros CLOCK:BMAL-1 y NPAS-2:BMAL-1 pueden percibir el estado redox intracelular, y las actividades dependientes de unión al DNA de estos dímeros dependen de ambas formas NAD(H) y NADP(H) de manera opuesta. Estos resultados muestran la posibilidad de que el metabolismo de energía celular puede influir sobre la ritmicidad circadiana (Rutter, et al. 2001)

Por ejemplo, estos sensores de proteínas de reloj puede que participen en el ritmo impuesto por la alternancia del ayuno y la ingesta. De hecho, la relación  $NAD^+/NADH$  se modifica en condiciones de ayuno e ingesta, ya que la inanición disminuye el cociente  $NAD^+/NADPH$  (es decir, cambia hacia un estado reducido) a nivel mitocondrial y citoplasmático en el hígado de ratas (Williamson, et al. 1967). Por lo tanto, para la sincronización de la ingesta es plausible que el estado redox podría transmitir cambios en el metabolismo de la energía directamente a la arquitectura del reloj. En este contexto, parece lógico pensar que un horario de alimentación irregular podría además contribuir a la desalineación por perturbaciones sutiles del funcionamiento del oscilador circadiano local (Delezie y Challet 2011).

La sirtuina 1 (SIRT-1), otro sensor de energía, se ha encontrado recientemente que conecta las fisiologías circadiana y metabólica. Además de todas las acciones mencionadas de esta proteína, se sabe que juega un papel crucial en la restricción calórica (Yu, et al. 2009). La expresión de esta molécula se ha comprobado que ocurre de manera circadiana y que está involucrada en la transcripción de varios genes reloj (*Per-2*, *Cry-1*, *Bmal-1*, *Ror- $\alpha$* ). Esta proteína también puede afectar a la expresión de factores de transcripción de regulación metabólica como PGC-1 $\alpha$  para controlar la expresión de genes participantes en la gluconeogénesis y glucólisis (Rodgers, et al. 2005).

Además, la SIRT-1 hepática es capaz de modular la expresión de PPAR- $\alpha$  y de reprimir PPAR- $\gamma$  en la regulación de grasas, promoviendo la movilización de tejido adiposo blanco (Picard, et al. 2004). Con relación a esto, se ha reconocido que SIRT-1 se encuentra disminuida en células del tejido adiposo endoteliales en humanos obesos (Villaret, et al. 2010).

En adición al  $NAD(P)^+$  y SIRT-1, AMPK es otro sensor nutricional importante, sensible al ratio AMP/ATP, como ya se ha dicho anteriormente, y que además puede ser activada por otros

factores como el ejercicio, la falta de glucosa o el tratamiento con leptina. Las funciones de AMPK cubren el balance energético de todo el cuerpo (por ejemplo la ingesta, la masa corporal, homeostasis de lípidos e hidratos de carbono...) (Kahn, et al. 2005). En el músculo esquelético de ratones y miotubulos cultivados, AMPK ha demostrado regular genes implicados en el metabolismo energético actuando en coordinación con SIRT-1. La actividad de AMPK aumenta los niveles de  $NAD^+$ , lo cual a su vez permite actuar a SIRT-1, resultando en la activación de su diana PGC-1 $\alpha$  (Canto, et al. 2009).

Se ha demostrado que los ratones deficientes en AMPK- $\alpha$ 1 o AMPK- $\alpha$ 2 alteran su comportamiento alimentario y los periodos de funcionamiento libre. Sorprendentemente, la expresión rítmica de leptina, PGC-1 $\alpha$  y NAMPT se suprimió en ratones deficientes en AMPK, lo cual revela que AMPK está en cierta medida también involucrada en la vía de la NAMPT- $NAD^+$ -SIRT1-PGC1 $\alpha$  (Kahn, et al. 2005; Ramsey, et al. 2009; Bordone, et al. 2005). Por lo tanto, SIRT-1 y AMPK pueden tener funciones superpuestas para asegurar una buena puesta a punto de las regulaciones metabólica y de reloj.

### *NAD<sup>+</sup> en la regulación bioenergética mitocondrial*

Usando mitocondrias aisladas procedentes de ratones sin expresión de la proteína BMAL-1, se observó en ellas un consumo de oxígeno reducido cuando se les aportaron ácidos grasos para oxidarlos, pero no en presencia de sustratos que aportaban electrones directamente del complejo I o II de la cadena respiratoria mitocondrial. Esto sugiere que un defecto en la  $\beta$ -oxidación mediada por reloj (y no por culpa de los propios componentes de la respiración) es probable como responsable de la menor respiración en mitocondrias hepáticas de los ratones sin BMAL-1. (Bailey, et al. 2014). Experimentos adicionales del mismo estudio asociaron un metabolismo oxidativo reducido con una hiperacetilación de las proteínas mitocondriales en los ratones sin BMAL-1, potencialmente debido a niveles bajos de  $NAD^+$  y una actividad disminuida de SIRT-3 (la desacetilasa mitocondrial dependiente de  $NAD^+$ ) (Peek et al. 2013). La repleción de  $NAD^+$  con NMN normalizó la acetilación de proteínas y restauró parcialmente la respiración en las mitocondrias de estos ratones. Dado que la restauración del  $NAD^+$  está controlada por relojes autónomos de las células, estas observaciones sugieren que el control circadiano de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos está mediada por las oscilaciones rítmicas de  $NAD^+$ , la actividad de SIRT-3 y la acetilación post-traducciona de proteínas mitocondriales (Peek et al. 2013).

En apoyo a esta evidencia, otro estudio demostró que muchas proteínas mitocondriales se acetilan de diferente manera y se relacionan con alteraciones en el metaboloma hepático. (Masri, et al. 2013). Todo ello sugiere que el reloj circadiano regula el metabolismo de energía mitocondrial en parte mediante un mecanismo no transcripcional como la acetilación de proteínas.

### **Regulación del metabolismo de carbohidratos por el reloj circadiano**

A lo largo del día hay grandes variaciones en la concentración de glucosa, tanto a nivel generalizado como a nivel celular o de órgano. En periodos de alta actividad física aumenta el uso de glucosa no mediada por insulina. De manera similar, el consumo de comida lleva al uso de glucosa mediado por insulina. Es por tanto normal que una calorimetría indirecta muestre un mayor uso de glucosa durante la vigilia (Alberts et al. 2006; Calvo, et al. 2008).

Sin embargo, recientes estudios han propuesto que la glucosa no oscila exclusivamente debido al comportamiento, pues se ha visto por ejemplo que esta siempre aumenta antes de despertarse,

tanto en humanos como en roedores (hecho conocido como “fenómeno del alba”), o que persisten sus niveles durante periodos de ayuno (Bolli, et al. 1984). Estas observaciones revelan un importante papel del mecanismo circadiano, lo cual se apoya en otro tipo de estudios en los que al eliminar el SCN en ratas por cirugía o al manipular ciertos genes de reloj, se altera la homeostasis de la glucosa (La Fleur, et al. 1999). Múltiples estudios recientes sugieren que el eje SCN-núcleo paraventricular-sistema nervioso autónomo juegan un papel crítico en la liberación de glucosa hepática (Kalsbeek, et al. 2014).

La homeostasis de la glucosa se consigue a través de la regulación coordinada de la entrada exógena (ingestión, digestión, absorción) y endógena (gluconeogénesis) de esta molécula, y su consumo por los distintos órganos y tejidos. El hepatocito y su reloj circadiano juega un importante papel en la homeostasis de la glucosa también, incluyendo la renovación de glucógeno. Los niveles rítmicos de esta molécula, los cuales varían a lo largo del día, se mantuvieron al someter a roedores al ayuno (aunque con menor amplitud), sugiriendo que estos niveles no son solo secundarios al ciclo de ayuno/alimentación. Además del glucógeno, también varían las actividades enzimáticas implicadas en su metabolismo. Así, en roedores, los cuales son animales nocturnos, la glucógeno sintasa tiene sus niveles máximos durante la oscuridad, mientras que el pico de la glucógeno fosforilasa se encuentra al final de las horas de luz (Ishikawa y Shimazu 1980; Peret, et al. 1976).

Al igual que la renovación de glucógeno, la gluconeogénesis muestra variaciones diurnas, con mayores niveles durante el sueño que en la vigilia. Esta oscilación es paralela al ritmo de la PEPCK (fosfoenolpiruvato carboxiquinasa), la enzima clave participante en este proceso (Kida, et al. 1980). Se vio en ratones a quienes se les abolió BMAL-1 en los hepatocitos que el reloj circadiano es crítico para el ritmo de la expresión de esta enzima (Lamia, et al. 2008), y también se ha reportado más recientemente que el componente CRY modula la gluconeogénesis hepática de una manera dependiente de la hora del día (Zhang, et al. 2010).

Tanto el gasto de glucosa dependiente de insulina como el independiente varían a lo largo del día (la Fleur et al. 2001; Lee, et al. 1992). Los tejidos extrahepáticos contribuyen de manera significativa a la homeostasis de la glucosa. Las variaciones diurnas en el uso de glucosa persisten *ex vivo* en los músculos esquelético y cardiaco, lo cual sugiere la presencia de un mecanismo intrínseco que contribuye a esto, y se demostró en estudios realizados con miocitos del corazón, sóleo y diafragma. (Durgan et al. 2011; Dyar, et al. 2014).

La regulación de la glucosa mediada por el reloj a su vez requiere una regulación temporal por parte de factores endocrinos y de la sensibilidad a insulina. En varios estudios se determinó que tanto la secreción de esta por parte de los islotes pancreáticos como las concentraciones en plasma sufren variaciones diarias (con un incremento marcado después de las comidas) gracias a unos osciladores autosostenidos en las células  $\beta$  (Peschke y Peschke 1998). Se ha observado su desregulación con la ruptura del reloj circadiano, y también al suprimir los receptores melatoninérgicos. La sensibilidad a insulina también exhibe variaciones diarias dependientes del reloj (Muhlbauer, et al. 2009). Por ejemplo, en varios tipos de ratas alteradas genéticamente (SCN eliminado, *Clock*<sup>A19</sup>, supresión de BMAL-1) se derivó en la afectación de tolerancia de glucosa e insulina (la Fleur et al. 2001; Rudic, et al. 2004). También se alteró la señalización de insulina en varios tejidos de roedores alterados genéticamente (supresión de BMAL-1, PER-2 mutante, *Clock*<sup>A19</sup>) (Anea, et al. 2009; Carvas, et al. 2012).

El glucagón tiene niveles variables diurnos de secreción, y su concentración es regulada por la alimentación y el reloj circadiano (Ruiter, et al. 2003). Varios estudios sugieren que la

melatonina, como sincronizador importante de los ritmos circadianos, influye en la expresión pancreática de glucagón, así como en su acción periférica (Bahr, et al. 2011). Colectivamente, estas observaciones plantean la posibilidad de que los relojes circadianos de células autónomas contribuyen a la homeostasis de glucosa y sus ritmos, a través de la regulación por parte de la liberación de factores endocrinos y/o la sensibilidad.

### **Regulación del metabolismo de lípidos por el reloj circadiano**

Está bien documentado que el metabolismo lipídico muestra diferentes ritmos a lo largo del día, sincronizándose con ritmos diarios de comportamiento como los ciclos de sueño/vigilia o ayuno/ingesta. Asimismo, en varios estudios con ratones a los que se les alteraron los genes se observó la importancia de estos en este metabolismo a través de relojes intrínsecos moleculares, tanto en cuanto a su absorción/digestión como en las degradaciones oxidativas y no oxidativas de lípidos y ácidos grasos (AG), pues el tracto gastrointestinal tiene ritmos diarios que muestra a distintos niveles incluyendo la motilidad, secreción exocrina, absorción de macronutrientes y digestión enzimática (Bailey, et al. 2014).

En ratones se ha comprobado una mayor tasa de absorción de lípidos y colesterol en los periodos con más actividad. Cuando se induce la mutación *Clock*<sup>Δ19</sup> estos absorben los mismos macronutrientes de día y de noche, viéndose una pérdida de ritmo en la absorción intestinal y apoyando el papel del reloj circadiano en la absorción de nutrientes (Pan y Hussain 2009). De hecho, han sido observados por varios grupos de investigación la expresión marcada de genes de reloj en diferentes regiones y tipos celulares del tracto gastrointestinal (Pardini, et al. 2005; Sladek, et al. 2007). Más precisamente, se ha confirmado que muchos de los genes involucrados en la toma y metabolismo de lípidos en el intestino (como ApoB o la proteína transportadora microsomal de triglicéridos MTP...) muestran ritmos diurnos (Pan y Hussain 2009; Pan, et al. 2010). Otra prueba procede de un estudio en el que al suprimirle a un grupo de ratones el gen de reloj “nocturnina”, estos desarrollaron resistencia a dietas altas en grasa y obesidad debida a la gran excreción de quilomicrones por las células epiteliales intestinales (Douris, et al. 2011).

Destaca el hecho de que los ritmos de la regulación de lípidos en el tracto gastrointestinal puede adaptarse a cambios de regímenes de ingesta específicos y atenuados por diferentes condiciones de iluminación (por ejemplo luz u oscuridad constante), señalando la importancia del comportamiento de ingesta y los periodos de luz en la regulación de la función intestinal (Malloy, et al. 2012; Pan y Hussain 2009). Otro estudio ha mostrado recientemente que es necesario para el mantenimiento de la homeostasis entre las microvellosidades y la microbiota intestinal el buen funcionamiento del reloj circadiano en el epitelio, observándose que cuando este se altera también lo hace la permeabilidad y se produce por ejemplo inflamación hepática, pudiendo promover por tanto la posible aparición de enfermedades como el síndrome metabólico (Mukherji, et al. 2013).

Los AG no esterificados (NEFA) muestran ritmos diurnos, con mayores niveles en roedores durante su fase inactiva, al igual que en humanos, que tienen una mayor cantidad por la noche debido a una actividad lipolítica aumentada (Shostak, et al. 2013). Se demostró la influencia de la regulación circadiana de estos al someter a un grupo de humanos al ayuno y que al medir los NEFA, estos se mantenían más altos al final de la tarde comparado con la mañana (Carroll y Nestel 1973; Gibson, et al. 1975). En otro estudio también se mantuvieron con niveles normales los lípidos circulantes con una luz tenue constante, manteniéndose la ingesta y el desvelo (Dallmann, et al. 2012). Así se ha comprobado una evidencia fuerte de que las especies de lípidos circulantes (y presumiblemente su metabolismo) no son simplemente secundarios a ciclos comportamentales.

La regulación circadiana del metabolismo de triglicéridos (TG) se consigue en parte a través de la expresión rítmica de genes de varias enzimas implicadas en su biosíntesis (Adamovich, et al. 2014; Shostak et al. 2013). La biosíntesis de lípidos se regula a través de las SREBP (“Sterol Regulatory Element-Binding Proteins”), unos factores de transcripción unidos a la membrana a los cuales se achaca una conexión con el reloj circadiano para su regulación transcripcional. Se ha confirmado que REV ERB- $\alpha$  regula el ritmo diario de actividad y expresión de las SREBPs, así como por tanto el efecto de sus dianas enzimáticas, de manera independiente al régimen de alimentación (Le Martelot, et al. 2009).

La regulación de la toma, biosíntesis y destrucción de lípidos están fuertemente acoplados. Por tanto, no es sorprendente que la alternancia de síntesis de lípidos y la  $\beta$ -oxidación de AG tengan también una regulación diurna. Las enzimas participantes en este metabolismo oscilan de manera circadiana en varios tejidos a nivel de expresión genética (Filiano, et al. 2013; Shostak et al. 2013; Tsai, et al. 2010), y se ha corroborado mediante distintos experimentos que estas oscilaciones desaparecen al alterar los genes reloj de los ratones (tejido adiposo blanco al eliminar BMAL-1, cardiomiocitos con la alteración genética *Clock*<sup>*Δ19*</sup>) (Shostak et al. 2013; Tsai et al. 2010). Teniendo todo en cuenta, está claro que los relojes circadianos celulares autónomos regulan el metabolismo de lípidos a distintos niveles.

### **Regulación del metabolismo de proteínas y aminoácidos por el reloj circadiano**

Un ejemplo importante de regulación circadiana que ampliaremos más adelante reside en la reparación de DNA, la cual está aumentada durante el periodo activo, cuando el estrés oxidativo es alto, mientras que la síntesis de DNA se restringe a la fase menos activa de sueño. De este modo el reloj minimiza las mutaciones transmitidas a células hija. Una forma análoga de regulación ocurre con el recambio proteico: el estrés oxidativo provoca más daño *a priori* en la fase activa, mientras que se observa una mayor degradación de proteínas y autofagia en la fase de sueño, presumiblemente como un medio para eliminar proteínas u orgánulos dañados en previsión del periodo activo posterior (Edery 2000). El hecho de que esto ocurra de manera dependiente de la hora del día es esencial para el funcionamiento del propio reloj circadiano (Yoo, et al. 2013).

Los ritmos en la síntesis de proteínas parecen menos consistentes. Los picos de ésta en el músculo esquelético se dan en la vigilia, mientras que el cardiomiocito tiene el auge en reposo (Garlick, et al. 1973; Rau y Meyer 1975). La estimulación de síntesis proteica (por ejemplo en el músculo esquelético) y la concomitante inhibición de su degradación (por ejemplo en el hígado) durante la fase activa desde siempre se han atribuido a la ingesta de comida en ese periodo de tiempo (Garlick et al. 1973). De hecho, los niveles circulantes de insulina (una señal anabólica potente) aumenta en la fase activa. La insulina es una señal anabólica potente, y la evidencia sugiere que los relojes celulares circadianos autónomos influyen sobre la sensibilidad a esta, por lo que su oscilación va a ir paralelamente a la de recambio proteico (Fulks, et al. 1975). Estudios anteriores han informado de variaciones diurnas marcadas en genes implicados en el recambio proteico, incluyéndose los de las ubiquitin-ligasas, las cuales son subunidades de proteasoma y proteínas y marcadores implicados en la autofagia (Duffield, et al. 2002; Reddy, et al. 2006).

De manera similar los niveles de aminoácidos (AA) son elevados en la fase activa, actuando doblemente como estímulo y sustrato de la síntesis proteica. Las variaciones diurnas de estos persisten durante el ayuno y la ingesta de dietas libres de proteínas, lo que sugiere que su ingesta durante la fase activa no media los ritmos de circulación de AA. Por tanto, las oscilaciones en la degradación de proteínas son independientes de los ciclos de ayuno/alimentación, y la liberación

de AA a la circulación se hace de manera circadiana, en función de la hora del día (Fernstrom, et al. 1979).

De manera similar al recambio proteico se ha dado importancia a múltiples componentes del sistema de ubiquitinas/proteasoma, ya que se regula de manera circadiana. Uno de estos componentes, USP-2 (peptidasa específica de ubiquitina-2), importante en la desubiquitinación de proteínas, es considerado un gen diana directo de CLOCK:BMAL-1 en el proceso de gluconeogénesis hepática (Molusky, et al. 2012). Es interesante que la producción de este gen oscila en un número adicional de tejidos metabólicamente activos (Bray et al. 2008; McCarthy, et al. 2007). Por tanto, queda demostrado con este acúmulo de observaciones que las oscilaciones en los niveles de proteínas siguen un ciclo circadiano, de igual manera que lo siguen el resto de micronutrientes, y se ve así el impacto de los relojes celulares sobre la homeostasis de estos en nuestro organismo.

### **Control del reloj circadiano sobre la división celular**

Se ha sugerido que el mecanismo de compuertas del ciclo celular puede no estar restringido a un punto de control, sino que podría haber un mecanismo más generalizado que controle varios puntos (Yang, et al. 2010). Esto pone en tela de juicio el estado metabólico de la célula y cómo esto puede influir en la decisión de replicar su DNA y dividirse. Los genes involucrados en la replicación del DNA y el ciclo celular se expresan coordinadamente, como se ha demostrado en un estudio con levaduras, las cuales tienen dos estados respiratorios diferentes en los que expresan distintos genes, que tienen que ver con la fase metabólica en la que se encuentren y ello se relaciona con las distintas partes de su ciclo celular (Tu, et al. 2005).

Más recientemente se ha propuesto además que en mamíferos el proceso circadiano de compuertas en el ciclo celular podría seguir vías complejas. Así, se ha confirmado por ejemplo que existen diferencias entre la proliferación de cultivos de fibroblastos deficientes de *Cry-1* y *Cry-2* en comparación con ratones con las mismas deficiencias, sugiriéndose que las señales sistémicas juegan un papel importante en el control circadiano del ciclo celular (Destici, et al. 2011). Este también se ha relacionado con la homeostasis: ha habido distinto comportamiento de células en cultivo a las que se les ha dañado el DNA en comparación con las células que hay en un organismo, que contaba con varias contribuciones para reparar el daño (Gaddameedhi, et al. 2012).

En base a la idea de la influencia de señales sistémicas en el ciclo celular y su control circadiano, es importante hablar de los metabolitos a los que les afecta este control: como ya hemos comentado, el  $\text{NAD}^+$  oscila circadianamente y SIRT-1 depende de ella para jugar un importante papel en la maquinaria de reloj. Dado que el estado metabólico de la célula puede influir en el ciclo celular y los metabolitos están bajo el control del reloj circadiano, se deduce que este puede tener mucha influencia, la cual será proporcional al compromiso de dichos metabolitos y progresión del ciclo celular. Otra molécula clave es el ATP, que oscila de manera circadiana y aunque a falta de evidenciarlo con experimentos, se podría especular que los niveles de ATP pueden influir en muchas quinasas que dependen de él para fosforilar sus dianas (Womac, et. al 2009; Dallmann, et. al 2012; Eckel-Mahan, et. al 2012; Minami, et. al 2009).

La extensión en la que el reloj circadiano regula el metaboloma celular se está haciendo cada vez más evidente, y por tanto será interesante para entender cómo el estado metabólico influye completamente en el ciclo celular. Este y el reloj circadiano son dos circuitos muy distintos con muchas capas de regulación coordinada, su sincronización es crítica y por ello se controla tan

elaboradamente. El reloj circadiano controla el ciclo celular confiriendo los mecanismos de compuertas en los puntos de control clave para asegurar fidelidad en la replicación de DNA y división celular. En general, los mecanismos que regulan los dos ciclos, incluyendo una modulación bidireccional entre ambas vías, podría ser esencial para proteger el organismo frente a un proceso de ciclos desenfrenado que podría conllevar a enfermedades como el cáncer (Masri, et al. 2013).

### **Influencia del reloj circadiano sobre sistema inmune y la enfermedad**

Los receptores nucleares se expresan con distinta ritmicidad en los diferentes tejidos, y a ellos se unen distintos metabolitos y hormonas para ejercer su efecto de manera circadiana y coordinar las vías metabólicas y neuroendocrina-inmune (Schmutz, et. al 2010). Estos receptores se expresan gracias a los genes reloj, y unen moléculas conocidas como AG, colesterol, oxiesteroles, hormonas sexuales, glucocorticoides... (Bozek, et al. 2009). De esta manera habrá variaciones en niveles y capacidad de respuesta de los receptores patrón de reconocimiento para moléculas asociadas a patógenos. Por ejemplo, el receptor tipo Toll 9 se expresa por unión al heterodímero CLOCK:BMAL-1 al gen promotor TLR-9, induciendo así una ritmicidad funcional en la respuesta de citoquinas ante un shock séptico, lo cual tendría importancia en cuanto a severidad y pronóstico de este (Silver, et. al 2012).

Los genes reloj también promueven factores de transcripción implicados en el control de la expresión de genes pro-inflamatorios y en la diferenciación de células inmunitarias, cuyas citoquinas y moléculas que reclutan definen el tipo de respuesta inmune (Bozek, et al. 2009). Los circuitos transcripcionales tienen una rápida reprogramación en la señalización de citoquinas inflamatorias, y esto impulsa la respuesta de fase aguda, la cual participa en el mantenimiento de la homeostasis del tejido con su acción defensiva. Al aumentar las proteínas de fase aguda, junto con los receptores nucleares de lípidos y ácidos biliares se incide en las rutas metabólica e inflamatoria que regulan el metabolismo del colesterol y lipoproteínas, aterogénesis y desórdenes metabólicos (Venteclef, et. al 2011).

Ciertos receptores (como el LXR que une oxiesteroles) pueden interferir transcripcionalmente con la señal de activación de factores de transcripción proinflamatorios, inhibiendo de una manera dependiente de ligando la actividad de otros factores de transcripción y reprimiendo así la expresión de genes inflamatorios (proceso conocido como transrepresión) (Venteclef, et. al 2011). En el músculo liso arterial REV-ERB- $\alpha$  y ROR- $\alpha$  modulan la respuesta inflamatoria con la expresión de IL-6 y COX-2 por parte de REV-ERB- $\alpha$ , el cual también se encuentra en macrófagos de la pared vascular y depende del receptor LXR, quien activa TLR-4 (“Toll like receptor-4”) y este controla la homeostasis del colesterol y respuestas inflamatorias e inmunes (Mazzoccoli; et. al 2012).

La síntesis, catabolismo y exportación de colesterol está muy regulado para mantener los niveles estables, lo cual es indispensable debido al potencial daño que puede causar esta molécula. Las SREBPs promueven su biosíntesis y absorción cuando disminuye la concentración de colesterol intracelular. Además, LXR promueve su exportación y eliminación cuando esta aumenta (Mazzoccoli; et. al 2012).

El tejido adiposo produce de una manera rítmica circadiana adipocinas como leptina o adiponectina, modulando la sensibilidad a insulina y regulando el balance de energía que influirá en el comportamiento de ayuno/alimentación. Cuando este ritmo se rompe, se altera el perfil de 24 horas de adipocinas y se puede desarrollar obesidad, acompañado por un importante

componente inflamatorio, el estrés del retículo endoplásmico en el tejido adiposo. Una característica de la obesidad es la disminución de SIRT-1 en este tejido, y ello produce una hiperacetilación de histonas y una expresión ectópica de genes inflamatorios, jugando un papel clave la afluencia de macrófagos en el tejido adiposo durante la sobrealimentación, y el fomento de la progresión a la disfunción metabólica (Gillum, et. al, 2011; Chalkiadaki, et. al 2012). El tejido adiposo visceral expandido libera AG libres y factores pro-inflamatorios como TNF- $\alpha$ , IL-6 o la quimiocina CC de ligando 2, implicados en el desarrollo de resistencia a insulina y aterosclerosis (Mazzocchi; et. al 2012). Estos componentes retroalimentan negativamente los componentes nucleares de reloj. Los lípidos, citoquinas y vías de estrés metabólico disparan una condición crónica inflamatoria llamada “metaflamación”, que afecta a células, tejidos y órganos, incluidos los adipocitos y macrófagos. Ello conlleva a un trastorno metabólico e inflamación que altera las propiedades de lipoproteínas, el metabolismo del colesterol y promueve enfermedades como aterogénesis y diabetes mellitus tipo II (Venteclef, et. al 2011).

Se ha comprobado por tanto que la disrupción o desalineación de los relojes biológicos en diferentes tejidos puede perturbar la homeostasis metabólica y llevar a enfermedades metabólicas. Es importante saber que hay factores que pueden promover estas alteraciones, los cuales son cambios de horarios en el trabajo, la hora de alimentación, el consumo de alcohol o el padecimiento previo de enfermedades como diabetes u obesidad (Bailey, et. al 2014). Hablando aún de enfermedades, existen estudios que han demostrado una influencia del ritmo circadiano sobre estas, ya que interviene en fluctuaciones que afectan a la sintomatología tanto de las agudas como las crónicas. Esto se puede ejemplificar en el recrudecimiento de articulaciones, la rigidez matutina y la incapacidad funcional en pacientes con artritis reumatoide. Esto se relaciona con la variación en los niveles de citoquinas, agonistas endógenos del receptor  $\mu$  opioidérgico, hormonas parámetros inmunológicos, neurotransmisores y neuropéptidos liberados por el sistema nervioso autónomo (Straub, et. al 2007; Pongratz, et. al 2013). Otro ejemplo, esta vez relacionado con la sincronización con señales externas, lo constituye la Enfermedad de Alzheimer, la cual se ha demostrado que puede promoverse con la falta de sueño, pues esta aumenta la formación de placas del péptido  $\beta$ -amiloide en el espacio extracelular cerebral, las cuales además alteran el ciclo sueño/vigilia y la fluctuación diurna de esta molécula en ratones y humanos, sugiriendo la importancia de este ciclo para esta enfermedad.

## CONCLUSIÓN

Después de todo lo estudiado, podemos concluir con que debido al impacto e importancia de los ritmos circadianos ha aumentado el estudio y la comprensión de estos en los últimos años. Es importante saber que es igualmente necesario que haya tanto una buena regulación del reloj que por parte de este. El control y puesta a punto del reloj circadiano se cumple gracias a la presencia de procesos post-traduccionales y algunas moléculas clave como el NAD<sup>+</sup>, los cuales son capaces de activar y reprimir unos genes determinados u otros en función de la hora del día. Si este mecanismo funciona bien se podrán regular todos los aspectos repasados en el presente trabajo en cuanto a metabolismo, lo cual incluye a nivel de nutrientes y otros aspectos esenciales en la supervivencia del ser humano.

Estos ciclos son además objetivo de interés en la actualidad debido a la influencia que pueden tener no solo en el padecimiento de enfermedades sino también desde el punto de vista del tratamiento farmacológico. Gracias a los descubrimientos de alguno de estos estudios se ha mejorado la posología de los pacientes, y ha resultado favorecedor desde el punto de vista de la efectividad de los medicamentos. Por todo ello, se hace de vital importancia seguir investigando sobre el mecanismo y la naturaleza de los ritmos circadianos en el futuro.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adamovich Y, et al. "Circadian clocks and feeding time regulate the oscillations and levels of hepatic triglycerides". *Cell Metab.* 2014
- Alberts P, et al. "Characterization of energy expenditure in rodents by indirect calorimetry". *Curr Protoc Neurosci.* 2006.
- Anea CB, et al. "Vascular disease in mice with a dysfunctional circadian clock. *Circulation*". 2009
- Asher G, et al. "Crosstalk between components of circadian and metabolic cycles". *Cell Metab.* 2011.
- Asher G, et al. "Poly(ADP-ribose) polymerase 1 participates in the phase entrainment of circadian clocks to feeding". *Cell.* 2010.
- Asher, G. et al. "SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation". *Cell.* 2008.
- Aschoff J. "Circadian Rhythms in Man". *Science.* 1965.
- Bahr I, et al. "Melatonin stimulates glucagon secretion in vitro and in vivo". *J Pineal Res.* 2011.
- Barzilai, N. & I. Gabriel. "The role of fat depletion in the biological benefits of caloric restriction". *J. Nutr.* 2001.
- Bolli GB, et al. "Demonstration of dawn phenomenon in normal human volunteers". *Diabetes.* 1984.
- Bordone, L. & L. Guarente. "Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity". *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005.
- Bozek K, et al. "Regulation of clock-controlled genes in mammals". *PLoS ONE.* 2009.
- Bray M, et al. "Disruption of the circadian clock within the cardiomyocyte influences myocardial contractile function; metabolism; and gene expression". *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008.
- Bray M, et al. "Disruption of the circadian clock within the cardiomyocyte influences myocardial contractile function; metabolism; and gene expression". *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008.
- Bray MS, et al. "Quantitative analysis of light-phase restricted feeding reveals metabolic dyssynchrony in mice". *Int J Obes.* 2013.
- Burris TP. "Nuclear hormone receptors for heme: REV-ERBalpha and REV-ERBbeta are ligand-regulated components of the mammalian clock". *Endocrinol.* 2008.
- Calvo JA, et al. "Muscle-specific expression of PPARgamma coactivator-1alpha improves exercise performance and increases peak oxygen uptake". *Journal of Applied Physiology.* 2008.
- Canto, C. et al. "AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD+ metabolism and SIRT1 activity". *Nature.* 2009.
- Carroll KF, et al. "Diurnal variation in glucose tolerance and insulin secretion in man". *Diab.* 1973
- Carvas JM, et al. "Period2 gene mutant mice show compromised insulin-mediated endothelial nitric oxide release and altered glucose homeostasis". *Fr. Ph.* 2012
- Chalkiadaki A, et al. "High-fat diet triggers inflammation-induced cleavage of SIRT1 in adipose tissue to promote metabolic dysfunction". *Cell Metab.* 2012.
- Crumbley, C. "Characterization of the core mammalian clock component, NPAS2, as a REV-ERBalpha/RORalpha target gene". *J. Biol. Chem.* 2010.
- Dallmann R, et al. "The human circadian metabolome". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012.
- Destici E, et al. "Mammalian cryptochromes impinge on cell cycle progression in a circadian clock-independent manner". *Cell Cycle.* 2011.
- Dioum EM, et al. "NPAS2: a gas-responsive transcription factor". *Science.* 2002.
- Doi M, et al. "Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase". *Cell.* 2006.
- Douris N, et al. "Nocturnin regulates circadian trafficking of dietary lipid in intestinal enterocytes". *Curr Biol.* 2011.
- Duffield GE, et al. "Circadian programs of transcriptional activation, signaling, and protein turnover revealed by microarray analysis of mammalian cells". *Curr Biol.* 2002.
- Durgan DJ, et al. "O-GlcNAcylation, novel post-translational modification linking myocardial metabolism and cardiomyocyte circadian clock". *J Biol Chem.* 2011.
- Dyar KA et al. "Muscle insulin sensitivity and glucose metabolism are controlled by the intrinsic muscle clock". *Mol Metab.* 2014
- Eckel-Mahan KL, et al. "Coordination of the transcriptome and metabolome by the circadian clock". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012.
- Ederly I. "Circadian rhythms in a nutshell. *Physiol Genomics*". 2000.
- Edgar RS, et al. "Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms". *Nature.* 2012.
- Filiano AN, et al. "Chronic ethanol consumption disrupts the core molecular clock and diurnal rhythms of metabolic genes in the liver without affecting the suprachiasmatic nucleus". *PLoS One.* 2013.
- Fernstrom JD, et al. "Diurnal variations in plasma concentrations of tryptophan, tyrosine, and other neutral AA: effect of dietary protein intake." *Am J Clin Nutr.* 1979.
- Fulks RM, et al. "Effects of insulin, glucose, and AA on protein turnover in rat diaphragm". *J Biol Chem.* 1975.
- Gaddameedhi S et al. "Effect of circadian clock mutations on DNA damage response in mammalian cells". *Cell Cycle.* 2012
- Garlick PJ, et al. "The diurnal response of muscle and liver protein synthesis in meal-fed rats". *Biochem J.* 1973.

- Gibson T, et al. "Diurnal variation in the effects of insulin on blood glucose, plasma non-esterified fatty acids and growth hormone". *Diabetologia*. 1975
- Guillaumond, F. "Differential control of *Bmal1* circadian transcription by *REV-ERB* and *ROR* nuclear receptors". *J. Biol. Rhythms*. 2005.
- Gillum MP, Kotas ME, Erion DM, Kursawe R, Chatterjee P, Nead KT, Muise ES. "SirT1 regulates adipose tissue inflammation". *Diabetes*. 2011.
- Gupta N, et al. "Thiol-disulfide redox dependence of heme binding and heme ligand switching in nuclear hormone receptor rev-erb $\beta$ ". *J Biol Chem*. 2011.
- Handschin C et al. "Nutritional regulation of hepatic heme biosynthesis and porphyria through *PGC-1 $\alpha$* ". *Cell*. 2005.
- Hart GW, et al. "Cross Talk Between *O*-GlcNAcylation and Phosphorylation: Roles in Signaling, Transcription, and Chronic Disease". *Annu Rev Biochem*. 2011.
- Imai S. "Clocks" in the *NAD* World: *NAD* as a metabolic oscillator for the regulation of metabolism and aging". *Biochim Biophys Acta*. 2010.
- Jordan SD, et al. "AMPK at the crossroads of circadian clocks and metabolism". *Mol Cell Endocrinol*. 2013.
- Imai S, et al. "Transcriptional silencing and longevity protein *Sir2* is an *NAD*-dependent histone deacetylase". *Nature*. 2000.
- Ishikawa K, et al. "Circadian rhythm of liver glycogen metabolism in rats: effects of hypothalamic lesions". *Am J Physiol*. 1980.
- Julien Delezie and Etienne Challet. "Interactions between metabolism and circadian clocks: reciprocal disturbances". *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 2011.
- Kang JE, et al. "Amyloid-beta dynamics are regulated by orexin and the sleep-wake cycle". *Science*. 2009.
- Kaasik K, et al. "Glucose sensor *O*-GlcNAcylation coordinates with phosphorylation to regulate circadian clock". *Cell Metab*. 2013.
- Kaasik K, et al. "Reciprocal regulation of haem biosynthesis and the circadian clock". *Nature*. 2004.
- Kahn, B.B. et al. "AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism". *Cell Metab*. 2005.
- Kalsbeek A, et al. "Circadian control of glucose metabolism". *Molecular Medicine*. 2014.
- Kida K, et al. "The circadian change of gluconeogenesis in the liver in vivo in fed rats". *J Biochem*. 1980.
- Kim EY et al. "A role for *O*-GlcNAcylation in setting circadian clock speed". *Genes Dev*. 2012.
- Kornmann B, et al. "System-driven and oscillator-dependent circadian transcription in mice with a conditionally active liver clock". *PLoS Biol*. 2007.
- Kraus WL, et al. "PARP-1 and gene regulation: progress and puzzles". *Mol Aspects Med*. 2013.
- La Fleur SE et al. "A daily rhythm in glucose tolerance: a role for the suprachiasmatic nucleus". *Diabetes*. 2001.
- La Fleur SE, et al. "A suprachiasmatic nucleus generated rhythm in basal glucose concentrations". *J Neuro.* 1999.
- Lamia KA, et al. "Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008.
- Lamia KA, et al. "AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation". *Science*. 2009.
- Lan F, et al. "SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation". *J Biol Chem*. 2008.
- Le Martelot G, et al. "REV-ERB alpha participates in circadian SREBP signaling and bile acid homeostasis". *PLoS Biol*. 2009.
- Lee, A et al. "Diurnal variation in glucose tolerance. Cyclic suppression of insulin action and insulin secretion in normal-weight, but not obese, subjects". *Diabetes*. 1992.
- Lee, C. "Post-translational mechanisms regulate the mammalian circadian clock". *Cell*. 2001.
- Li MD, et al. "*O*-GlcNAc signaling entrains the circadian clock by inhibiting *BMAL1/CLOCK* ubiquitination". *Cell Metab*. 2013
- Malloy JN, et al. "Circadian rhythms of gastrointestinal function are regulated by both central and peripheral oscillators". *Am J Physiol Gastroint. Liver Physiol*. 2012.
- Masri S, et al. "Circadian acetylome reveals regulation of mitochondrial metabolic pathways". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013.
- Mazzocchi G et al. "Clock genes and clock-controlled genes in the regulation of metabolic rhythms". *Chrono. Int*. 2012.
- McCarthy JJ, et al. "Identification of the circadian transcriptome in adult mouse skeletal muscle". *Physiol Genomics*. 2007.
- Minami Y, et al. "Measurement of internal body time by blood metabolomics". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009.
- Meijer, J.H. & W.J. Schwartz. "In search of the pathways for light-induced pacemaker resetting in the suprachiasmatic nucleus". *J. Biol. Rhythms*. 2003.
- Molusky MM, et al. "Ubiquitin-specific protease 2 regulates hepatic gluconeogenesis and diurnal glucose metabolism through *11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1*". *Diabetes*. 2012.
- Muhlbauer E, et al. "Loss of melatonin signalling and its impact on circadian rhythms in mouse organs regulating blood glucose". *Eur J Pharmacol*. 2009.
- Mukherji A, et al. "Homeostasis in intestinal epithelium is orchestrated by the circadian clock and microbiota cues transduced by TLRs". *Cell*. 2013.
- Nakahata et al. "Circadian control of the *NAD*<sup>+</sup> salvage pathway by *CLOCK-SIRT1*". *Science*. 2009.

- Nakahata Y, et al. "The NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. *Cell*". 2008.
- Nikiforov A, et al. "Pathways and subcellular compartmentation of NAD biosynthesis in human cells: from entry of extracellular precursors to mitochondrial NAD generation". *J Biol Chem*. 2011.
- Oishi, K, et al. "Genome-wide expression analysis of mouse liver reveals CLOCK-regulated circadian output genes". *J. Biol. Chem*. 2003.
- Pan X, et al. "Clock is important for food and circadian Sladek M, et al. "Insight into the circadian clock within rat colonic epithelial cells". *Gastroenterology*. 2007.
- Pardee KI, et al. "The structural basis of gas-responsive transcription by the human nuclear hormone receptor REV-ERBbeta". *PLoS Biol*. 2009.
- Pardini L, et al. "Human intestinal circadian clock: expression of clock genes in colonocytes lining the crypt". *Chronobiol Int*. 2005.
- Peek CB, et al. "Circadian Clock NAD<sup>+</sup> Cycle Drives Mitochondrial Oxidative Metabolism in Mice". *Science*. 2013.
- Peek CB, et al. "Nutrient sensing and the circadian clock. *Trends Endocrinol Metab.*" 2012.
- Peret J, et al. "Schedule of protein ingestion and circadian rhythm of certain hepatic enzyme activities involved in glucose metabolism in rats". *Nutr Met*. 1976.
- Peschke E et al. "Evidence for a circadian rhythm of insulin release from perfused rat pancreatic islets". *Diabetologia*. 1998.
- Picard, F. et al. "Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma". *Nature*. 2004.
- Pittendrigh C, et al. "A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents". *Journal of comparative physiology*. 1976.
- Pongratz G, et al. "Role of peripheral nerve fibres in acute and chronic inflammation in arthritis". *Nat Rev Rheumatol*. 2013.
- Preitner, N. "The orphan nuclear receptor. REV-ERB-alpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator". *Cell*. 2002.
- Raghuram S, et al. "Identification of heme as the ligand for the orphan nuclear receptors REV-ERBalpha and REV-ERBbeta". *Nat Struct Mol Biol*. 2007.
- Ramsey KM et al. "Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD<sup>+</sup> biosynthesis". *Science*. 2009.
- Rau E, et al. "A diurnal rhythm of incorporation of L-[3H] leucine in myocardium of the rat". *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab*. 1975
- Reddy AB, et al. "Circadian orchestration of the hepatic proteome". *Curr Biol*. 2006.
- Rodgers, J.T. et al. "Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1". *Nature*. 2005.
- Roh JH, et al. "Disruption of the sleep-wake cycle and diurnal fluctuation of b-amyloid in mice with Alzheimer's disease pathology". *Sci Transl Med*. 2012.
- Rudic RD, et al. "BMAL1 and CLOCK, 2 essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis". *PLoS Biol*. 2004.
- Ruiter M, et al. "The daily rhythm in plasma glucagon concentrations in the rat is modulated by the biological clock and by feeding behavior". *Diabetes*. 2003
- Rutter J, et al. "Regulation of clock and NPAS2 DNA binding by the redox state of NAD cofactors". *Sci*. 2001.
- Sahar S, et al. "Altered behavioral and metabolic circadian rhythms in mice with disrupted NAD<sup>+</sup> oscillation". *Aging*. 2011.
- Sahar S, et al. "Regulation of metabolism: the circadian clock dictates the time". *Trends Endocrinol Metab*. 2012.
- Shannon M. Bailey, et al. "Circadian regulation of metabolism". *Journal of endocrinology*. 2014.
- Scheer FA, et al. "Human circadian system causes morning peak in pro-thrombotic plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) independent of sleep/wake cycle". *Blood*. 2013.
- Scheer FA et al. "Impact of the human circadian system, exercise, and their interaction on cardiovascular function". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010.
- Schmutz I, et al. "The mammalian clock component PERIOD2 coordinates circadian output by interaction with nuclear receptors". *Genes Dev*. 2010.
- Shostak A, et al. "Circadian regulation of lipid mobilization in white adipose tissues". *Diabetes*. 2013
- Silver AC, et al. "The circadian clock controls toll-like receptor 9-mediated innate and adaptive immunity". *Immunity*. 2012.
- Straub RH, et al. "Circadian rhythms in rheumatoid arthritis: implications for pathophysiology and therapeutic management". *Arthritis Rheum*. 2007.
- Tsai JY, et al. "Direct regulation of myocardial triglyceride metabolism by the cardiomyocyte circadian clock". *J Biol Chem*. 2010.
- Tu BP et al. "Logic of the yeast metabolic cycle: temporal compartmentalization of cellular processes". *Sci*. 2005.
- Um JH, et al. "Activation of 5'-AMP-activated kinase with diabetes drug metformin induces casein kinase Iepsilon (CKIepsilon)-dependent degradation of clock protein mPer2". *J Biol Chem*. 2007.
- Van Cauter, E, et al. "Neurobiology of Sleep and Circadian Rhythms". 1999.
- Venteclef N, et al. "Metabolic nuclear receptor signaling and the inflammatory acute phase response". *Trends Endocrinol Metab*. 2011.

Villaret, A. et al. "Adipose tissue endothelial cells from obese human subjects: differences among depots in angiogenic, metabolic, and inflammatory gene expression and cellular senescence". *Diabetes*. 2010.

Welsh, D.K. et al. "Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms". *Neuron*. 1995.

Williamson, D.H., et al. "The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver". *Biochem*. 1967.

Womac AD, et al. "Circadian rhythms of extracellular ATP accumulation in suprachiasmatic nucleus cells and cultured astrocytes". *Eur J Neurosci*. 2009.

Wu N, et al. "Negative feedback maintenance of heme homeostasis by its receptor, Rev-erb". *Genes Dev*. 2009.

Yang JN. "Adenosine A(3) receptors regulate heart rate, motor activity and body temperature". *Acta Physiol*. 2010.

Yang Q, et al. "Circadian gating of the cell cycle revealed in single cyanobacterial cells". *Science*. 2010.

Yoo SH, et al. "Competing E3 ubiquitin ligases govern circadian periodicity by degradation of CRY in nucleus and cytoplasm". *Cell*. 2013.

Yoshii K, et al. "Effects of NAD(p)H and its derivatives on the DNA-binding activity of NPAS2, a mammalian circadian transcription factor". *Biochem Biophys Res Commun*. 2013.

Young ME, et al. "Alterations of the circadian clock in the heart by streptozotocin-induced diabetes". *J Mol Cell Cardiol*. 2002.

Yu, J. & J. Auwerx. "The role of sirtuins in the control of metabolic homeostasis". *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 2009.

Zhang EE, et al. "Cryptochrome mediates circadian regulation of cAMP signaling and hepatic gluconeogenesis". *Nat Med*. 2010.