



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Licenciatura en Microbiología



Efecto de la restricción de alimento y la hoja de frijol sobre elementos del reloj circadiano en un modelo de obesidad.

Tesis individual

Como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Licenciado en Microbiología

Presenta

Carina García Rojas García Piña

Febrero, 202



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Licenciatura en Microbiología



Efecto de la restricción de alimento y la hoja de frijol sobre elementos del reloj circadiano en un modelo de obesidad.

Tesis Individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Licenciado en Microbiología

Presenta:

Carina García Rojas García Piña

Dirigido por:

Dra. Alma Dalia Luna Moreno

Dra. Alma Dalia Luna Moreno

Presidente

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez

Secretario

Dr. Fausto Arellano Carbajal

Vocal

Dra. Bertha Isabel Carvajal Gámez

Vocal

Dra. Santiago Marisela Ahumada Solórzano

Vocal

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

Centro Universitario  
Querétaro, Querétaro  
Febrero, 2020  
México

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## Resumen

La obesidad y las complicaciones metabólicas asociadas a esta han aumentado su prevalencia alrededor del mundo. Dentro de los principales factores de riesgo, se encuentran los malos hábitos de alimentación, como las dietas con un alto contenido de carbohidratos y grasa. Esto produce alteraciones metabólicas, que a su vez pueden alterar los ritmos circadianos. Los ritmos circadianos coordinan y confieren periodicidad al metabolismo, y a su vez se han sugerido como una alternativa para mejorar algunos parámetros metabólicos. En este sentido, la restricción de alimento es un protocolo utilizado para prevenir y mejorar alteraciones metabólicas provocadas por las dietas hipercalóricas. A lo cual se ha sumado la suplementación con alimentos ricos en polifenoles. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la restricción de alimento suplementada con hoja de frijol (como fuente de polifenoles) sobre la presencia de PER2 en hepatocitos de la zona centrolobulillar de animales con dieta hipercalórica. La restricción de alimento se implementó por 7 h en la fase de luz. Las dietas con hoja de frijol se suplementaron al 10% y la dieta hipercalórica se adaptó con 40% fructosa y 40% de grasa saturada de origen animal. Se utilizaron ratas macho *Wistar* con un peso de aproximadamente ~200 g, las cuales se mantuvieron bajo un ciclo de 12:12 (luz: oscuridad) y fueron designados aleatoriamente a los siguientes tratamientos: 1) dieta estándar *ad libitum* (OAL), 2) dieta hipercalórica *ad libitum* (OAL), 3) dieta estándar alimentación restringida (SAR), 4) dieta hipercalórica alimentación restringida (OAR), 5) dieta estándar suplementada con hoja de frijol alimentación restringida (SF) y 6) dieta hipercalórica suplementada con hoja de frijol alimentación restringida (OF). Los tratamientos duraron 8 semanas, posteriormente se realizó la eutanasia de los animales y el hígado fue procesado para su evaluación inmunohistoquímica. La presencia de la proteína reloj PER2 total y nuclear fue cuantificada en hepatocitos centrolobulillares. Los datos muestran que la restricción de alimento suplementado con hoja de frijol modula la presencia de PER2, tanto en el citosol como en el núcleo del hepatocito, aumentando 114% y 61% respectivamente.

**Palabras clave:** obesidad, dieta hipercalórica, ritmos circadianos, restricción de alimento, polifenoles, hígado, PER2.

## Summary

Obesity and its metabolic complications have increased in prevalence around the world. One of the main risk factors are bad eating habits; such as, diets with high carbohydrates and high fat, which cause metabolic alterations, altering circadian rhythms. In the same way, circadian rhythms coordinate and confer periodicity on metabolism, and in turn correct alterations in it. Food restriction is a protocol used to prevent and improve metabolic alterations caused by hypercaloric diets. In addition to used is supplementation with foods rich in polyphenols. The objective of this work was to determine the effect of the food restriction of supplemented with bean leaves (source of polyphenols) on the presence of PER2 in hepatocytes in centrilobular area of animals on a hypercaloric diet. The food was restricted by 7 h in the light phase, standard diet as supplemented to 10% and the hypercaloric diet was adapted with 40% fructose and 40% of saturated fat of animal origin. *Wistar* male rats with a weight of approximately ~200 g were used, which were kept under 12:12 (light: darkness) and were randomly designated to the next treatments: 1) standard diet *ad libitum* (OAL), 2) hypercaloric diet *ad libitum* (OAL), 3) standard diet *ad libitum* restricted diet (SAR), 4) hypercaloric diet restricted feeding (OAR), 5) standard diet supplemented with restricted feeding bean leaves (SF) and 6) hypercaloric diet supplemented with restricted feeding bean leaf (OF). Treatments lasted 8 weeks; after that, performed the euthanasia of the animals and the liver was processed for immunohistochemistry. The presence of the total and nuclear PER2 clock protein was quantified in the centrilobular hepatocytes. Our data reveal that food restriction supplemented with bean leaves regulates the presence of PER2, both in the cytosol and in nucleus of hepatocytes increasing 114% and 61% respectively.

**Keywords:** Obesity, hypercaloric diet, circadian rhythms, food restriction, polyphenols, liver, PER2.

## **Dedicatorias**

Dedico este proyecto especialmente a las personas más importantes de mi vida: Julián, Arturo y Carina, ustedes son mi motivación, mis ganas y mi motor en esta vida. Gracias por estar siempre en los momentos más felices de mi vida y por estar incondicionalmente a mi lado.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## Agradecimientos

El presente estudio fue realizado en el Laboratorio B-11 de Fisiología Celular, a cargo del Dr. Mauricio Díaz Muñoz, en el Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Particularmente, agradezco a la Dra. Alma Dalia Luna Moreno, quien dirigió este proyecto. Agradezco el gran apoyo, el esfuerzo, la orientación y el cariño que me brindó a lo largo del desarrollo de este proyecto, además de ser una excelente investigadora tiene una calidad humana única.

Agradezco a la Dra. Dalia Luz De Ita Pérez, quien durante su permanencia en el laboratorio me brindó un gran apoyo técnico y teórico, además por la paciencia que me tuvo en resolver todas mis dudas.

Agradezco al cuerpo académico de la Licenciatura en Microbiología, quienes implementaron ideas, conocimientos y lecciones marcaron de forma extraordinaria mi vida: Dra. Etzel Garrido, Dra. Karina Acevedo Whitehouse, Dra. Marisela Ahumada, Dr. Fausto Arellano, Dr. Antonio Cervantes, Dra. Kruskaia Karenia Humboldt, Dr. Roberto Álvarez, Dr. Carlos Saldaña, Dra. Bertha Carvajal y Dra. Angelina Rodríguez.

Agradezco personalmente a las personas que han formado parte de esta gran etapa de mi vida, y con las cuales comparto este pequeño logro:

Mi familia: Julián, Arturo, Carina, Ernesto, María Victoria, Krystel y Javier.

Mis amigos: Daniel Ferrusca, Elizabeth, Aline, Rocío, Cecilia, Ivonne, Raúl Pacheco, Nallely, Fernanda, Edwin, Gibran, Daniel Rutiaga y Jairo.

Y de manera general, quiero agradecer a la Universidad Autónoma de Querétaro por brindarme las mejores herramientas para desarrollarme como profesional, por permitirme formar parte de una carrera tan bonita. Me siento orgullosa de ser parte de esta universidad.

## Contenido general

Resumen .....	III
Summary .....	IV
Dedicatorias .....	V
Agradecimientos.....	VI
Contenido general .....	VII
Índice de tablas.....	X
1.Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	2
2.1. Obesidad.....	2
2.1.1. Modelos de obesidad inducida por dieta (DIO).....	3
2.2. Los ritmos circadianos.....	3
2.2.1. El reloj molecular.....	5
2.2.2. Ritmos circadianos y metabolismo.....	7
2.2.3. Alteraciones metabólicas y ritmos circadianos.....	8
2.2.4. Restricción de alimento y ritmos circadianos.....	9
2.3. El hígado.....	10
2.3.1. Consideraciones generales: fisiología y anatomía.....	10
2.3.2. Zonación hepática.....	11
2.3.3. Glutamina sintetasa.....	14
2.4. Compuestos polifenólicos.....	15
2.4.1. Estructura y clasificación.....	15
2.4.2. Propiedades e importancia de los compuestos polifenólicos.....	17
2.4.3. La hoja de frijol <i>Phaseolus vulgaris</i> como fuente de compuestos polifenólicos.....	18
2.5. Efecto de restricción de alimento y hoja de frijol sobre la histología hepática.....	19
3. Justificación.....	20
4. Hipótesis.....	20
5. Objetivos .....	20
5.1. Objetivo general.....	20
5.2 Objetivo particular .....	21

6. Materiales y métodos .....	21
6.1. Diseño experimental. ....	21
6.2. Sincronización por restricción de alimento.....	21
6.3. Dietas.....	22
6.4. Inmunohistoquímica.....	22
6.5. Análisis estadísticos.....	23
7. Resultados. ....	23
7.1. Distribución de la proteína reloj PER2 en los hepatocitos de la zona centrolobulillares de animales sometidos a diferentes dietas. ....	24
8. Discusión.....	34
8.1. La dieta hipercalórica disminuye la presencia de la proteína reloj PER2.....	34
8.2. La restricción temporal de alimento incrementa la presencia de la proteína reloj PER2. ....	35
8.3 La restricción temporal de alimento suplementado con hoja de frijol aumenta la presencia de la proteína reloj PER2.....	36
9. Conclusiones.....	37
10. Referencias .....	38

## Índice de figuras

FIGURA 1: Mecanismo molecular de los ritmos biológicos en mamíferos. ....	6
FIGURA 2: Zonación metabólica en el acino hepático. ....	13
FIGURA 3: Localización inmunohistoquímica de la proteína GS alrededor de las venas centrolobulillares en ratas bajo un régimen de alimentación de libre acceso (AL) y restringido (RFS). ....	14
FIGURA 4 Estructura general de los ácidos fenólicos. ....	16
FIGURA 5: Estructura general de los flavonoides. ....	17
FIGURA 6: Colocalización de la proteína reloj PER2 y GS en muestras histológicas de hígado de ratas bajo el protocolo ad libitum (SAL/OAL). ....	25
FIGURA 7: Colocalización de la proteína reloj PER2 y GS en muestras histológicas de hígado de ratas bajo el protocolo de restricción temporal de alimento (SAR/OAR). ....	27
FIGURA 8: Colocalización de la proteína reloj PER2 y GS en muestras histológicas de hígado de ratas bajo el protocolo de restricción temporal de alimento y una dieta suplementada con hoja de frijol (SF/OF). ....	29
FIGURA 9: Cuantificación de la presencia de la proteína reloj PER2 total y nuclear en los hepatocitos centrolobulillares de animales sometidos a diferentes protocolos de alimentación. ....	32

**Índice de tablas.**

Tabla 1: Resultados del análisis estadístico. ANOVA de 1 vía, prueba Post hoc Tukey....33

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## 1.Introducción.

Estudios basados en datos epidemiológicos demuestran que los trastornos metabólicos son una problemática relevante del mundo contemporáneo, debido a su impacto negativo en la calidad de vida y la inversión sanitaria (Valverde et al., 2017). En la actualidad, la obesidad y otras enfermedades metabólicas han aumentado considerablemente en las últimas décadas, particularmente en Europa y América. Este problema se asocia principalmente al alto consumo de dietas hipercalóricas con alto contenido en grasas y azúcar refinado (Soontornniyomkij et al., 2016). Las dietas hipercalóricas (DHC) son protocolos utilizados en animales para inducir obesidad y promover la resistencia a insulina, que consisten principalmente en administrar un 30-85% de las calorías derivadas de grasa y carbohidratos. El origen del elemento graso es variado, se obtiene a partir de aceites vegetales (semillas de girasol, aceite de soja, entre otros) y grasas de origen animal (manteca, sebo de res, entre otros) (Pinheiro-Castro et al., 2019). El efecto de las DHC se asocia al aumento del peso corporal, el incremento en la adiposidad a nivel sistémico, las alteraciones metabólicas y modificaciones en el comportamiento de alimentación en animales que son alimentados principalmente con grasa de origen animal). Además, diversos estudios han dilucidado que las DHC alteran los patrones de expresión de los genes reloj en órganos periféricos como el hígado y el tejido adiposo (Fontelles et al., 2016; Blancas-velazquez et al., 2017).

Evidencia acumulada sugiere que el reloj circadiano tiene una estrecha comunicación con la regulación metabólica, por lo cual, se han establecido protocolos de restricción de alimento para comprender esta asociación. La restricción temporal del alimento (RTA) tiene como finalidad la fijación de periodos constantes de alimentación y ayuno para reestablecer la robustez del sistema circadiano (Jang et al., 2012), además, se ha demostrado que es una excelente estrategia no farmacológica contra la obesidad y enfermedades asociadas (Hatori et al., 2012). Numerosos estudios revelan que el hígado tiene una mayor susceptibilidad a los cambios en la ritmicidad de 24 h (De Ita-Pérez y Díaz-Muñoz, 2017) y alteraciones las vías catabólicas y anabólicas que inducen cambios en el metaboloma del mismo según el régimen de RTA (Hatori et al., 2012).

Los compuestos polifenólicos son la fuente principal de antioxidantes en la dieta humana presentes en diversas frutas, cereales y vegetales. Estos compuestos se consideran un

elemento fundamental en diversas funciones biológicas y se han identificado distintas propiedades farmacológicas (antiinflamatorias, hepatoprotectoras, antilipídicas, entre otras) para el tratamiento de alteraciones metabólicas relacionados con obesidad como son el síndrome metabólico y la diabetes mellitus tipo 2. Además, participan en el metabolismo de la glucosa mediante la modulación de receptores de glucosa, y en la regulación de la entrada y salida de glucosa en el hígado. De este modo, la incorporación de los compuestos polifenoles a la dieta es una estrategia idónea para el tratamiento de enfermedades metabólicas (Kumar y Goel, 2019).

## **2. Antecedentes.**

### **2.1. Obesidad.**

La obesidad es una enfermedad multifactorial que afecta a más de un tercio de la población contemporánea a nivel mundial (Hruby y Hu, 2016). En México, del 2012 al 2018 se ha observado un incremento en el porcentaje (71.3% a 75.2%) de obesidad en adultos mayores de 20 años, lo que este padecimiento se convierte en la principal causa de muerte en la población mexicana (ENSANUT 2018). La obesidad se considera un factor de riesgo para enfermedades como diabetes tipo 2, hipertensión y enfermedad del hígado graso no alcohólico (Gual-grau et al., 2019).

La obesidad generalmente presenta una alteración metabólica derivada de un desequilibrio entre la ingestión y gasto energético, lo que promueve un exceso de grasa corporal o adiposidad (Hruby y Hu, 2016; Geets et al., 2019). Asimismo, esta afección se asocia a la progresión de hiperplasia e hipertrofia de los adipocitos, así como la incorporación de los macrófagos al tejido adiposo, seguido de una condición proinflamatoria M1 y la resistencia a insulina (Vekic et al., 2019).

Esta enfermedad se clasifica de acuerdo a su etiología. La obesidad poligénica es la forma más frecuente de esta afección, la cual se origina a partir de factores genéticos y obeso genéticos como la dieta con un alto contenido de grasas y sedentarismo. La obesidad monogénica se considera una forma poco frecuente y con mayores complicaciones. Particularmente, los individuos presentan una mutación desarrolla un fenotipo obeso. Los genes implicados en esta afección, participan en la vía de señalización de leptina-melanocortina en el hipotálamo (Geets et al., 2019).

La etiología de la obesidad y sus complicaciones subyacen de la combinación de factores genéticos, fisiológicos, conductuales y ambientales (Laposki et al., 2008). Una de las principales causas que contribuye al aumento de la prevalencia de obesidad en las últimas décadas es el consumo a largo plazo de dietas con un alto contenido de grasa y azúcar refinado. La transferencia del almacenamiento de la grasa corporal derivada del tejido adiposo subcutáneo al visceral evoluciona con la edad. Particularmente, la grasa visceral esta confinada a los procesos de homeostasis energética, mientras que la grasa visceral no mantiene una alineación con los procesos que mantienen las reservas de grasa. Por lo cual, la obesidad abdominal (deposición abdominal del tejido adiposo) es la principal causa de la progresión del síndrome metabólico (Soontornniyomkij et al., 2016).

### **2.1.1. Modelos de obesidad inducida por dieta (DIO).**

Los modelos de animales de obesidad inducida por dieta son protocolos estandarizados para estudiar los mecanismos implicados en la obesidad. Las adaptaciones de estas dietas son en relación a su contenido: dieta alta en grasa, dieta alta en fructosa, dieta alta en grasa y fructosa y dieta cafetera (Gual-grau et al., 2019).

Las dietas comúnmente utilizadas para estudiar estos modelos son las dietas altas en grasa, las cuales su componente principal tiene un origen vegetal o animal (Pinheiro-castro et al., 2019). Los efectos adversos que conlleva la implementación de estas dietas en largos periodos de tiempo son obesidad severa, hiperinsulemia hiperglicemia, hiperfagia y modificaciones en los patrones de actividad motriz (Blancas-velazquez et al., 2017).

### **2.2. Los ritmos circadianos.**

En los tres dominios de la vida: eukarya, archaea y bacteria, se conserva la capacidad adaptativa frente a las oscilaciones diarias en el ambiente, causadas por el movimiento de rotación de la Tierra (Dibner y Schibler, 2015). La palabra *circadiano* tiene su origen del latín (*circa* alrededor y *diem* día) y fue asignada por Franz Halberg en 1960 (Poggiogalle et al., 2017). Los ritmos circadianos son un sistema de fluctuaciones intrínsecas que permite la regulación de muchos procesos conductuales y fisiológicos en los seres vivos, tales como el sueño y la vigilia, la temperatura corporal, los niveles hormonales y el metabolismo en un periodo de ~24 h (Zhao et al., 2019).

Los ritmos circadianos se rigen en función a distintas señales exógenas tales como la luz, la temperatura y la disponibilidad de alimento a los cuales se les denomina *zeitgebers* (término alemán “dador de tiempo”). Sin embargo, se caracterizan por mantener su función periódica independientemente de los estímulos ambientales, tales como la ausencia de luz y sueño (ciclos de oscuridad y vigilia); del mismo modo, tienden a evadir señales ambientales equivocadas, y se mantienen ante señales constantes en su entorno (Buhr y Takahashi, 2014).

Los ritmos biológicos comprenden una red de comunicación autónoma entre distintos elementos. En los mamíferos, el marcapasos central conforma la base de este sistema, se localiza en el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo. Su función subyace en la captación de señales de luz en la retina a través del tracto retinohipotalámico (TRH) (Zhao et al., 2019). En segundo lugar, están los osciladores periféricos presentes en el cerebro, glándulas endocrinas y órganos periféricos, tales como el hígado, los músculos, el páncreas, tejido adiposo y tracto gastrointestinal (Poggiogalle et al., 2017; Hasakova et al., 2019).

Los procesos asociados a la producción y la secreción de hormonas muestran un comportamiento circadiano, los cuales son regulados por distintos núcleos presentes en el hipotálamo. Como se menciona previamente, el NSQ es bilateral y es un conjunto de diversos tipos de células neuronales que juega un papel importante en la captación de señales de luz en distintos niveles endocrinos: en primer lugar, recibe la señal en el TRH y es transmitida en otras regiones del cerebro y fuera del cerebro, finalmente, se coordinan los relojes periféricos en respuesta a la luz por medio de señales neuronales y humorales (Tonsfeldt and Chappell, 2013; Bae et al., 2019).

El marcapasos central participa en diversos aspectos conductuales (sueño, alimentación, vigilia, etc.), y así mismo, en la regulación metabólica principalmente por melatonina, cortisol y proyecciones sinápticas (Poggiogalle et al., 2017). Por otra parte, los relojes periféricos se mueven en función de las señales del marcapasos central y otros factores extrínsecos como la ingestión de alimentos, y hormonas como la insulina y el glucagón (Jang et al., 2012)

Los osciladores periféricos se coordinan por dos vías principales: autónoma y no autónoma. La primera subyace de la regulación propia de los osciladores independientemente de las señales emitidas por el marcapasos central, y la segunda, se desarrolla directamente por señales humorales y neuronales (Bass y Takahashi, 2010).

Otro oscilador independiente al NSQ y asociado a la demanda y/o absorción de nutrientes en los tejidos, es el denominado Oscilador Sincronizado por Alimento (OSA). Aunque su sustrato anatómico no ha sido definido, se cree que es una red de intercomunicación entre diferentes órganos relacionados con la alimentación (Panda, 2016; Challet, 2019).

### 2.2.1. El reloj molecular.

La base transcripcional de los ritmos biológicos en los mamíferos es una vía canónica constituida por asas de retroalimentación de expresión o represión de genes llamados reloj, donde participan distintas proteínas nucleares y citoplasmáticas que producen ciclos endógenos de ~24 h (Hasakova et al., 2019). Este proceso se genera por la formación de factores de transcripción heterodiméricos a partir de CLOCK/NPAS2 (circadian locomotor output cycles kaput, neuronal PAS domain protein 2) y BMAL1 (brain and muscle ARNT-like protein 1; also ARNTL—aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1), los cuales se unen en sitios reguladores de E-box en los promotores de los genes *Per* (Period; homólogo 1 y 2), *Cry* (crytochromo; homólogo 1 y 2) y los genes de receptores de hormonas nucleares *Ror- $\alpha$*  y *- $\beta$* ) y *Ror* (*- $\alpha$* , *- $\beta$*  y *- $\gamma$* ) (Green, 2008; Panda, 2016)

El bucle de retroalimentación negativa culmina en la formación del dímero PER-CRY en el citoplasma, posteriormente dicho heterodímero es hiperfosforilado por la cinasa ( $\epsilon/\gamma$ ), y se transloca al núcleo para inhibir a CLOCK-BMAL1. Asimismo, la degradación de este complejo se lleva a cabo por medio de la ubiquitinación, lo que permite iniciar un nuevo ciclo de transcripción (Buhr y Takahashi, 2014). Un segundo bucle de retroalimentación se lleva a cabo por las proteínas REV-ERB $\alpha$  y ROR $\alpha$ , los cuales, activan o inhiben la expresión de BMAL1 a través de los elementos de ADN ROR (RORE) de su promotor para finalmente promover su expresión rítmica. Además, estas proteínas también interfieren en la expresión varias horas de CRY1 con respecto a CRY2 (Panda, 2016).

Este conjunto de asas transcripcionales conformada por los genes reloj, se distribuye esencialmente en el NSQ. Sin embargo, también se localiza de manera independiente en la mayoría de las células de órganos periféricos. Además de los genes reloj, que exhiben un patrón de ritmo circadiano, también existen otros genes distribuidos en los tejidos periféricos que presentan este patrón. En estudios de comparación de expresión de genes en ratones,

se ha demostrado que entre el 2 y 10% del genoma total mantiene un comportamiento circadiano en distintos tejidos (Buhr y Takahashi, 2014).

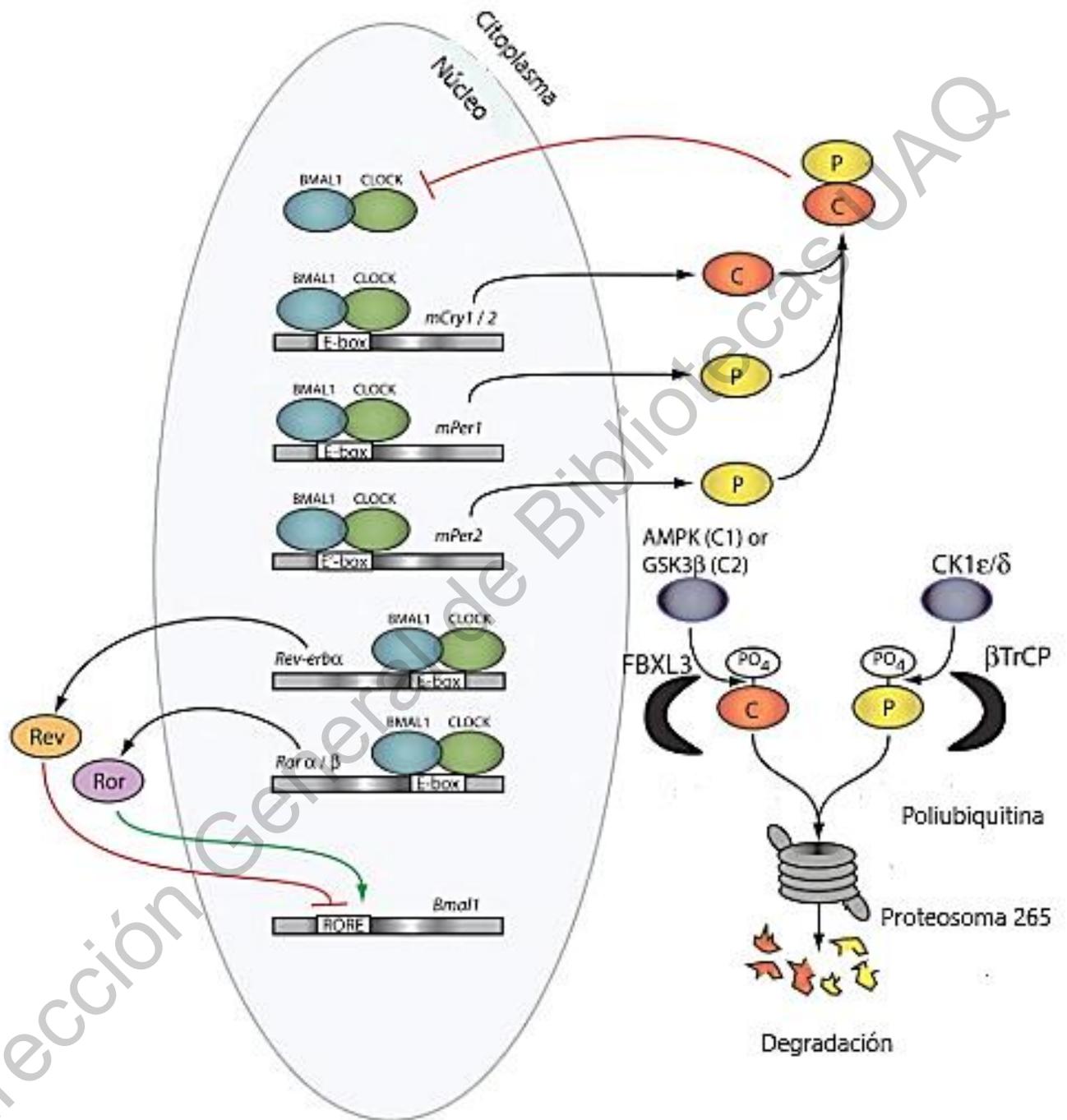


FIGURA 1: Mecanismo molecular de los ritmos biológicos en mamíferos.

Las proteínas BMAL1 (óvalo azul) y CLOCK (óvalo verde) forman un heterodímero que se une a las regiones E-box de los genes de *Cry 1/2* y *Per 1/2* (primeras 3 líneas grises) para promover su transcripción. Una vez que las proteínas PER 1/2 (óvalo amarillo) y CRY 1/2 (óvalo naranja) se localizan en el citoplasma, se ensamblan para formar un heterodímero y se translocan al núcleo. Por consiguiente, se unen al complejo BMAL1/CLOCK para reprimir su actividad (línea roja). Las cinasas GSK3 $\beta$  y CK1 $\epsilon/\delta$  (óvalos grises) fosforilan a CLOCK 1/2 y PER 1/2 respectivamente, mientras que FBXL3 y  $\beta$ TrCP (medias lunas negras) se encargan de la ubiquitinación para que las proteínas sean degradadas por el proteosoma 26S. Por otro lado, el complejo BMAL1/CLOCK promueven la transcripción de las proteínas REV-ERB $\alpha$  (óvalo beige) y ROR $\alpha$  (óvalo lila), acto seguido, REV-ERB $\alpha$  y ROR $\alpha$  se unen a las regiones RORE del gen *Bmal1* para inhibir o promover su transcripción. (Imagen modificada de (Buhr y Takahashi, 2014))

### **2.2.2. Ritmos circadianos y metabolismo.**

Estudios recientes esclarecen que los elementos del sistema circadianos están íntimamente asociados a la homeostasis energética, ya que establecen los principios de temporalidad en los procesos metabólicos (como la ingesta de alimentos, gluconeogénesis, etc.), sin la intervención de aspectos conductuales, como comer y dormir, y esto a su vez, permite sincronizar a los animales a los eventos periódicos generados en su entorno (Challet, 2019).

El sistema circadiano dirige eficazmente el metabolismo en los tejidos periféricos durante los periodos de luz y oscuridad. Por ejemplo, durante el periodo de sueño/ayuno, el reloj del hígado activa la gluconeogénesis, la glucogenólisis y la biosíntesis mitocondrial, en contraste al periodo de vigilia/alimentación que activa vías de síntesis de glucógeno y ácidos biliares (Bass y Takahashi, 2010).

De la misma manera, el hipotálamo se encarga de regular la homeostasis energética, mediante la captación y modificación de sus funciones como un mecanismo de respuesta ante los cambios de disponibilidad de nutrientes (Engin, 2017). Por otra parte, los órganos periféricos se encargan de mandar las señales del estado energético y los horarios de los alimentos (alimento-ayuno) al cerebro, a través de nutrientes circulantes y hormonas (Green, 2008)

En un contexto de restricción de alimento, se manifiestan procesos de adaptación fisiológica para promover el acceso y reserva de energía de los alimentos ingeridos, con la finalidad de reducir el gasto de energía (Challet, 2019). Durante la implantación del OSA, existe un periodo de preparación a la disponibilidad del alimento llamado actividad anticipatoria del alimento (AAA). Esta última, es regulada por el OSA (Engin, 2017). Aunque se desconoce el sitio anatómico del OSA, se sabe con determinación que el hígado y distintos osciladores periféricos participan en conjunto para anticipar al animal en su búsqueda de alimento (Del ta-Pérez y Díaz-Muñoz, 2017).

### **2.2.3. Alteraciones metabólicas y ritmos circadianos.**

Los procesos metabólicos son regulados directamente por reloj circadiano en una condición homeostática, por lo cual, la presencia de algún desorden en la dieta, desacoplamiento en los horarios de sueño-vigilia y perturbación en el comportamiento, conducen a una alteración metabólica y la fisiología del reloj circadiano. Específicamente, las alteraciones de los ciclos circadianos intrínsecos en modelos de animales y humanos, aumenta el riesgo de padecer enfermedades metabólicas y cardiovasculares, obesidad, diabetes y cáncer (Dibner y Schibler, 2015; Ferrell y Chiang, 2015; Bae et al., 2019).

En un estudio con ratones que muestran una alteración en los relojes circadianos, se observa un mayor contenido de grasa. Además, los ratones que tienen mutaciones en el gen *Bmal1* en el hígado presentan un desorden homeostático de glucosa (Jang et al., 2012). En otro estudio, los ratones con mutaciones en el gen *Clock* homocigoto, presentan modificaciones marcadas en la homeostasis energética, específicamente, síndrome metabólico, esteatosis hepática, altos niveles de glucosa en sangre y bajos niveles de insulina en sangre (Green et al., 2008).

Por otra parte, las alteraciones metabólicas parecen ser un factor importante en el equilibrio de los ritmos circadianos. Las dietas hipercalóricas (DHC) se han identificado que modifican los patrones de expresión de los genes *Per2* y *Bmal1* y, a su vez, modulan la ingesta de alimentos en el cerebro. Las DHC juegan un rol importante en la progresión de la obesidad (aumento de la ingesta calórica y peso corporal); y por ello, se han desarrollado modelos de obesidad con animales alimentados con dietas altas en calorías (alto contenido de grasa y carbohidratos) (Green et al., 2008; Blancas-Velazquez et al., 2017).

En estudios previos con ratones alimentados con una DHC, se identifican modificaciones en su comportamiento (mayor actividad locomotora en la fase de oscuridad y un mayor consumo de los alimentos en el ciclo de descanso durante el día). Estas modificaciones conducen a cambios en la expresión de los genes del reloj molecular en los tejidos periféricos y un desequilibrio hormonal (Green et al., 2008).

#### **2.2.4. Restricción de alimento y ritmos circadianos.**

La restricción temporal del alimento (RTA) se encarga de establecer la robustez de los ritmos circadianos mediante la adaptación de periodos fijos y constantes de la ingesta de alimentos y el ayuno, esto con la finalidad de prevenir y mejorar enfermedades metabólicas. (Wilkinson et al., 2020). Los modelos de RTA establecen el acceso limitado de los alimentos (2 a 4 h) diariamente durante un periodo consecutivo que induce cambios contrastantes en los procesos a nivel molecular, bioquímico, fisiológico y conductual, tal como la AAA mencionada previamente, que se asocia con el OSA. (Vera-Rivera et al., 2013).

Por otra parte, en modelos de ratones con alimentación restringida se observa un aumento en la su actividad locomotora y modificaciones en su comportamiento un tiempo previo de la disposición de los alimentos; estos cambios son asociados principalmente a la actividad anticipatoria del alimento (Wilkinson et al., 2020; Green et al., 2008)

En estudios previos en ratones con PER2 disfuncional, se observa su relevancia implicada en la cronología de la actividad anticipatoria al alimento, ya que se observan cambios en los ritmos de dicha actividad en ausencia de la proteína (Green et al., 2008). Se ha identificado que los periodos de restricción de alimento modifican los patrones de expresión de genes del reloj molecular periféricos, pero sin presenciar cambios en los genes del reloj molecular presentes en el NSQ. De manera específica, los *genes Bmal1, Clock y Per2* cambian sus patrones de expresión en el hígado en presencia de distintos periodos de restricción calórica (Jang et al., 2012; Wilkinson et al., 2020).

En otro estudio con ratones que son alimentados con una dieta alta en grasa de forma *ad libitum*, son propensos a contraer obesidad acompañada de resistencia a la insulina y esteatosis hepática de manera similar al patrón de obesidad en humanos, sin embargo, los ratones que son alimentados con la misma dieta, pero de manera restringida (durante 4 h)

no desarrollan obesidad. Esto sugiere, que existe una estrecha asociación entre la dieta y los ritmos circadianos, por lo que las dietas altas en grasas afectan negativamente los ritmos circadianos (Soontornniyomkij et al., 2016; Bae et al., 2019).

Por otro lado, la restricción de alimento conduce a cambios importantes en la actividad metabólica y a nivel de histológico en el hígado: aumento del estado redox, aumento en la síntesis mitocondrial, reducción en el flujo de glucógeno, incremento en la oxidación de ácidos grasos y cambios en el tamaño de los hepatocitos (Vera-Rivera et al., 2013). Además, se ha observado que la restricción de alimento produce cambios en la zonación del metabolismo del hígado (Del ta-Pérez y Díaz-Muñoz, 2017).

Cabe mencionar, que además la GS presenta cambios a nivel transcripcional, fracción proteica celular y en su actividad bajo un régimen de restricción de alimento, sin embargo, conserva su distribución zonal alrededor de la vena centrolobulillar, y por lo tanto, su presencia en esta región no muestra un patrón rítmico (Vera-Rivera et al., 2013).

### **2.3. El hígado.**

#### **2.3.1. Consideraciones generales: fisiología y anatomía.**

En la actualidad, el hígado es el órgano interno más grande del cuerpo que juega un papel fundamental en la homeostasis metabólica de vertebrados. Está formado por una superficie capsular lisa, y el parénquima, que está compuesto por un tejido color marrón que se bifurca en lóbulos. La población celular que se encuentra en mayor proporción son las células parenquimatosas: hepatocitos (70-80%), son separados por las sinusoides hepáticas y desarrollan diversas actividades a nivel metabólico y endocrino (Cullen and Stalker, 2016; Wang et al., 2017). Por otro lado, se encuentran las células no parenquimatosas (CNP) que apoyan la función de los hepatocitos: las células Kupffer (macrófagos) localizadas en las sinusoides hepáticas y las células estrelladas presentes en los pericitos del espacio de Disse que se activan como respuesta al daño hepático. La bilis se libera a través de los hepatocitos, se drena en los conductos biliares (compuestos por células epiteliales), y sale del hígado mediante el conducto biliar (Cullen y Stalker, 2016; Wang et al., 2017; Ben-moshe y Itzkovitz, 2019).

Las principales funciones del hígado son la desintoxicación sistémica de la sangre, el procesamiento de carbohidratos, lípidos, aminoácidos y vitaminas derivados de la dieta, la síntesis e intercambio de las proteínas plasmáticas, regula los niveles de glucosa en sangre durante el día, y durante periodos de ayuno facilita el acceso de glucosa ante la demanda sistémica, además, actúa como un órgano linfoide que confiere protección contra infecciones (Cullen y Stalker, 2016; Wang et al., 2017; Ben-moshe y Itzkovitz, 2019).

De manera general, el hígado se encarga de ingresar la sangre con un alto contenido de nutrientes (provenientes del tracto gastrointestinal) mediante la vena porta. La vena porta confiere el 70-80% del torrente sanguíneo aferente total en el hígado. Por otro lado, la sangre oxigenada (derivada del corazón) ingresa mediante la arteria hepática. El flujo sanguíneo portal y arterial desemboca en las sinusoides hepáticas, que son conductos localizados en los cordones de los hepatocitos, y están revestidos de células de Kupffer y células endoteliales. Finalmente, la sangre es expulsada del hígado a través de la vena hepática (Cullen y Stalker, 2016; Wang et al., 2017).

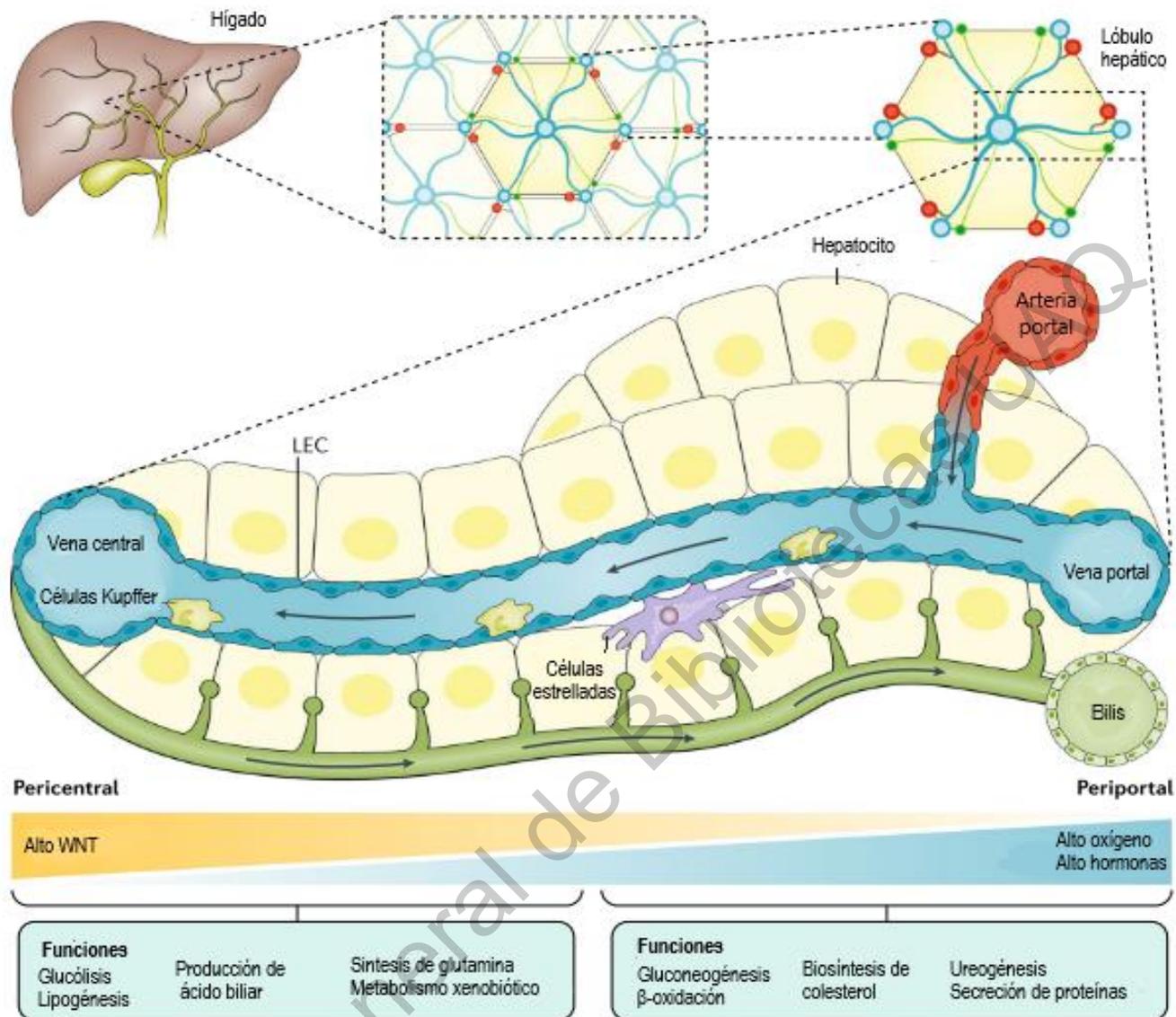
### **2.3.2. Zonación hepática.**

El parénquima hepático mantiene una distribución celular anatómicamente funcional, es decir, cada hepatocito posee enzimas, translocadores y receptores específicos de acuerdo con su posición anatómica a lo largo del tejido, lo cual confiere a los hepatocitos actividades metabólicas diferentes. Este principio establece el concepto de “zonación metabólica”, el cual se observó por primera vez en el metabolismo de carbohidratos, y luego se extendió para incorporar el metabolismo xenobiótico, de aminoácidos y amoníaco, síntesis de proteínas plasmáticas y sistema inmune (Jungermann y Kietzmann, 1996; Cullen y Stalker, 2016).

Los patrones de distribución de los hepatocitos se denominan convencionalmente como lóbulos o acinos. El lóbulo clásico es una estructura formada por 6 lados de hepatocitos localizados alrededor de la vena central hepática. Cada lóbulo está delimitado por tabiques fibrovasculares que van desde el tracto portal. En algunas patologías hepáticas, los términos periportal y centrilobular son comúnmente utilizados para referir a los hepatocitos que se distribuyen alrededor de los tractos portales o las venas centrales del lóbulo (Cullen y Stalker, 2016).

El acino es la unidad funcional y anatómica del hígado. Su principal actividad es suministrar la sangre y sus patrones de distribución dependen de esta. La distribución del acino comienza a partir de la vénula portal terminal y una arteriola hepática terminal, que transportan la sangre hacia la vena hepática. La zona superior que rodea la vena porta terminal y la arteriola se denomina zona periportal, y la zona que rodea la vena central se denomina zona perivenosa, pericentral o centrilobular. (Jungermann y Kietzmann, 1996).

La función de cada hepatocito está confinada a un gradiente zonal. Los hepatocitos localizados en la periferia están en contacto con la sangre que tiene una mayor concentración de oxígeno, insulina, glucagón y aminoácidos, en esta zona se desarrollan principalmente procesos como gluconeogénesis, síntesis proteica, metabolismo aeróbico, ciclo de la urea y metabolismo de lípidos y colesterol. Por otro lado, la zona pericentral se encarga principalmente de funciones como glucólisis, lipogénesis y biotransformación (citocromo P450, glucuronil transferasas, glutatión s-transferasas y otras enzimas asociadas a biotransformación/desintoxicación) (Cullen y Stalker, 2016).



**FIGURA 2: Zonación metabólica en el acino hepático.**

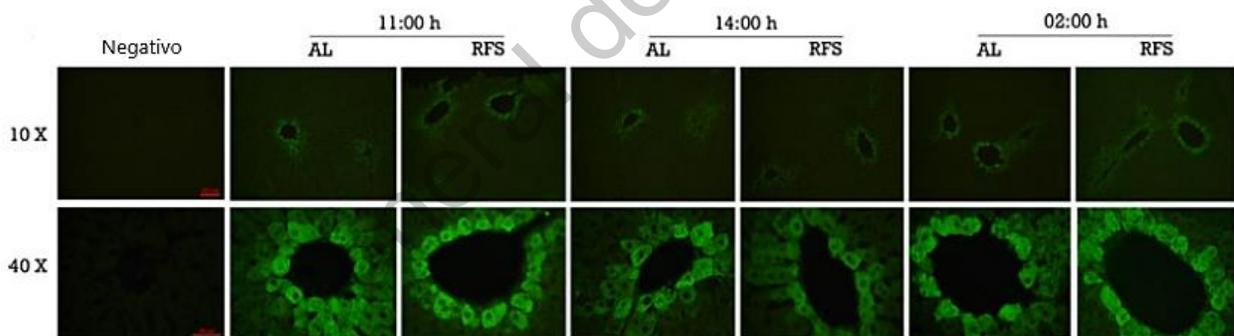
La triada portal se compone de una arteria hepática (roja), una vena portal (azul) y el conducto biliar (verde) localizadas en las esquinas del lóbulo. La sangre es distribuida desde los sinusoides radiales hasta la vena central. Las células del hígado no parenquimatosas (CNP) como las células Kupffer (verde claro), células endoteliales del hígado (azul y rojo) y las células estrelladas (violeta) confieren soporte funcional a los hepatocitos y se extiende por el eje del lóbulo. Los hepatocitos se encargan de secretar la bilis que es distribuida mediante los canales biliares a partir de la región central hacia la región portal. La generación de la función diferencial en diferentes capas está determinada por el flujo

sanguíneo y los morfógenos secretados (Imagen modificada de (Ben-moshe and Itzkovitz, 2019))

### 2.3.3. Glutamina sintetasa

La glutamina sintetasa (GS) es una enzima que se encuentra de manera general en el citoplasma y participa en la en la generación de glutamina a partir de glutamato y amoníaco durante una reacción dependiente de ATP. Particularmente, la GS es alostérica y homooligomérica, está conformada por 8 subunidades (~ 44kDa), su activación está dada por acetoglutarato y se inhibe por distintos aminoácidos como glicina, alanina y glutamina (Vera-Rivera et al., 2013).

La GS se encarga principalmente de procesos metabólicos asociados a nitrógeno en el hígado, además, esta proteína exhibe un patrón de distribución particular en este tejido, ya que se sitúa principalmente en los hepatocitos que rodean la vena central y es utilizada como un marcador para esta zona. Su actividad esta confinada a las necesidades de nutrientes (Vera-Rivera et al., 2013).



**FIGURA 3: Localización inmunohistoquímica de la proteína GS alrededor de las venas centrolobulillares en ratas bajo un régimen de alimentación de libre acceso (AL) y restringido (RFS).**

Señal de inmunofluorescencia de GS en hepatocitos que se distribuyen alrededor de la vena centrolobulillar en animales bajo un régimen de alimentación ad libitum y restricción evaluadas en diferentes periodos de tiempo (11:00, 14:00 y 2:00 horas). En la primera imagen se encuentran los controles negativos (sin anticuerpo) (Vera-Rivera et al., 2013).

## **2.4. Compuestos polifenólicos.**

Los compuestos polifenólicos (CP) son estructuras complejas que se encuentran de forma natural en los tejidos de las plantas. Son el segundo grupo más abundante de compuestos orgánicos en las plantas, que les confiere diversas funciones, como soporte estructural y protección contra estrés biótico y abiótico, patógenos y radiación solar ultravioleta (UV) (Abbas et al., 2017; Rosa et al., 2019).

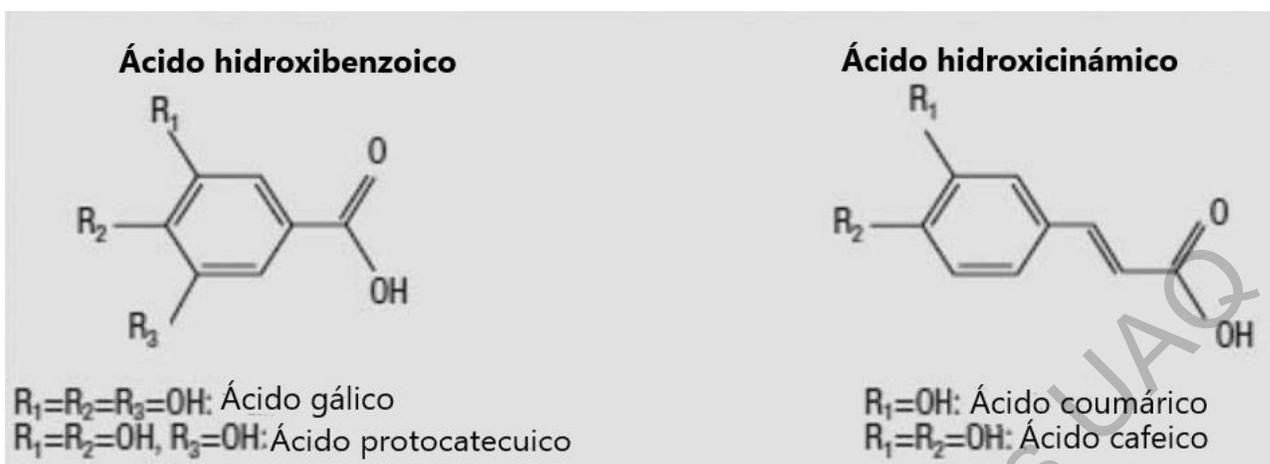
Los CP son metabolitos secundarios que se generan a partir de las vías: ácido shikímico y los poliacetatos, la primera se encarga de sintetizar los aminoácidos aromáticos (tirosina y fenilalanina), ácidos cinámicos y otras estructuras derivadas, tales como fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarias, entre otros.; y la segunda vía sintetiza las quinonas y las xantonas (Quiñones et al., 2012).

### **2.4.1. Estructura y clasificación.**

El elemento principal de los CP es un anillo aromático que contiene uno o varios grupos hidroxilo, y su complejidad comprende desde una molécula fenólica simple hasta un polímero complejo. Su capacidad oxidativa genera una molécula inocua a partir de la donación de un electrón al radical libre (Haminiuk et al., 2012).

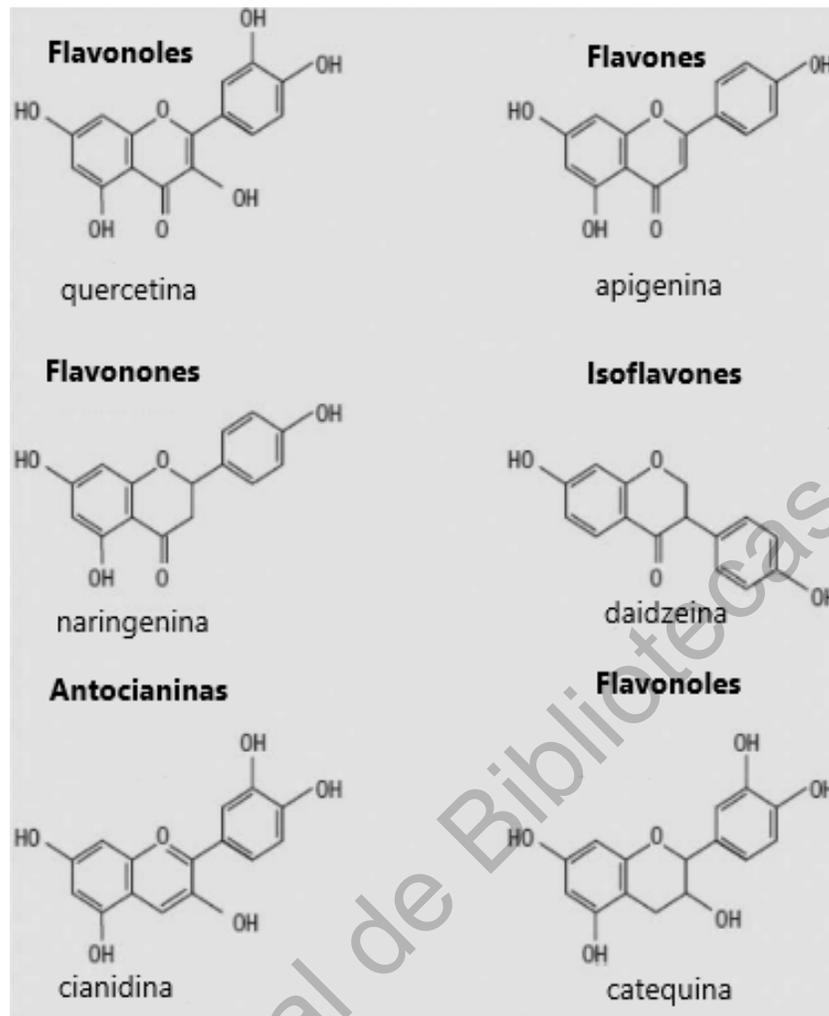
Los CP se clasifican potencialmente en ácidos y alcoholes fenólicos, sin embargo, existen otras clasificaciones que se basan en el número de anillos fenólicos que contiene: ácidos fenólicos, estilbenos, flavonoides, lignanos y taninos (Haminiuk et al., 2012; Abbas et al., 2017).

Los ácidos fenólicos contienen un grupo de ácido carboxílico y se dividen en ácido hidroxibenzoico y ácido hidroxicinámico, se localizan en diversos alimentos como semillas, cáscaras de frutas y hojas de vegetales. Estos compuestos se derivan a partir de la vía del ácido shikímico asociada con la producción de fenilalanina y triptófano a partir de carbohidratos simples (Kumar y Goel, 2019).



**FIGURA 4 Estructura general de los ácidos fenólicos** (Imagen modificada de Abbas et al., 2017).

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular formados por dos anillos de bencenos que pueden unirse a tres anillos de carbono de pirano heterocíclico. Su clasificación depende del estado de oxidación del carbón principal y la posición del anillo B: flavanonas, flavonoles, flavonoles, isofalvonas, flavones y antocianidina. La biosíntesis de los flavonoides subyace en la etapa final de la vía de fenilpropanoide mediante un complejo de enzimas localizado en el citosol (Quiñones et al., 2012; Abbas et al., 2017; Rosa et al., 2019).



**FIGURA 5: Estructura general de los flavonoides** (Imagen modificada de Abbas et al., 2017).

#### 2.4.2. Propiedades e importancia de los compuestos polifenólicos.

Los compuestos polifenólicos son los antioxidantes naturales más utilizados en la dieta humana, y se derivan esencialmente de alimentos como frutas, cereales, verduras y café. El papel que desarrollan estos compuestos es eliminar parcialmente las especies reactivas de oxígeno (ROS), y de esta forma, contrarrestar sus efectos negativos (Ho, 1992; Abbas et al., 2017). Además de las propiedades antioxidantes que contienen los CP, también participan en la regulación de muchos procesos celulares como: la inhibición enzimática, modificaciones en la expresión de genes, fosforilación de proteínas, entre otras. (Ho, 1992).

Numerosos estudios se han enfocado en la asociación entre las propiedades oxidativas, su consumo y su participación en la prevención de diversas enfermedades. Estos fitoquímicos ofrecen grandes ventajas a la salud a través de su consumo regular y biodisponibilidad libre (Haminiuk et al., 2012).

La biodisponibilidad de los CP depende de la cantidad que se digiere, absorbe y metaboliza después de incorporarse al sistema circulatorio, por ello, es de suma importancia cuantificar los polifenoles biodisponibles dentro del alimento para que puedan expresar sus propiedades biológicas (Kumar y Goel, 2019).

#### **2.4.3. La hoja de frijol *Phaseolus vulgaris* como fuente de compuestos polifenólicos.**

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es una de las leguminosas con semilla comestible más utilizadas como fuente de proteínas en regiones de Centroamérica y Sudamérica. De manera convencional, el grano del frijol se consume en muchas partes del mundo, sin embargo, las hojas de la leguminosa son de menor consumo. En estudios previos, se ha determinado que es un alimento rico en fibra, hierro, fósforo, magnesio, zinc y vitaminas (Ulloa et al., 2011; Gamboa-gómez et al., 2015; Martínez-Zavala et al., 2016).

Por otro lado, dentro de los fitoquímicos del frijol, hay componentes activos que confieren ventajas adicionales a las nutricionales, como prevención y tratamiento de enfermedades. Este efecto se ha demostrado en estudios enfocados en obesidad, la administración de ciclos repetitivos de un tratamiento con extracto seco de *Phaseolus vulgaris* en periodos determinados, se ha observado una disminución tanto en las dosis-dependientes de ingesta de alimento como en peso corporal. Otros estudios recientes dilucidan, que la administración de una dieta basada en frijol común (*Phaseolus vulgaris*) en ratones, promueve una reducción significativa en la concentración de leptina plasmática, y así mismo, disminuye el peso corporal (Ulloa et al., 2011; Gamboa-gómez et al., 2015).

Los mecanismos asociados del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) para contrarrestar los efectos de la obesidad son principalmente, inhibir la actividad de  $\alpha$ -amilasa, lo que conlleva una interferencia en la generación de carbohidratos complejos a carbohidratos simples, ergo, reduce las calorías generadas a partir de carbohidratos. Otros mecanismos asociados, es la regulación de la biosíntesis de lípidos e inhibición de apetito, que de igual forma parece mejorar una condición de obesidad (Ulloa et al., 2011).

Los compuestos bioactivos presentes en el frijol que parecen tener un efecto metabólico en humanos son inhibidores enzimáticos, lectinas, fitatos, oligosacáridos y polifenoles. Los compuestos polifenoles identificados en el frijol común *Phaseolus vulgaris* son quercetina, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido p-hidroxibenzoico y ácido vanílico (Ulloa et al., 2011; Martínez-Zavala et al., 2016).

Además de las propiedades que confiere el grano de frijol, estudios recientes han identificado que las hojas del frijol común *Phaseolus vulgaris* como una excelente fuente de hierro, incluso mayor que en los granos (Martínez-Zavala et al., 2016). Sin embargo, son pocos los estudios acerca del efecto que tiene la hoja de frijol. De forma reciente, se evaluó el efecto de su consumo en ratas *Wistar* con dieta obesogénica y restricción alimentaria, observando que su inclusión esta relacionada con la disminución de la concentración del colesterol y triglicéridos en sangre. Del mismo modo, disminuyó la glucosa y el índice de HOMA-IR (resistencia a insulina) en suero (Becerril-Campos et al., 2019).

## **2.5. Efecto de restricción de alimento y hoja de frijol sobre la histología hepática.**

Previamente, el grupo de trabajo analizó los cambios estructurales en el hígado de animales alimentados con dieta estándar e hipercalórica *ad libitum* o restringido por 7 h. Se encontró que los animales sometidos a alimentación estándar, ya sea bajo un régimen *ad libitum* (SAL) o restricción de alimento (SAR) son similares. Sin embargo, cuando los animales se alimentaron con una dieta hipercalórica (OAL), mostraron una mayor presencia de inclusiones microvesiculares en la región centrolobulillar leve.

La restricción temporal de alimento en hígados de animales alimentados con una dieta hipercalórica disminuye la presencia de inclusiones macrovesiculares (50%), pero en este caso la presencia es generalizada. Finalmente, la restricción de alimento suplementada con hoja de frijol disminuye hasta un 75% la inclusión lipídica microvesicular centrolobulillar (datos no publicados). Por lo anterior, se observan varios puntos: una de las zonas más afectadas es la centrolobulillar, además la restricción de alimento suplementado con hoja de frijol disminuye la presencia de vacuolas lipídicas en la misma zona. Debido a estos hallazgos, esta zona es de gran interés para el estudio de las alteraciones metabólicas, o en su defecto, alteraciones en elementos del reloj circadiano como PER2.

### **3. Justificación.**

Los trastornos asociados al metabolismo, como la obesidad, la dislipidemia y el síndrome metabólico asociados a dietas hipercalóricas son un problema de salud pública de importancia en México, que conlleva complicaciones metabólicas severas asociadas a un alto contenido de grasa corporal, y altos niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos en sangre. Los ritmos circadianos están asociados a la regulación de los procesos metabólicos, por lo cual, se han establecido protocolos de restricción del alimento que ayudan a reestablecer la periodicidad del sistema circadiano, y al mismo tiempo, prevenir y mejorar las complicaciones asociadas a enfermedades metabólicas. Igualmente, los compuestos polifenólicos son utilizados por sus propiedades fitoquímicas como un tratamiento para los trastornos asociados al metabolismo. Conocer el efecto protector sumado de la restricción de alimentos y el consumo de compuestos antioxidantes que promueven los ciclos de temporalidad y funcionamiento de los elementos que conforman el sistema circadiano como la proteína reloj PER2, nos confiere un beneficio a través de la generación de nuevo conocimiento que facilite la implementación de nuevas estrategias para disminuir la prevalencia de enfermedades metabólicas en el humano, que generan grandes costos en materia de salud pública.

### **4. Hipótesis**

Si la restricción temporal del alimento, así como los alimentos ricos en antioxidantes regulan el metabolismo, y este a su vez, está comunicado el reloj circadiano, entonces las dietas suplementadas con hoja de frijol (como fuente de antioxidantes) y restringidas temporalmente regulan el sistema circadiano y por consiguiente al metabolismo, lo que disminuye las complicaciones asociadas a obesidad.

### **5. Objetivos**

#### **5.1. Objetivo general**

Evaluar la presencia de una proteína reloj en la zona centrolobulillar del hígado de animales sometidos a restricción de alimento suplementado con hoja de frijol.

## 5.2 Objetivo particular

- Cuantificar la presencia de la proteína reloj PER2 en el citosol y núcleo de los hepatocitos centrolobulillares en hígado de animales sometidos a restricción de alimento suplementado con hoja de frijol.

## 6. Materiales y métodos

### 6.1. Diseño experimental.

En este estudio, se ocuparon 48 ratas macho *Wistar* con un peso inicial de  $180 \pm 20$  g. Las ratas se sometieron a un proceso de acondicionamiento durante una semana en el bioterio, y la semana siguiente, a una dieta hipercalórica (fructosa 40% y manteca 40 %). Posteriormente, un grupo de ratas fue alimentado con dieta normal y otro grupo de ratas fue alimentado con la dieta hipercalórica (a estos animales de aquí en adelante se les denominará como “obesos”) durante 8 semanas.

Se obtuvieron 6 grupos: dieta normal con alimentación *ad libitum* (SAL), dieta alta en grasa/fructosa con alimentación *ad libitum* (OAL), dieta normal con alimentación restringida (SAR), dieta alta en grasa/fructosa con alimentación restringida (OAR), dieta normal con alimentación restringida suplementado con hoja de frijol (SARF) y dieta alta en grasa/fructosa con alimentación restringida suplementado con hoja de frijol (OARF). Las ratas fueron sacrificadas después de la ingestión del alimento.

El procedimiento de restricción de alimento se realizó en un periodo de 7 horas (entre ZT4 y ZT11), después del encendido de la luz (11-18 h). Este modelo de restricción se ha comprobado en la misma especie de ratas, con la finalidad de sincronizar el reloj molecular y el metabolismo del hígado. El proceso de restricción se desarrolló durante las fases de luz para evadir falsos positivos de los hábitos nocturnos presentados en estos animales.

### 6.2. Sincronización por restricción de alimento.

El acceso al alimento fue en un horario de 11 a 18 h (7 h) durante la fase de luz, los cuales se mantuvieron en periodos de luz y oscuridad (12:12, fase de luz 7 a 19 h). Los animales estuvieron durante dos semanas en un periodo de adaptación con agua y alimento *ad*

*libitum*, posteriormente se llevó a cabo la restricción de alimento donde se administró la dieta hipercalórica durante 8 semanas; para la restricción temporal se ajustó a un periodo de 7 h durante 8 semanas.

### **6.3. Dietas.**

La dieta estándar administrada fue LabDiet 5001, la dieta hipercalórica fue alimento LabDiet 5001 con fructosa (20%), grasa (20% manteca de cerdo y 0.15 % de colato de sodio. La dieta fue suplementada con caseína.

En la dieta suplementada con hoja de frijol, se administró 10% de hoja de frijol, previamente secada en sombra y pulverizada, ya sea en la dieta estándar o la dieta hipercalórica.

### **6.4. Inmunohistoquímica**

El hígado se fijó en formalina al 10% a 4°C durante una semana con cambios cada dos días. Después el tejido se embebió en parafina y se cortó a un grosor de 7 µm. Cada pieza del tejido seleccionada se desparafinó durante 2 h a 60°C en un horno de calor seco y después se rehidrataron en un tren de alcoholes: xilol al 100% por 10 min, etanol al 100% por 5 min, etanol al 10% por 5 min, etanol al 80% por 5 min y agua desionizada por 10 min. Acto seguido, las rebanadas del tejido se bañaron en un tampón de permeabilización (citrato de sodio 3,9 mM, Tween 20 al 0,1%) durante 8 min y finalmente se pusieron a hervir en un tampón de EDTA (EDTA 1 mM, Tween 20 al 0,05%, pH 8,0) a 96°C durante 1 hora como exposición a epítopes.

Posteriormente, se realizó un bloqueo con leche descremada al 1% durante 1 hora y se incubaron toda la noche con el anticuerpo primario mouse anti-glutamine synthetase (GS) en una dilución 1:300 (MAB302, Millipore Corporation, Billerica, MA, EE. UU.). Al día siguiente, los tejidos se lavaron tres veces con un tapón de TBST, luego se incubaron durante 8 horas con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 594 donkey anti-mouse IgG (Invitrogen Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) en una dilución 1:500. A continuación, cada tejido se bloqueó nuevamente con leche descremada al 1% durante 1 h, se lavaron tres veces más con TBST, y se incubaron con el segundo anticuerpo primario rabbit anti PER2 antibody (ab214209) a una dilución 1: 100 durante toda la noche a 4 °C.

Acto seguido, cada tejido se incubó 2 h con el segundo anticuerpo secundario donkey anti-rabbit IgG (A21206) (Invitrogen, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, EU) a una dilución 1:300. La fluorescencia se observó con epi-fluorescencia (Nikon Eclipse E600, Minato, Japón) y microscopía confocal (Zeiss Axiovert 200 LSM 510 Meta-Multiphotonic, Oberkochen, Alemania) y se realizó la cuantificación con el programa Image Pro-plus.

Una vez que se realizaron las inmunohistoquímicas, se capturaron las imágenes en un microscopio, se consideró que la señal de GS se observó a 594 nm y la de PER2 a 488 nm. Primero se colocó la laminilla y se observó la señal de GS (rojo) con objetivo de 10X, y luego se continuó con el objetivo de 40%, después, se cambió el filtro para observar la señal de PER2 (verde) con 10X y 40X, finalmente, se observó la señal de DAPI (núcleos) y se hizo la unión de las imágenes tomadas previamente. Este procedimiento se realizó por cada corte/ por laminilla y se almacenaron las imágenes a color y monocromático. Por otro lado, la cuantificación se realizó en imágenes monocromáticas (escala de grises) y se colocó un macro de un área determinada sobre los hepatocitos totales (núcleo y citoplasma), o en su caso, los núcleos. Una vez que se obtuvieron los datos de la intensidad y área, se hizo un promedio. Finalmente, se sustrajo la señal de las laminillas negativas para eliminar la señal inespecífica del anticuerpo secundario.

### **6.5. Análisis estadísticos**

Se realizó un análisis estadístico de los datos generados en la cuantificación en Windows-based Statistical Package for Social Sciences (SPSS) (Versión 16.0, Chicago, IL). Los datos se expresaron como media  $\pm$  DE. Las comparaciones entre los grupos se realizaron con ANOVA, y posteriormente de la una prueba de Tukey. El valor  $p \leq 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

### **7. Resultados.**

El efecto protector que confiere la restricción temporal del alimento y la hoja de frijol se continúa estudiando, el tema central de este estudio fue evaluar las modificaciones que tiene el sistema circadiano con respecto a los diferentes tratamientos utilizados. Para ello, se tomó un punto temporal, posterior al acceso de alimento y se cuantificó la presencia de la proteína

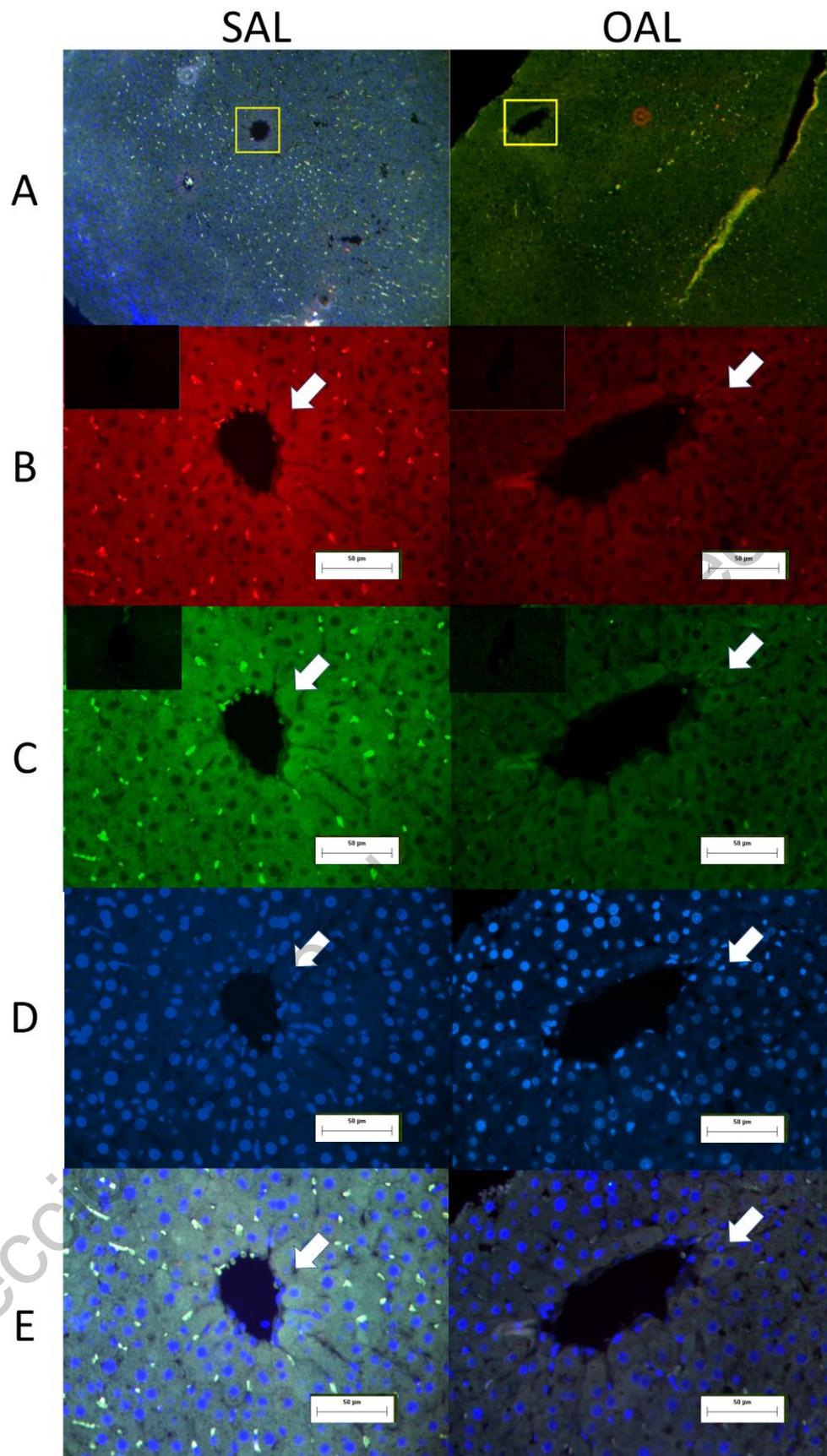
reloj PER2 en la zona centrolobulillar del hígado, ya que anteriormente se ha reportado que es una región vulnerable a cambios metabólicos.

### **7.1. Distribución de la proteína reloj PER2 en los hepatocitos de la zona centrolobulillares de animales sometidos a diferentes dietas.**

En el presente estudio, se evaluó el efecto de la restricción de alimento suplementada con hoja de frijol sobre la presencia de la proteína reloj PER2 en hepatocitos centrolobulillares de ratas macho *Wistar* (~200g) de seis semanas de edad. Se obtuvieron dos grupos de ratas a través de un periodo de acondicionamiento previo, el primer grupo fue alimentado con una dieta estándar (LabDiet 5001) (S) y el segundo grupo fue alimentado con una dieta hipercalórica (fructosa 20% y manteca de cerdo 20 %) (O). A continuación, se utilizaron tres protocolos de alimentación que fueron implementados simultáneamente para los dos grupos: 1) *ad libitum* (libre acceso) (AL), 2) restricción de alimento (AR) y 3) restricción de alimento suplementado con hoja de frijol (F).

Posteriormente, se obtuvieron muestras de hígado para la realizar una doble inmunohistoquímica con un anticuerpo específico para el reconocimiento de glutamina sintetasa (GS) que identifica hepatocitos de la zona de interés (centrolobulillares) y un anticuerpo específico que reconoce la proteína reloj PER2 (revisar materiales y métodos).

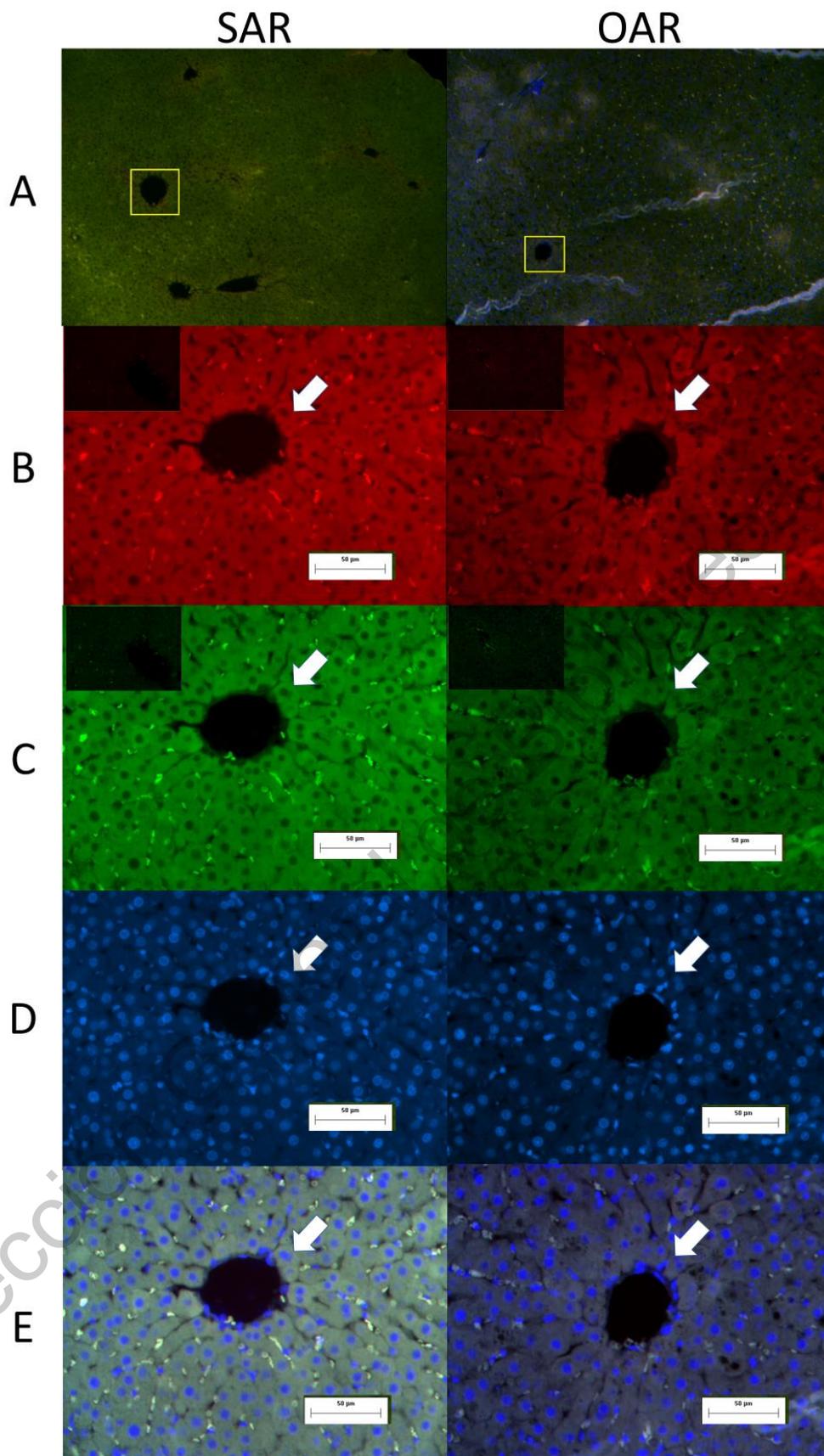
Nuestros resultados revelan que la presencia de la proteína reloj PER2 total no cambia en los hepatocitos centrolobulillares de animales alimentados con dieta estándar (SAL) y dieta hipercalórica (OAL) bajo un régimen *ad libitum*. Sin embargo, la presencia de la proteína disminuye un 22% en el núcleo de los hepatocitos centrolobulillares del grupo OAL (Figura 9). Además, se encontraron diferencias histológicas marcadas: el hígado del grupo SAL presenta núcleos homogéneos y una población celular definida. Por el contrario, el hígado del grupo OAL presenta modificaciones estructurales en el núcleo e inclusiones lipídicas vesiculares (puntos negros) (Figura 6). Por otra parte, se encontró que la presencia de la proteína reloj PER2 total (núcleo y citoplasma) no disminuye en los hepatocitos centrolobulillares de animales con dieta hipercalórica bajo un régimen de restricción (OAR), pero si aumenta un 40% su presencia en núcleos de los hepatocitos en la misma condición (Figura 7 y 9).



**FIGURA 6: Colocalización de la proteína reloj PER2 y GS en muestras histológicas de hígado de ratas bajo el protocolo ad libitum (SAL/OAL).**

alimento (SAL y OAL). Las imágenes se capturaron en dos aumentos (A) 10X y 40X (barra de calibración blanca = 50  $\mu$ m) de los hepatocitos (flechas) alrededor de la vena central (cuadro amarillo) en la zona centrolobulillar del hígado. Los controles negativos (sin anticuerpo primario) se colocaron en la parte superior izquierda de las imágenes con aumento.

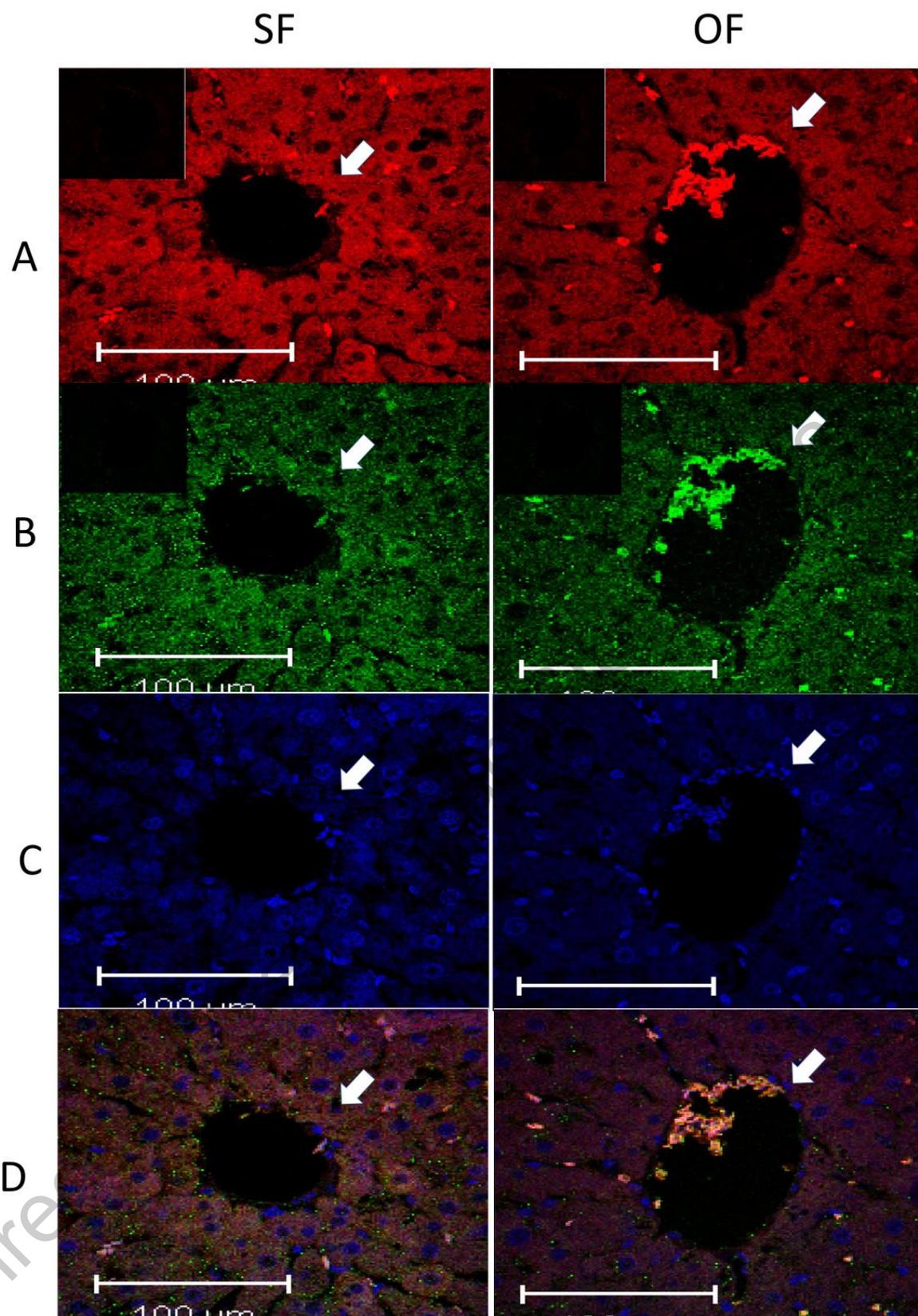
Dirección General de Bibliotecas UAQ



**FIGURA 7: Colocalización de la proteína reloj PER2 y GS en muestras histológicas de hígado de ratas bajo el protocolo de restricción temporal de alimento (SAR/OAR).**

Señal de inmunofluorescencia para (B) la GS (rojo), (C) PER2 (verde), (D) DAPI (azul) y (E) unión en dos condiciones metabólicas distintas con alimentación bajo el protocolo de restricción temporal de alimento (SAR y OAR). Las imágenes se capturaron en dos aumentos (A) 10X y 40X (barra de calibración blanca = 50  $\mu$ m) de los hepatocitos (flechas) alrededor de la vena central (cuadro amarillo) en la zona centrolobulillar del hígado. Los controles negativos (sin anticuerpo primario) se colocaron en la parte superior izquierda de las imágenes con aumento.

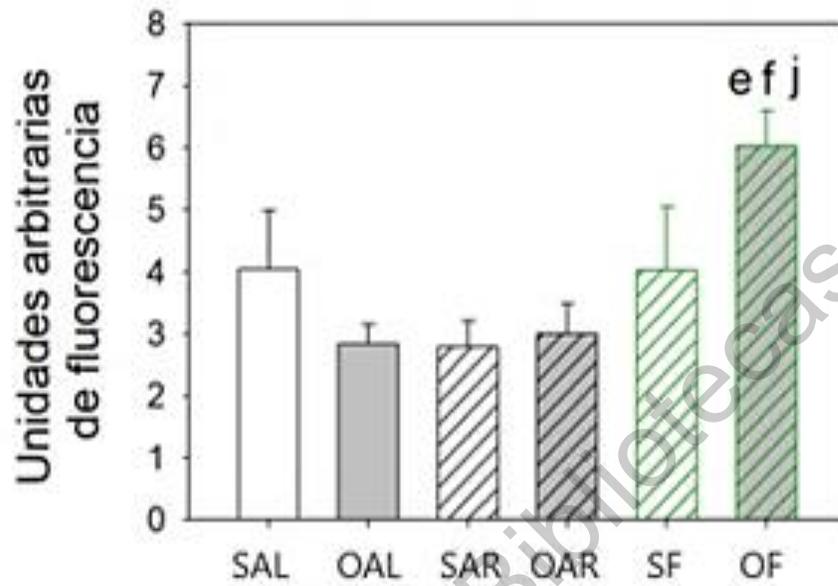
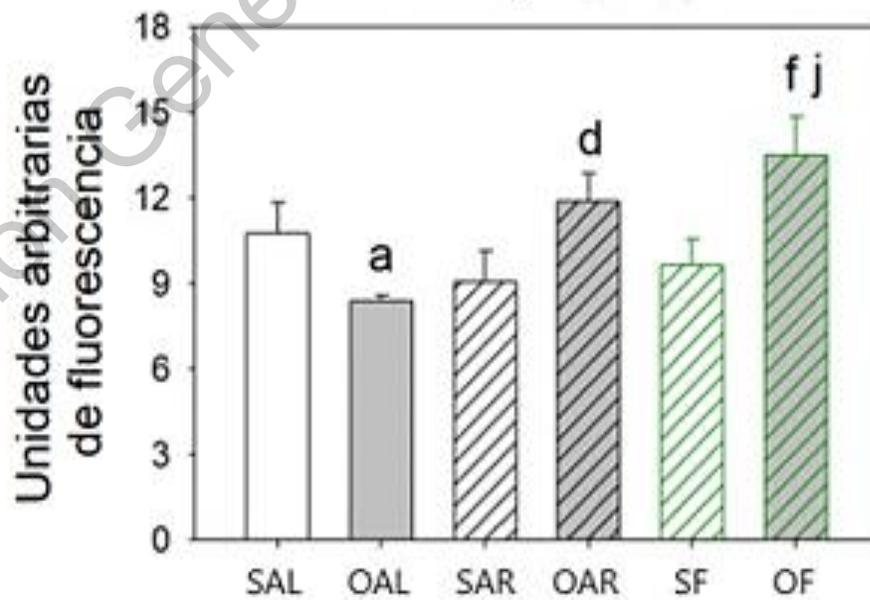
Finalmente, se observó el efecto de la restricción suplementada con hoja de frijol en animales alimentados con dieta hipercalórica (OF), ya que la presencia de la proteína reloj PER2 aumentó en hepatocitos totales (114%) y en núcleo (61%) (Figura 9 y Tabla 1). Además, se encontró una menor proporción de inclusiones lipídicas vesiculares en el hígado del grupo OF.



**FIGURA 8:** Colocalización de la proteína reloj PER2 y GS en muestras histológicas de hígado de ratas bajo el protocolo de restricción temporal de alimento y una dieta suplementada con hoja de frijol (SF/OF).

Señal de inmunofluorescencia para la (A) GS (rojo), (B) PER2 (verde), (C) DAPI (azul) y (D) unión en dos condiciones metabólicas distintas con alimentación bajo el protocolo de restricción temporal de alimento (SAR y OAR). Vista ampliada (40X) (barra de calibración blanca = 100  $\mu\text{m}$ ) de los hepatocitos (flechas) alrededor de la vena central (cuadro amarillo) en la zona centrolobulillar del hígado. Los controles negativos (sin anticuerpo primario) se colocaron en la parte superior izquierda de las imágenes con aumento.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

**A****Proteína reloj PER2 total****B****Proteína reloj PER2 nuclear**

**FIGURA 9: Cuantificación de la presencia de la proteína reloj PER2 total y nuclear en los hepatocitos centrolobulillares de animales sometidos a diferentes protocolos de alimentación.**

Para evaluar la presencia de PER2 total (A) y nuclear (B) en los hepatocitos que rodean la vena central de animales con dieta estándar en los tres protocolos establecidos (SAL, SAR, SF) y con dieta hipercalórica en los tres protocolos establecidos (OAL, SAL, OF) (eje de abscisas), se midió la intensidad de señal en términos de unidades arbitrarias de fluorescencia. (eje de ordenadas). (n=3, ANOVA de 1 vía,  $p \leq 0.05$ ).

Dirección General de Bibliotecas UAO

**A PER2 Total**

		N	Subset for alpha = 0.05	
Grupo			1	2
Tukey HSD <sup>a,b</sup>	SAR	8	2.7937	
	OAL	8	2.8313	
	OAR	8	3.0000	
	SFR	8	4.0350	4.0350
	SAL	5	4.0400	4.0400
	OFR	8		6.0363
	Sig.			.772

**B PER2 Nuclear**

		N	Subset for alpha = 0.05	
Grupo			1	2
Tukey HSD <sup>a,b</sup>	OAL	8	8.4125	
	SAR	8	9.0775	
	SFR	8	9.6375	9.6375
	SAL	5	10.7780	10.7780
	OAR	8	11.8625	11.8625
	OFR	8		13.5000
	Sig.			.190

**Tabla 1: Resultados del análisis estadístico. ANOVA de 1 vía, prueba Post hoc Tukey.**

Las diferencias estadísticas se determinaron mediante el programa SPSS. (A) PER2 total y (B) PER2 de núcleo. Los grupos se compararon de la siguiente manera. a) SAL/OAL, b) SAR/OAR, c) SF/OF, d) OAL/OAR, e) OAR/OF, f) OAL/OF, g) SAL/SAR, h) SAR, i) SAL/SF.

## 8. Discusión.

Antes de abordar la discusión sobre el efecto de las dietas hipercalóricas, la restricción temporal del alimento y la hoja de frijol se debe considerar que el presente trabajo se enfoca solo en la cuantificación de una proteína reloj en un punto temporal, por lo cual, no es un estudio circadiano, ya que el desarrollo de estos estudios abarca periodos temporales de al menos 24 h. Además, cabe destacar que se utilizó como referencia anatómica la zona centrilobular del hígado porque se ha demostrado anteriormente que presenta cambios marcados por la restricción temporal del alimento y la hoja de frijol (datos no publicados).

### 8.1. La dieta hipercalórica disminuye la presencia de la proteína reloj PER2.

La composición de los alimentos juega un papel fundamental en el sistema circadiano central y periférico (Sinturel et al., 2020). Los ratones son alimentados con dietas hipercalóricas *ad libitum* exhiben una condición similar a la obesidad en humanos (obesidad, esteatosis hepática y resistencia a insulina), por ende, un patrón de alteración metabólica (Soontornniyomkij et al., 2016). En adición, se encontró que las ratas alimentadas con una dieta alta en fructosa y grasa muestran intolerancia a la insulina, dislipidemia, y proteínas asociadas a estrés en el páncreas (Balakumar et al., 2016).

Los animales que son alimentados con una dieta hipercalórica de libre acceso se ha demostrado que presentan un patrón metabólico alterado, y por consiguiente, una expresión alterada a nivel de genes y proteínas del reloj circadiano en hígado (Hatori et al., 2012), así como, cambios en los patrones de las acrofases de los genes del reloj central (Sinturel et al., 2020).

El diseño de este estudio no estuvo dirigido a observar los cambios en el ritmo de la proteína reloj PER2; sin embargo, a pesar de que se evaluó su presencia en un punto temporal, se logró observar que disminuyó (22%) su presencia nuclear de los hepatocitos centrolobulillares del grupo OAL (Figura 6 y 9). Por otra parte, se encontraron modificaciones histológicas en el hígado de OAL como la presencia de inclusiones lipídicas vesiculares y una morfología celular irregular, lo que demuestra una alteración en el estado metabólico de estos animales, ya que como se ha mencionado anteriormente, el hígado es el principal órgano metabólicamente activo (Hatori et al., 2012).

En conjunto, estos resultados demuestran que la dieta hipercalórica conduce a una condición irregular en el metabolismo del hígado y por consiguiente un efecto en la presencia de la proteína reloj PER2 en este órgano.

## **8.2. La restricción temporal de alimento incrementa la presencia de la proteína reloj PER2.**

En un contexto fisiológico, los ciclos de actividad y la ingestión de los alimentos coinciden (75-80% en roedores), por lo que el periodo de alimentación actúa como un sincronizador importante en los órganos que están asociados al metabolismo. En eventos como la restricción temporal de alimentos, los roedores con mayor actividad nocturna que son alimentados durante la fase de luz se han observado que existe un desfase en las proteínas reloj del hígado en contraste con las que operan en el NSQ (Sinturel et al., 2020).

En la actualidad, los protocolos experimentales de restricción de alimento son ampliamente utilizados en animales para conocer las adaptaciones de los ritmos circadianos a un punto temporal de ingestión de alimento, independientemente de los ritmos establecidos por el marcapasos central que responde a la luz (NSQ) (Del ta-Pérez y Díaz-Muñoz, 2017). Este protocolo establece un periodo temporal (2 a 4 h diarias) de acceso a los alimentos constante que conduce a fluctuaciones marcadas a nivel metabólico, molecular, fisiológico y conductual. La actividad anticipatoria (AAA), previamente descrita, es asociada a los cambios subyacentes de esta condición y se conoce que es regulada principalmente por OSA (Vera-Rivera et al., 2013).

Los ciclos de ayuno y alimentación desencadenan vías de señalización que regulan la expresión de los genes reloj; en el ayuno, AMPK se encarga de fosforilar un represor del gen reloj *Cry*, para dirigir su degradación y evitar la represión de sus genes diana (*Clock/Bmal1*). En la alimentación, la expresión de *Per2* es regulada de forma indirecta por mTOR (Giebultowicz y Kapahi, 2010). En un contexto de restricción de alimentos, se ha observado que la restricción mejora las oscilaciones en los genes del reloj circadiano en el hígado de animales sometidos a una alimentación hipercalórica (Hatori et al., 2012; Jang et al., 2012; Sinturel et al., 2020).

Nuestros hallazgos revelan un incremento del 40% en la presencia de la proteína reloj PER2 nuclear de los hepatocitos de la zona centrolobulillar del hígado en las ratas OAR

(Figura 9), lo que sugiere que la restricción de alimento reestablece su presencia, y su actividad en una condición donde el metabolismo se encuentra alterado, ya que como se menciona previamente, la actividad de esta proteína se encuentra en el núcleo (Panda, 2016).

Además, se observó que el grupo OAR presentó una apariencia histológica mejorada en contraste con el grupo OAL, ya que presentó una menor proporción de inclusiones lipídicas vesiculares y una población celular en mejor estado, esto sugiere que la restricción de alimento tiene un efecto protector en ratas que tienen una alteración metabólica como un resultado de la dieta hipercalórica. Sin embargo, en este estudio solo se evaluó un punto temporal previo al acceso de alimento (donde se sabe que mantiene su acrofase), por lo que nuestros resultados no se pueden comparar con estudios anteriores.

### **8.3 La restricción temporal de alimento suplementado con hoja de frijol aumenta la presencia de la proteína reloj PER2.**

Los resultados de este estudio demuestran un aumento en la presencia de la proteína nuclear (61%) y total (114%) en los hepatocitos centrolobulillares del grupo OF, lo que sugiere que el efecto de la restricción de alimento en una dieta suplementada con una fuente de compuestos polifenoles (hoja de frijol), reestablece la presencia de la proteína en la zona centrilobular en un punto temporal. En adición, se encontró una proporción menor de inclusiones lipídicas vesiculares y una población celular uniforme (Figura 8 y 9).

De forma general, los compuestos bioactivos derivados de las plantas como los compuestos polifenólicos (CP) participan en la modulación de la actividad de diversas enzimas, así mismo, intervienen en mecanismos asociados a señalización celular. Las propiedades antioxidantes que contienen estos compuestos les permiten contribuir en diversas reacciones de óxido-reducción asociadas al metabolismo celular (Quiñones et al., 2012; Abbas et al., 2017). En estudios previos, se ha demostrado que estos compuestos revierten las complicaciones asociadas a enfermedades cardiovasculares, osteoporosis, diabetes mellitus, cáncer y obesidad (Ike y Obori, 2008; Abbas et al., 2017).

Así mismo, se ha logrado demostrar que los CP pueden restablecer la amplitud y aumentar la duración del periodo de las proteínas reloj (Ike and Obori, 2008). Shinozaki et. al 2017 probaron que la exposición constante de CP (flavonoides) en cultivos embrionarios de

ratones produjo un retraso en la fase del ritmo de la proteína PER2, además, la aplicación transitoria de otros polifenoles (nobiletina y tangeretina) aumentó la amplitud y periodo de la fase rítmica de la proteína PER2 (Shinozaki et al., 2017). En otro estudio, se observó que un polifenol (resveratrol) regulaba la expresión de los genes reloj *Per1*, *Per2* y *Bmal1* en ratas con alimentación alta en grasas (Ike y Obori, 2008).

## 9. Conclusiones.

9.1. La dieta hipercalórica bajo un régimen de libre acceso al alimento (OAL) disminuyó (22%) la presencia de la proteína reloj PER2 nuclear en los hepatocitos centrolobulillares del hígado, además, se observaron irregularidades en la histología hepática y una mayor presencia de inclusiones lipídicas vesiculares.

9.2. La restricción del alimento en animales alimentados con una dieta hipercalórica (SAR) aumentó la presencia (40%) de la proteína reloj PER2 nuclear en los hepatocitos centrolobulillares del hígado, no obstante, se encontró una menor proporción de inclusiones lipídicas vesiculares.

9.3 La restricción del alimento en una dieta suplementada con hoja de frijol aumentó significativamente la presencia de la proteína reloj PER2 total (114%) y nuclear (61%) en los hepatocitos centrolobulillares de ratas alimentadas con una dieta hipercalórica (OF). Además, se encontró una apariencia histológica más homogénea y mejorada en contraste con el grupo OAL, además, se encontró una menor proporción de inclusiones lipídicas vesiculares.

9.4. En este estudio se muestra una primera aproximación (un punto temporal) de la asociación entre el contenido dietético (compuestos polifenólicos), la restricción temporal de la ingestión de los alimentos, las alteraciones metabólicas asociadas a una dieta hipercalórica y una proteína del reloj circadiano. Sin embargo, para estudios futuros es necesario evaluar los periodos y frecuencias de la proteína reloj PER2 lo largo del día bajo estas condiciones.

## 10. Referencias

1. Abbas, M., F. Saeed, F. M. Anjum, M. Afzaal, T. Tufail, M. S. Bashir, A. Ishtiaq, S. Hussain, and H. A. R. Suleria. 2017. Natural polyphenols: An overview. *Int. J. Food Prop.* 20:1689–1699. doi:10.1080/10942912.2016.1220393. Available from: <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1220393>
2. Bae, S., M. Z. Fang, V. Rustgi, and H. Zarbl. 2019. At the Interface of Lifestyle , Behavior , and Circadian Rhythms : Metabolic Implications. *Front. Nutr.* 6:2–17. doi:10.3389/fnut.2019.00132.
3. Balakumar, M., L. Raji, D. Prabhu, C. Sathishkumar, P. Prabu, V. Mohan, and M. Balasubramanyam. 2016. High-fructose diet is as detrimental as high-fat diet in the induction of insulin resistance and diabetes mediated by hepatic/pancreatic endoplasmic reticulum (ER) stress. *Mol. Cell. Biochem.* 423:93–104. doi:10.1007/s11010-016-2828-5.
4. Bass, J., and J. S. Takahashi. 2010. Circadian integration of metabolism and energetics. *Science (80- )*. 330:1349–1354. doi:10.1126/science.1195027.
5. Ben-moshe, S., and S. Itzkovitz. 2019. mammalian liver. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 16:395–410. doi:10.1038/s41575-019-0134-x. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41575-019-0134-x>
6. A. Becerril-Campos, A. Luna-Moreno, S. Wischin-Fuentes, T. García-Gasca, and S. Ahumada Solórzano, “Prevención del riesgo metabólico en un modelo in vivo, con el consumo de quinoa roja y hoja de frijol,” *Rev. la Conf. Científica Anu. sobre Síndrome Metabólico*, vol. 4, no. 1, pp. 38–40, 2017.
7. Blancas-Velazquez, A., S. E. la Fleur, and J. Mendoza. 2017. Effects of a free-choice high-fat high-sugar diet on brain PER2 and BMAL1 protein expression in mice. *Appetite.* 117:263–269. doi:10.1016/j.appet.2017.07.002. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.appet.2017.07.002>
8. Blancas-velazquez, A., J. Mendoza, and A. N. Garcia. 2017. Diet-Induced Obesity and Circadian Disruption of Feeding Behavior. *Front. Neurosci.* 11:1–11. doi:10.3389/fnins.2017.00023.
9. Buhr, E., and J. S. Takahashi. 2014. Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends Cell Biol.* 217:3–27. doi:10.1016/j.tcb.2013.07.002.

10. Challet, E. 2019. The circadian regulation of food intake. *Nat. Rev. Endocrinol.* 15:393–405. doi:10.1038/s41574-019-0210-x. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41574-019-0210-x>
11. Cullen, J. M., and M. J. Stalker. 2016. Liver and Biliary System.
12. Dibner, C., and U. Schibler. 2015. Circadian timing of metabolism in animal models and humans. *J. Intern. Med.* 277:513–527. doi:10.1111/joim.12347.
13. Engin, A. 2017. Circadian Rhythms in Diet-Induced Obesity. 950: 19-52 Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-48382-5>
14. Ferrell, J. M., and J. Y. L. Chiang. 2015. Circadian rhythms in liver metabolism and disease. *Acta Pharm. Sin. B.* 5:113–122. doi:10.1016/j.apsb.2015.01.003. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2015.01.003>
15. Fontelles, C. C., L. N. Guido, M. P. Rosim, F. D. O. Andrade, L. Jin, J. Inchauspe, V. C. Pires, I. A. De Castro, L. Hilakivi-clarke, S. De Assis, and T. P. Ong. 2016. Paternal programming of breast cancer risk in daughters in a rat model : opposing effects of animal- and plant-based high-fat diets. *Breast Cancer Res.* 18:1–13. doi:10.1186/s13058-016-0729-x. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13058-016-0729-x>
16. Gamboa-gómez, C. I., N. E. Rocha-guzmán, J. A. Gallegos-infante, M. R. Moreno-jiménez, B. D. Vázquez-cabral, R. F. González-laredo, I. T. De Durango, and F. P. Ote. 2015. Plants with potential use on obesity and its complications. *EXCLI J.* 14:809–831.
17. Geets, E., M. E. C. Meuwissen, and W. Van Hul. 2019. Clinical, molecular genetics and therapeutic aspects of syndromic obesity. *Clin. Genet.* 95:23–40. doi:10.1111/cge.13367.
18. Giebultowicz, J., and P. Kapahi. 2010. Circadian Clocks and Metabolism : The Nutrient-Sensing AKT and TOR Pathways Make the Link. *Curr. Biol.* 20:R608–R609. doi:10.1016/j.cub.2010.05.052. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2010.05.052>
19. Green, C. B., J. S. Takahashi, and J. Bass. 2008. The Meter of Metabolism. *Cell.* 134:728–742. doi:10.1016/j.cell.2008.08.022.
20. Gual-grau, A., M. Guirro, J. Mayneris-perxachs, L. Arola, and N. Boqué. 2019. ScienceDirect Impact of different hypercaloric diets on obesity features in rats : a metagenomics and metabolomics integrative approach ☆. *J. Nutr. Biochem.*

- 71:122–131. doi:10.1016/j.jnutbio.2019.06.005. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.06.005>
21. Haminiuk, C. W. I., G. M. Maciel, M. S. V Plata-oviedo, and R. M. Peralta. 2012. Invited review Phenolic compounds in fruits – an overview. 47:2023–2044. doi:10.1111/j.1365-2621.2012.03067.x.
22. Hasakova, K., R. Reis, M. Vician, M. Zeman, and I. Herichova. 2019. Expression of miR-34a-5p is up-regulated in human colorectal cancer and correlates with survival and clock gene PER2 expression. PLoS One. 14:e0224396. doi:10.1371/journal.pone.0224396.
23. Hatori, M., C. Vollmers, A. Zarrinpar, L. DiTacchio, and E. Bushong. 2012. Time restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high fat diet. Cell Metab. 15:848–860. doi:10.1016/j.cmet.2012.04.019.Time.
24. Ho, C. 1992. Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health. Am. Chem. Soc. 2–7.
25. Hruby, A., and F. B. Hu. 2016. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. Pharmoeconomics. 33:673–689. doi:10.1007/s40273-014-0243-x.The.
26. Ike, H. O., and M. K. Obori. 2008. Resveratrol Regulates Circadian Clock Genes in Rat-1 Fibroblast Cells. Biosci Biotechnol Biochem. 72:3038–3040. doi:10.1271/bbb.80426.
27. Jang, H., G. Lee, J. Kong, G. Choi, Y. J. Park, and J. B. Kim. 2012. Feeding Period Restriction Alters the Expression of Peripheral Circadian Rhythm Genes without Changing Body Weight in Mice. PLoS One. 7:1–7. doi:10.1371/journal.pone.0049993.
28. Jungermann, K., and T. Kietzmann. 1996. ZONATION OF PARENCHYMAL AND NONPARENCHYMAL. 179–203.
29. Kumar, N., and N. Goel. 2019. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. Biotechnol. Reports. 24:e00370. doi:10.1016/j.btre.2019.e00370. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00370>
30. Laposky AD, Bradley MA, Williams DL, Bass J, Turek FW. 2008. Sleep-wake regulation is altered in leptin-resistant (db/db) genetically obese and diabetic mice. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 295(6): R2059–R2066.

31. Lee Edward B., Mattson Mark P. (2014). The Neuropathology of Obesity: Insights from Human Disease. *Acta Neuropathol.* January ; 127(1): doi:10.1007/s00401-013-1190-x.
32. Martínez-Zavala, M., M. A. Mora-Avilés, M. A. Anaya-Loyola, H. Guzmán-Maldonado, A. Aguilera-Barreyro, A. Blanco-Labra, and T. García-Gasca. 2016. Common Bean Leaves as a Source of Dietary Iron: Functional Test in an Iron-Deficient Rat Model. *Plant Foods Hum. Nutr.* 71:259–264. doi:10.1007/s11130-016-0554-5.
33. Panda, S. 2016. Circadian physiology of metabolism. *Science* (80-. ). 354:1008–1015. doi:10.1126/science.aah4967.
34. Pinheiro-castro, N., L. Beatriz, A. Ribeiro, G. M. Novaes, and T. P. Ong. 2019. Hypercaloric Diet-Induced Obesity and Obesity-Related Metabolic Disorders in Experimental Models. *Rev. Biomark. Stud. Metab. Metab. Disord.* 1134:149–161. doi:10.1007/978-3-030-12668-1.
35. Poggiogalle, E., H. Jamshed, and C. M. Peterson. 2017. Circadian Regulation of Glucose, Lipid, and Energy Metabolism in Humans. *Physiol. Behav.* 84:11–27. doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.040.
36. Quiñones, M., M. Miguel, and A. Aleixandre. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular THE POLYPHENOLS, NATURALLY OCCURRING COMPOUNDS WITH BENEFICIAL EFFECTS ON CARDIOVASCULAR DISEASE. *Nutr. Hosp.* 27:76–89. doi:10.3305/nh.2012.27.1.5418.
37. Rosa, L. A. De, J. O. Moreno-escamilla, J. Rodrigo-garcía, and E. Alvarez-parrilla. 2019. Phenolic Compounds. Elsevier Inc. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00012-9>
38. Shinozaki, A., K. Misawa, Y. Ikeda, A. Haraguchi, and M. Kamagata. 2017. Potent Effects of Flavonoid Nobiletin on Amplitude , Period , and Phase of the Circadian Clock Rhythm in PER2 :: LUCIFERASE Mouse Embryonic Fibroblasts. *PLoS One.* 12:1–17. doi:10.1371/journal.pone.0170904.
39. Sinturel, F., V. Petrenko, and C. Dibner. 2020. Circadian clocks make metabolism run. *J. Mol. Biol.* 1–40. doi:10.1016/j.jmb.2020.01.018.  
Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.01.018>
40. Soontornniyomkij, V., J. P. Kesby, B. Soontornniyomkij, J. J. Kim, T. Kisseleva, C.

- L. Achim, S. Semenova, and D. V. Jeste. 2016. Age and High-Fat Diet Effects on Glutamine Synthetase Immunoreactivity in Liver and Hippocampus and Recognition Memory in Mice. *Curr. Aging Sci.* 9:301–309. doi:10.2174/1874609809666160413113311.
41. Del ta-Pérez, D. L., and M. Díaz-Muñoz. 2017. Synchronization by daytime restricted food access modulates the presence and subcellular distribution of  $\beta$ -catenin and its phosphorylated forms in the rat liver. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 8:1–18. doi:10.3389/fendo.2017.00014.
42. Tonsfeldt, K., and P. Chappell. 2013. Clocks on top: The role of the circadian clock in the hypothalamic and pituitary regulation of endocrine physiology. 349:3–12. doi:10.1016/j.mce.2011.07.003.Clocks.
43. Ulloa, J. A., M. C. Petra, R. Ulloa, J. Carmen, R. Ramírez, I. B. Q. Blanca, and E. Ulloa. 2011. El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. *Rev. Fuente.* 3:5–9.
44. Valverde, G., J. Mercedes, G. Valtier, M. Carlos, E. Reyna, M. Cristina, P. Morales, M. D. L. Ángeles, M. Arely, L. Olvera, and E. Alberto. 2017. Estudio en familias : factores ambientales y culturales asociados al sobrepeso y obesidad. *Rev. electrónica Trimest. enfermería.* 45:1–10.
45. Vekic, J., A. Zeljkovic, A. Stefanovic, Z. Jelic-Ivanovic, and V. Spasojevic-Kalimanovska. 2019. Obesity and dyslipidemia. *Metabolism.* 92:71–81. doi:10.1016/j.metabol.2018.11.005. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.11.005>
46. Vera-Rivera, G., I. Miranda, and M. Isabel. 2013. Molecular and biochemical modifications of liver glutamine synthetase elicited by daytime restricted feeding. *Liver Int.* 34:1–11. doi:10.1111/liv.12412.
47. Wang, H., X. Liang, G. Gravot, C. A. Thorling, D. H. G. Crawford, Z. P. Xu, X. Liu, and M. S. Roberts. 2017. Visualizing liver anatomy, physiology and pharmacology using multiphoton microscopy. *J. Biophotonics.* 10:46–60. doi:10.1002/jbio.201600083.
48. Wilkinson, M. J., E. N. C. Manoogian, A. Zadourian, S. Navlakha, S. Panda, P. R. Taub, M. J. Wilkinson, E. N. C. Manoogian, A. Zadourian, H. Lo, S. Fakhouri, and A. Shoghi. 2020. Ten-Hour Time-Restricted Eating Reduces Weight, Blood Pressure, and Atherogenic Lipids in Patients with Metabolic Syndrome. *Cell Metab.*

31:1–13. doi:10.1016/j.cmet.2019.11.004. Available from:  
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.11.004>

49. Zhao, M., H. Xing, M. Chen, D. Dong, and B. Wu. 2019. Circadian clock-controlled drug metabolism and transport. *Xenobiotica*. 0:1–11. doi:10.1080/00498254.2019.1672120.

Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/00498254.2019.1672120>

Dirección General de Bibliotecas UAQ