

**“Efecto de la alimentación tiempo-restringida sobre la disfunción metabólica inducida por dieta alta en grasas en *Drosophila melanogaster*”**

Tesis para optar al grado de Magíster en Nutrición y Alimentos

Mención Nutrición Humana

Tesista: Daniela Jireh Salgado Canales

Directores de Tesis: Dra. Mariana Cifuentes Köster

Dr. Nicolás Tobar Bächler

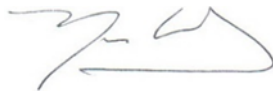
---

Fecha: 09 de mayo de 2022

Santiago-Chile

## AUTORIZACIÓN

El siguiente documento presentado como Tesis por la Estudiante Daniela Salgado Canales ha sido revisado y aprobado por nosotros como directores de Tesis para la presentación formal ante la Comisión Evaluadora designada por el Comité Académico del Magíster en Nutrición y Alimentos.



---

**Prof. Mariana Cifuentes Köster**



---

**Prof. Nicolás Tobar Bächler**

Santiago de Chile, 09 de mayo de 2022

### Comisión de tesis

- Dr. Christian Hodar Quiroga, Presidente.
- Dr. Rodrigo Troncoso Cotal, Revisor 1.
- Dra. Paulina Ormazábal Leiva, Revisor 2.

## Dedicatoria

A mis puntos cardinales en la brújula de la vida, a mis padres y abuelos: *Alex, Edith, Rosita y Daniel* (Q.E.P.D). Su profundo amor, fuerza y abnegación han sido mi continua fuente de inspiración para crecer y expandir mis límites. La fe y los valores que me han legado son los colores de la bandera que con esfuerzo se levanta en cada meta alcanzada. Ustedes son la vertiente cuyas aguas carga mi nombre, mi ADN y mi alma. Los amo, por siempre.

## Agradecimientos

A todos quienes estuvieron conmigo en este desafío: *We did it!* (¡al fin!), muchas gracias.

A mis queridos directores de tesis, siento mucha gratitud hacia ustedes por toda la paciencia, el tiempo dedicado y la amabilidad que les caracteriza. Gracias por impulsarme, por animarme y contribuir a mi formación académica desde su vasto conocimiento. Gracias también por permitirme aprender de su ejemplo enseñanzas de humildad y humanidad. No me imagino haber hecho esta tesis sin ustedes. Gracias por todo.

A mis compañeros de lab, de Biología Celular y de OMEGA, los que estuvieron y los que se añadieron hace poco, gracias por echarme porras cuando las cosas no resultaban, por el cariño y los almuerzos compartidos. Gracias especialmente a Dani Quenti que pasó horas enseñándome en la UI y al principio de mi tesis, con tanta paciencia y generosidad. También a Fer Lourido, la “Dra. Mosquitas”, por siempre tener la disposición de darme una mano. Gracias a Pame y Jesu por el cariño, las conversaciones, catarsis y risas.

Gracias a mis amigas Flo y Pauli, mis porristas desde pregrado.  
Gracias a Ro, quien es como un hermano mayor, por su apoyo y constante preocupación.

Gracias infinitas a mi hermosa familia, a mis padres por amarme y apoyarme sin condiciones, por ser siempre los primeros en creer en mí. Nada de esto sería posible sin ellos.

Gracias a mi abuelita Rosa, su dulzura y resiliencia me han impulsado más veces de las que ella imagina. Gracias a mi tata Daniel, quien me entregó tanto en vida, que en mis memorias de él encontré motivación durante las noches en el INTA y en los días de largas jornadas en el lab. Gracias también a Guita, mi abuelita del corazón, por todo el amor que recibo de ella desde mi niñez, siempre preocupada de cómo iban mis moscas.

Especialmente a mi familia: **Este logro no es mío, sino nuestro**. Y no quiero dejar de expresar mi profunda gratitud hacia Dios, mi Roca. Quien me dio salud y fuerza para este proceso. Quien puso a todas las personas mencionadas en mi camino. Gracias Señor, por este ciclo que se cierra y por otros que se abrirán.

## Índice de contenidos

<b>Contenidos</b>	<b>Nº de página</b>
1. Cuerpo preliminar	2 - 10
Comisión de tesis	3
Dedicatoria	4
Agradecimientos	5
Índice de contenidos	6 - 7
Índice de tablas	8
Índice de figuras	9
Índice de anexos	10
Lista de abreviaturas	11
2. Resumen	12 - 15
2.1 Resumen en español	12 - 13
2.2 Resumen en inglés	14 - 15
3. Introducción	16 - 22
4. Hipótesis y objetivos	23
5. Metodología	24 - 34
5.1 Modelo animal	24
5.2. Definición de muestra	25
5.3. Diseño de la investigación	25 - 26
5.4. Definición de conceptos y variables	27
5.5. Procedimientos y técnicas	27 - 32
5.6. Técnicas estadísticas de análisis	33 - 34

6. Resultados	35-56
6.1 HFD por diez días induce daño metabólico en moscas adultas macho	36-37
6.2 Las moscas macho exhibieron ritmos circadianos de expresión de genes reloj y Ccha2 alterados luego de un periodo de diez días de HFD	37-41
6.3 Efectos de la intervención TRF en moscas macho con daño metabólico y resistencia a la insulina que continúan en HFD.	42-43
6.4 Efecto de TRF en el ritmo circadiano de expresión de genes del reloj molecular central y periférico y de Ccha2 en moscas alimentadas con HFD	44-48
6.5 Efecto de TRF en moscas macho con daño metabólico y resistencia a la insulina alimentadas con CD	49-50
6.6 Efectos de TRF en el ritmo circadiano de expresión de genes del reloj molecular central y periférico y de Ccha2 en moscas macho con daño metabólico y resistencia a la insulina que fueron cambiadas a CD	51-55
7. Discusión	56-63
8. Conclusiones	64
9. Referencias	65-69
Anexos	70-82

## Índice de tablas

<b>Tabla</b>	<b>Nº de página</b>
<u>Tabla 1</u> : Secuencias de partidores utilizados.	29
<u>Tabla 2</u> : Parámetros del ritmo circadiano de expresión de genes activadores y represores del reloj molecular central y periférico en moscas macho alimentadas con CD (grupo CTL) o HFD por diez días.	40
<u>Tabla 3</u> : Parámetros del ritmo circadiano de expresión de genes clock activadores y represores del reloj molecular central y periférico en moscas alimentadas con HFD.	47
<u>Tabla 4</u> : Parámetros del ritmo circadiano de expresión de genes clock activadores y represores del reloj molecular central y periférico en moscas alimentadas con HFD que luego fueron cambiadas a una alimentación CD.	55



## Índice de figuras

Figura	Nº de página
<u>Figura 1</u> : Diseño experimental.	25
<u>Figura 2</u> : Parámetros que caracterizan un ritmo.	31
<u>Figura 3</u> : Efectos de la exposición a HFD por diez días en machos de <i>Drosophila melanogaster</i> .	35
<u>Figura 4</u> : Ritmo de expresión circadiana de genes del reloj molecular central y periférico luego de diez días de HFD o CD en machos de <i>Drosophila melanogaster</i> .	39
<u>Figura 5</u> : Impacto del régimen de alimentación TRF sobre parámetros metabólicos en moscas mantenidas en HFD.	42
<u>Figura 6</u> : Efecto de una semana de TRF sobre el ritmo de expresión circadiana de genes del reloj molecular central y periférico y de Ccha2 en moscas alimentadas con HFD.	46
<u>Figura 7</u> : Impacto del régimen de alimentación TRF sobre parámetros metabólicos en moscas previamente alimentadas con HFD que fueron cambiadas a una alimentación CD.	49
<u>Figura 8</u> : Efecto de una semana de TRF en el ritmo de expresión circadiana de genes del reloj molecular central y periférico y de Ccha2 en moscas previamente alimentadas con HFD que fueron cambiadas a una alimentación CD.	55

## Índice de anexos

<b>Anexo</b>	<b>Nº de página</b>
<u>Anexo 1.</u> Procedimiento de aplicación de la prueba-F para determinar el ajuste de los datos de expresión relativa de los niveles de ARNm de genes reloj y Ccha2.	71-73
<u>Anexo 2.</u> Resultados de análisis de la Prueba-F aplicada a los conjuntos de datos de expresión relativa de los niveles de ARNm de genes reloj y Ccha2.	74-76
<u>Anexo 3.</u> Composición nutricional de las dietas experimentales y aporte energético promedio consumido en un periodo de 2 h por <i>Drosophila melanogaster</i> previo a la intervención TRF (Pre-TRF).	77
<u>Anexo 4.</u> Aporte energético promedio consumido en 2 h por <i>Drosophila melanogaster</i> post-TRF en cada grupo experimental.	78
<u>Anexo 5.</u> Ritmos circadianos transcripcionales de genes reloj y ccha2 en moscas CTL a los 17 días de vida.	79-81
<u>Anexo 6.</u> Parámetros del ritmo circadiano de expresión de genes clock activadores y represores del reloj molecular central y periférico en moscas CTL (no intervenidas) a los 17 días.	82
<u>Anexo 7.</u> Impacto de la intervención TRF sobre los valores promedio de glucosa circulante, peso y TAGs totales en condiciones CD y HFD.	83

## Lista de abreviaturas

AI: Ayuno intermitente

AL: Ad libitum

Bmal1: Brain and Muscle ARNT-Like 1

Ccha2: CCHamida2

CD: Control Diet o Dieta Control

Clock: Circadian Locomotor Output Cycles Kaput

Cry: Cryptochrome

Cyc: Cycle

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

Dilps/Ilps: Drosophila Insulin-like-peptides

HFD: High Fat Diet

PBS: Tampón Fosfato Salino o Phosphate Buffered Saline

PBT: PBS-Triton X-100

Per: Period

PFA: Paraformaldehído

RPL: Ribosomal protein L19

RT-qPCR: Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction

SCN: Núcleo supraquiasmático

SNC: Sistema nervioso central

TA: Tejido Adiposo

TAGs: Triacilglicéridos/triglicéridos

Tim: Timeless

TRF: Time-Restricted Feeding

ZT: Zeitgeber Time

## 2. Resumen

La obesidad es una patología con alta prevalencia y morbi-mortalidad. El desafío de frenar esta pandemia involucra distintas disciplinas, y la ciencia básica ha planteado como causa fisiopatológica la existencia de alteraciones metabólicas asociadas a la desincronización de relojes moleculares que regulan los ritmos circadianos. En la búsqueda de herramientas que apoyen el tratamiento clínico/alimentario de la obesidad, el ayuno intermitente (AI) ha ganado interés en el último tiempo. Se han identificado beneficios del AI sobre alteraciones metabólicas asociadas a cambios en los ritmos circadianos inducidos por dieta alta en grasas (HFD) u obesidad en estudios en humanos y modelos animales. Dichos cambios podrían ser revertidos mediante ajustes en el ciclo de alimentación/ayuno, gatillado por la alimentación tiempo-restringida (TRF), un tipo de AI. La hipótesis de esta tesis es que un régimen TRF de 12 h por una semana contribuye a revertir la disfunción metabólica y la alteración del ciclo circadiano central y/o periférico, en comparación con alimentación *Ad Libitum* (AL), en moscas previamente alimentadas con HFD por 10 días que continúan con HFD o cambian a dieta control (CD). Así, el objetivo fue determinar el impacto de TRF de 12 h sobre parámetros metabólicos y marcadores moleculares del ciclo circadiano alterados en moscas con daño metabólico inducido por HFD. Utilizamos a *Drosophila melanogaster* como modelo de daño metabólico y cronodisrupción inducidos por HFD por 10 días. El diseño del estudio fue experimental (tipo longitudinal), con mediciones pre y post intervención, la cual correspondió a TRF por una semana. Se asignaron aleatoriamente moscas con disfunción metabólica a un tipo de dieta (CD o HFD) y un régimen de alimentación (AL o TRF) y se evaluó el contenido total de triglicéridos (TAGs), glicemia, peso, expresión de Nlaz (marcador de resistencia a la insulina), e indicadores de la regulación de ritmos circadianos moleculares (ritmos de transcripción de genes del reloj molecular y del neuropéptido orexigénico Cch-amida2 en 24 h), al inicio y al finalizar la intervención. Observamos que, en moscas con daño metabólico y luego alimentadas con HFD y/o con CD, TRF disminuyó el contenido total de triglicéridos,

glucosa circulante, expresión de Nlaz y peso. Adicionalmente, se observó en los ritmos circadianos de algunos genes reloj, una recuperación parcial de la amplitud previamente disminuida por efecto de HFD durante 10 días, especialmente del reloj periférico en el grupo CD. En conclusión, TRF produjo una reversión parcial de la disfunción metabólica y de la cronodisrupción de los ciclos circadianos ya sea en condiciones de HFD o CD.

## 2.1 Abstract

Obesity is a pathology with high prevalence, morbidity, and mortality. The challenge of stopping this pandemic includes different disciplines, and basic science has raised the existence of metabolic alterations associated with the desynchronization of molecular clocks that regulate circadian rhythms. In the search for tools that support the clinical/dietary treatment of obesity, intermittent fasting (IF) has recently gained interest. Studies in humans and animal models have identified benefits of IF on metabolic alterations associated with changes in circadian rhythms induced by a high-fat diet (HFD) or obesity. Such changes could be reversed by the modulation of the feed/fast cycle, which may be accomplished by IF, namely time-restricted feeding (TRF). This thesis hypothesizes that a TRF regimen of 12 h for one week contributes to reversing metabolic dysfunction and alterations of central and/or peripheral circadian cycle as compared to Ad Libitum (AL) intake in flies previously fed HFD and continuing on HFD or switched to control diet (CD). Thus, the objective was to determine the impact of 12-h TRF on altered metabolic parameters and molecular markers of the circadian cycle in flies with metabolic damage induced by HFD. We used *Drosophila melanogaster* as an animal model of metabolic damage and chronodisruption induced by HFD. The study design was experimental (longitudinal), with measurements before and after the intervention (TRF for one week). Flies with metabolic dysfunction were randomly assigned to a diet (CD or HFD) and feeding regimen (AL or TRF). We evaluated total triglyceride (TAGs) content, glycemia, weight, Nlaz expression (insulin resistance marker) and circadian rhythm molecular markers (clock genes and the orexigenic neuropeptide Cchamide2 rhythms in 24 h). In flies with metabolic damage fed either HFD or CD, those on TRF showed lower total triglyceride content, circulating glucose, Nlaz expression and weight compared to AL. In addition, we observed the recovery of some of the HFD-induced alterations in the amplitude of the circadian rhythm, particularly in the peripheral clock of the CD group. In conclusion, TRF produced a partial reversal of

metabolic dysfunction and chronodisruption of circadian cycles in either HFD or CD conditions.

### 3. Introducción

En la actualidad, la obesidad constituye un problema de salud pública a nivel nacional y mundial, de origen multifactorial, asociado a una alta morbi-mortalidad. A la fecha, no existe ningún país que haya podido disminuir sus prevalencias de exceso de peso, a pesar de múltiples esfuerzos para frenar esta pandemia (1). En Chile, las cifras de sobrepeso y obesidad han aumentado en los últimos años, pasando de una prevalencia de un 61% en el año 2003, a un 67% en el año 2010 y finalmente a un 74% en los años 2016-2017 (2) (3). Estas cifras representan un aumento del riesgo de desarrollar otras comorbilidades y del costo en salud pública. Por lo tanto, el enfrentamiento de esta problemática en salud requiere de un esfuerzo multisectorial, el cual debe ser abordado de manera transversal en las diversas políticas públicas.

En el contexto del desafío que representa enfrentar la obesidad, desde la ciencia básica se han trazado distintas líneas de investigación que buscan contribuir a entender y proponer soluciones para abordar esta patología. Desde el punto de vista de la biología, la obesidad se produce cuando de manera crónica un sujeto consume más energía de la que necesita para satisfacer su gasto energético diario, generándose un balance energético positivo, que es manejado por el organismo mediante el almacenamiento del excedente en forma de TAGs en el tejido adiposo (TA). No obstante, la capacidad de acumulación de lípidos puede ser superada, lo que conduce a una disfunción del TA que conlleva la generación de un ambiente proinflamatorio (4). Los mecanismos fisiopatológicos que se desencadenan en el contexto de la obesidad, como la resistencia a la insulina, producen un impacto en el metabolismo de sustratos energéticos como los lípidos y los carbohidratos, generando un daño o disfunción metabólica, que favorece la aparición de enfermedades crónicas como hígado graso, diabetes mellitus y aumento del riesgo cardiovascular (5) (6).



El manejo clínico convencional de la malnutrición por exceso incluye cambios de hábitos enfocados en una alimentación balanceada, práctica regular de ejercicio físico y promoción de estilos de vida saludable (7). Sin embargo, estas medidas no han mostrado éxito terapéutico mantenido en el tiempo, principalmente por falta de adherencia al tratamiento. Por lo tanto, en la actualidad se están evaluando potenciales herramientas costo-efectivas que contribuyan a la mantención de hábitos saludables. Entre las posibles herramientas novedosas para enfrentar la obesidad, en años recientes el ayuno intermitente (AI) ha suscitado un creciente interés. El concepto de AI comprende una variedad de aproximaciones diferentes. Dentro de estas se encuentra la “alimentación tiempo-restringida” o “*Time-Restricted Feeding* (TRF)”, la cual consiste en establecer una ventana acotada de alimentación de 6, 8, 10, o 12 horas, seguida de una ventana de ayuno hasta completar las 24 horas del ciclo o día (8). Esta manera de estructurar la alimentación busca ordenar los tiempos de alimentación de modo que la ingesta ocurra en un periodo diurno (fase activa), sin necesariamente incluir una reducción o restricción calórica. Asimismo, se ha observado que cuando la alimentación ocurre durante la fase activa (temprano en el día en el caso de los humanos, y de noche en ratones y ratas), al estar en sincronía con el ciclo circadiano y la cronobiología, se obtienen mejores indicadores de salud metabólica y menor peso corporal (9), en comparación con el esquema de horarios de alimentación característicos de un estilo de vida occidental moderno, en el que hay un consumo constante de alimentos hasta avanzadas horas de la noche.

Estudios preclínicos y clínicos en distintas modalidades de AI, incluyendo TRF, han reportado beneficios tales como mejoras en el control glicémico y la sensibilidad a la insulina, aumento de la resistencia al estrés y reducción de marcadores de inflamación. Esto, adicional a la pérdida de peso, mejor regulación de apetito y reducción de la producción de especies radicalarias de oxígeno, entre otros (8) (10) (11) (12) (13). Asimismo, en estudios en modelos animales, que a la fecha incluyen ratones, ratas y moscas, se ha observado mejoras en la sensibilidad a la insulina,

supresión de depósito de grasa intramuscular en músculo esquelético y cardiaco, disminución de esteatosis hepática e inflamación, desaceleración del envejecimiento cardiaco y prevención de ganancia de peso cuando se les administra una dieta hipercalórica, entre otros (14) (15) (16) (17) (18).

Entre los mecanismos a través de los cuales TRF podría ejercer sus efectos benéficos en la salud metabólica, se ha propuesto la modulación de los ciclos circadianos. El ciclo circadiano corresponde al conjunto de oscilaciones de los procesos fisiológicos en órganos y células, que ocurren en aproximadamente 24 horas en todos los seres vivos en respuesta a los ciclos de luz/oscuridad derivados del movimiento de rotación del planeta. Dichas oscilaciones tienen como función anticipar las respuestas biológicas a cambios ambientales predecibles (19). Frecuentemente, estos ciclos son afectados por el estilo de vida occidental, que se caracteriza por un alto consumo de alimentos ultraprocesados, patrones de alimentación erráticos o “picoteo” durante gran parte de las horas del día, sedentarismo, prolongada exposición a pantallas, deudas de sueño y esquemas irregulares del ciclo sueño/vigilia, entre otros.

El ritmo circadiano es dirigido por un reloj central o maestro en las neuronas del núcleo supraquiasmático (SCN) del hipotálamo, las que reciben información desde las células ganglionares de la retina que procesan señales de la luz ambiental. El principal sincronizador o *Zeitgeber* (del alemán “dador de tiempo” o “sincronizador”) del reloj central es el estímulo de luz ambiental, sin embargo, también presenta una autonomía dada por sus oscilaciones moleculares endógenas. No obstante, dichas oscilaciones, también son “entrenables” por otros estímulos ambientales, que pueden alterar su sincronización. Entre dichos estímulos se encuentran la exposición a luz artificial, los ciclos de sueño/vigilia, alimentación/ayuno, actividad/reposo, entre otros (19). Además, el reloj central regula la ritmicidad de relojes periféricos tejido-específicos que sincronizan localmente diversos procesos celulares mediante la expresión/actividad de enzimas o proteínas reguladoras del

metabolismo (20). La comunicación desde el reloj central hacia los relojes periféricos en los mamíferos se efectúa mediante vías aún poco conocidas, que incluyen señales neurales, endocrinas e incluso térmicas. La organización molecular del reloj circadiano se encuentra en invertebrados y en mamíferos, incluyendo humanos, lo que refleja una alta conservación evolutiva (21).

A nivel molecular, el reloj circadiano (tanto a nivel central como periférico) tiene un componente activador y otro represor, que coordinan un circuito de transcripción y traducción que opera en un ciclo de ~24 horas (20). El componente activador consta de un dímero de proteínas Clock y BMAL1 que se une a secuencias regulatorias (E-box) del DNA e inducen la expresión génica de *Cryptochrome (Cry)* y *Period (Per)*, entre otros, y actúa durante el día (fase activa). Luego del proceso de traducción, se produce una heterodimerización de Per y Cry que se transportan al núcleo e inhiben a Clock/BMAL1 y por lo tanto su propia expresión, creando un *loop* negativo. El complejo Per/Cry ejerce su regulación negativa durante la noche (fase de reposo en humanos), y a medida que su abundancia decae por el auto-apagado de su expresión y su degradación, la activación de Clock y Bmal1 se recupera, dando paso al reinicio del ciclo. La importancia del funcionamiento de este reloj molecular reside en que establece el compás de las oscilaciones circadianas, y su adecuada expresión génica determina a su vez los cambios en la expresión de otros genes vinculados al metabolismo, los que en su conjunto reciben en nombre de clock-controlled genes (CCG) (22). Estos cambios de expresión, que regulan el funcionamiento del metabolismo, determinan los cambios cíclicos en los niveles/abundancia de moléculas metabólicamente relevantes en el organismo.

En este aspecto, *Drosophila melanogaster* es el modelo animal en el que se inició el estudio del reloj molecular, describiéndose por primera vez el rol del factor Per en la mantención de un periodo de 24 h en el ciclo circadiano (23). En moscas, el ortólogo de BMAL1 recibe el nombre de Cycle (CYC), mientras que CRY equivale a Timeless (TIM) (24). Además, el neuropéptido CCH-amida2 (Ccha2), producido por las células del intestino medio, ejerce una acción similar a la grelina, controlando las señales de apetito durante el día a nivel del Sistema Nervioso Central (SNC), lo que produce que la conducta del animal se oriente hacia la búsqueda de alimento, con una ritmicidad circadiana descrita de dos peaks en 24 h, durante la fase activa del animal (fase de luz), anticipando la ingesta alimentaria (25).

La comunicación bilateral entre el reloj central y los relojes periféricos es clave para la homeostasis. Particularmente, los relojes en el aparato gastrointestinal y en el TA pueden afectar la sincronización del reloj central en base a estímulos como ingesta de alimentos (26). Por ejemplo, grelina, una hormona secretada por las células parietales del estómago tiene un efecto orexigénico a nivel del SNC y orienta la conducta hacia la búsqueda de alimento, participando en la regulación circadiana del apetito (26). Sin embargo, la ritmicidad de su secreción es afectada por la disrupción del ritmo circadiano observada en obesidad y en respuesta a una HFD. Por lo tanto, la evaluación, en un curso temporal, de la expresión de genes que codifican el reloj y en particular de esta hormona, es clave para identificar los cambios en su ritmo circadiano, inducidos por estímulos como el régimen de alimentación experimental.

Existe evidencia de que una dieta alta en grasas produce una disrupción en el ciclo circadiano de expresión de los relojes moleculares. Un estudio en ratones (27) reportó que HFD disminuyó la amplitud (magnitud de un ritmo) de la expresión de genes del reloj molecular en TA e hígado y también produjo un retraso en el periodo (tiempo de duración de un ciclo/ritmo biológico). Adicionalmente, se alteró la expresión circadiana de genes que codifican para enzimas y factores de

transcripción del metabolismo de lípidos. Dichos efectos se asociaron a la alteración del ritmo circadiano de la glucosa circulante, de leptina, insulina, ácidos grasos libres y corticosterona (27).

Cuando los ritmos circadianos moleculares se encuentran alterados, se produce un aumento del riesgo de obesidad, diabetes y enfermedades crónicas, lo que induce o perpetúa el daño metabólico. No obstante, un estudio realizado en ratones sometidos a HFD, reportó que TRF previno la alteración de la expresión circadiana de genes reloj en comparación a los que se alimentaron con HFD, pero en un esquema de alimentación AL (28). Esto fortalece la idea de que la señal de alimentación/ayuno puede ser un sincronizador ambiental útil para reajustar el orden circadiano, lo que podría generar un impacto positivo a nivel metabólico.

Cabe destacar que en la última década se han validado en *Drosophila* distintos modelos para estudiar enfermedades crónicas, como obesidad y diabetes tipo 2. Estos modelos han permitido entender el funcionamiento del metabolismo en mamíferos, dado que cuenta con mecanismos conservados y funcionalmente similares que regulan la homeostasis de la glucosa y la acumulación y movilización de lípidos, entre otros. El estudio en moscas también cuenta con otras ventajas como la disponibilidad de herramientas moleculares y genéticas, junto con su simplicidad (25) (29) (30), que favorecen la identificación de mecanismos de control metabólicos alterados en patologías del humano (31). A la fecha se han descrito modelos de obesidad genéticos e inducidos mediante dietas hipercalóricas (31) (32). El modelo de obesidad y resistencia a la insulina exhibe características como hiperglicemia, hiperinsulinemia (aumento de la expresión y secreción de péptidos insulínicos (Dilps), encargados del control glicémico), atenuación de la señalización intracelular en respuesta a la insulina, y aumento del contenido de TAGs en cuerpo graso (tejido que combina funciones equivalentes a hígado y tejido adiposo de mamíferos) con gotas lipídicas más grandes. Además, en larvas se produce un retraso del crecimiento, lo que se traduce en menor peso y tamaño, debido a que

algunos Dilps tienen también funciones equivalentes a IGF-1 (32). También, se ha descrito que el cuerpo graso secreta una lipocalina llamada Neural Lazarillo (NLaz), que antagoniza la señalización de insulina, y una expresión génica aumentada ha sido reportada como marcador de resistencia a la insulina en moscas sometidas a dieta alta en azúcar y en HFD (15).

El presente proyecto utilizó *Drosophila melanogaster* como modelo de estudio del daño metabólico inducido por HFD, para evaluar el impacto de TRF en la reversión de dichas alteraciones, que se acompañan de cambios en los relojes moleculares periféricos y/o central. De este modo, se podría contribuir con bases científicas que permitan sustentar la utilidad de esta práctica para hacer frente a la pandemia de la obesidad y sus comorbilidades.

#### 4. Hipótesis de Trabajo y Objetivos

##### Hipótesis:

Un régimen TRF de 12 h por una semana contribuye a revertir la disfunción metabólica y la alteración del ciclo circadiano central y/o periférico, en comparación con alimentación AL, en moscas macho previamente alimentadas con HFD por diez días, que continúan con HFD o cambian a CD.

Objetivo general: Determinar el impacto de TRF de 12 h sobre parámetros metabólicos y marcadores moleculares del ciclo circadiano alterados en moscas macho con daño metabólico por HFD.

##### Objetivos específicos:

En moscas macho con daño metabólico inducido por HFD, sometidas luego a HFD o CD, evaluar el efecto de TRF de 12 h sobre:

1. Marcadores de la acumulación de lípidos (Contenido total de triglicéridos).
2. Marcadores de control de la glucosa circulante y resistencia a la insulina (glicemia, peso y NLaz).
3. Indicadores de la regulación de ritmos circadianos moleculares (niveles de ARNm de genes activadores [Clock y Cycle] y represores del reloj molecular [Timeless y Period] y de Cch-amida2).

## 5. Metodología

### 5.1 Modelo animal

Se utilizaron moscas macho *Drosophila melanogaster* de la cepa silvestre Canton Special (CS, #64349) provenientes de Bloomington Drosophila Stock Center. Estos animales fueron crecidos en CD en viales de plástico transparente en un incubador a 25 ° C con ciclos de luz/oscuridad de 12 h, desde las 08:00 hasta las 20:00 h, hora local. Durante los días 1-3 post eclosión (momento en que el insecto sale de su carcasa pupal e inicia su vida adulta), las moscas fueron transferidas a viales de cultivo y recibieron HFD por un periodo de diez días, manteniendo el mismo ciclo de luces encendidas/apagadas.

El alimento estándar de las moscas o CD está compuesto en % p/v por agar 1%, levadura de cerveza 8%, extracto de levadura 2%, peptona 2%, sacarosa 5,1%, sulfato de magnesio 0,05%, cloruro de calcio 0,05% y adición de ácido propiónico como conservante y Nipagin como antimicótico y antibacteriano. El alimento HFD se obtiene a partir de la suplementación de CD con 5% aceite de coco, que es ampliamente utilizado en estudios en moscas en rangos que varían entre el 2-30% (15) (33). La HFD permite inducir un modelo de obesidad, el cual en moscas se define como un aumento excesivo de la acumulación de grasas en el cuerpo graso, acompañado de hiperglicemia, resistencia a la insulina y otras alteraciones metabólicas (31) (32), así como también disrupción del ritmo circadiano (34).



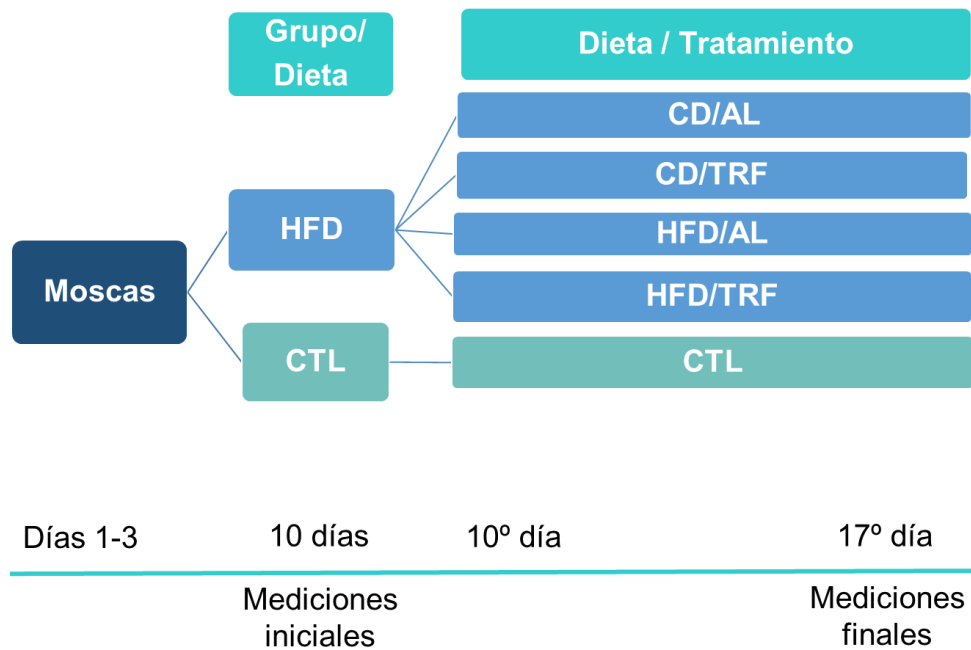
## 5.2. Definición de la muestra

La determinación del tamaño muestral se basó en la evidencia publicada utilizando el modelo *Drosophila melanogaster* y tomando como referencia específica los protocolos generados por Laura Musselman, quien desarrolló y caracterizó el modelo diabetes inducida por dieta alta en sacarosa en estos animales (32). Dependiendo del tipo del ensayo, se utilizaron grupos de moscas con un n=10-50 individuos machos por condición y en 3-4 experimentos independientes para cada tipo de evaluación.

## 5.3 Diseño de la investigación

Se realizó un estudio experimental en moscas adultas con daño metabólico inducido por HFD durante diez días. Luego, se las asignó al azar a uno de cuatro grupos según dieta (CD o HFD) y régimen de alimentación (AL o TRF). Se mantuvo un quinto grupo de referencia (CTL), que consistió en moscas que nunca recibieron HFD, las que fueron alimentadas durante todo el periodo (17 días) con CD/AL. Las moscas en régimen AL tuvieron disponibilidad de alimento las 24 h del día. Cada vial contenía aproximadamente 8 mL de alimento, fuese CD o HFD. El grupo intervenido con TRF, tuvo un ciclo de 12 h de disponibilidad de alimento durante el día (luces encendidas), que correspondía a la fase activa, seguido de un ciclo de 12 h de ayuno nocturno (luces apagadas), correspondiente a la fase de reposo. Así, la alimentación/ayuno coincide con ritmos circadianos de día/noche en el animal, basado adicionalmente en la evidencia de que un ayuno de 12 h ha mostrado en este modelo un impacto benéfico sobre alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad (14) (15). Cabe destacar que se consideró la luz ambiental como el principal estímulo sincronizador o Zeitgeber (35), por lo que el encendido de las luces a las 8:00 horas correspondería al Zeitgeber Time (ZT) 0, iniciando la fase activa del animal, la cual concluye con el apagado de luces al ZT 12 o 20:00 h, hora

local. Para generar el ayuno nocturno, se cambiaron las moscas a un vial que contenía agar 1% en vez de alimento. La intervención TRF tuvo una duración de una semana. Las variables de interés serán evaluadas pre y post intervención, tal como muestra la figura 1.



**Fig. 1. Diseño experimental.** Moscas macho se recolectaron entre el día 1-3 de vida y se sometieron a diez días de HFD. Se midieron las variables basales (pre-TRF) y se dividieron al azar en los cuatro grupos experimentales según el tipo de dieta; CD o HFD y régimen de alimentación TRF de 12 h o AL. Luego de 7 días de TRF, se evaluaron las variables del punto final. Un grupo de moscas de la misma edad fue asignado para grupo control de referencia (CTL), que se mantuvo desde el día 1 en CD y no fue intervenido.

#### 5.4 Definición de conceptos y variables

La variable independiente fue el régimen de alimentación (AL vs TRF), el cual fue evaluado en dos tipos de alimentación; CD y HFD. Las variables dependientes o respuesta corresponden a: contenido de TAGs totales, peso, glucosa circulante y niveles de transcritos (ARNm) de *Nlaz*, genes del reloj molecular y el neuropéptido Cchamida-2.

#### 5.5 Procedimientos y técnicas:

##### **Medición de peso y glicemia.**

El peso, expresado en mg, se midió en una balanza analítica, previo adormecimiento de los insectos con CO<sub>2</sub>. Se agruparon conjuntos de 5 moscas macho por cada condición pertenecientes a un mismo tubo de cultivo, y ya adormecidas se traspasaron a tubos 0,2 mL previamente masados, para realizar la medición en la balanza. Luego, el peso obtenido fue dividido en cinco, para determinar el peso promedio de una mosca. Este proceso se realizó por triplicado para cada grupo experimental, antes y después de la intervención TRF. Las réplicas técnicas se obtuvieron de moscas que provenían de distintos tubos.

Para la medición de glicemia (mg/dL) se seleccionó un subgrupo (n=40-50) distinto a las moscas que se pesaron, y con ayuda de una aguja intramuscular se les realizó una perforación en el tórax, y se las dispuso en tubos de 0,6 mL previamente perforados en el centro del extremo inferior, los cuales se introdujeron dentro de otro tubo de 1,5 mL con la tapa abierta. Luego se obtuvo la hemolinfa (equivalente a “sangre” en moscas) por centrifugación en frío, la cual quedaba contenida en el tubo 1,5 de mL. Dicha hemolinfa se diluyó 1:10 y la glucosa se evaluó mediante un glucómetro (Accu-Chek®). Esta medición fue previamente validada en el laboratorio de biología celular respecto a otro estándar de medición de glucosa circulante en moscas y muestra una adecuada correlación (36). Este procedimiento se efectuó

en la mañana, inmediatamente al inicio del ciclo de luz (08:00 - 09:00 hrs), previo al TRF y nuevamente al finalizar la intervención.

### **Ensayo de sobrevida**

Para evaluar el impacto de HFD en la sobrevida de las moscas, se recolectaron 600 moscas macho hasta 24 h después de la eclosión y se dividió en dos grupos, con un total de 300 moscas por dieta experimental (CD y HFD). Se distribuyeron en grupos de 20 moscas por vial, y cada dos días se realizó el recuento del número de moscas muertas, mientras que las que quedaban vivas se cambiaban a un nuevo vial con alimento fresco de la dieta correspondiente. Luego de la muerte total de cada grupo, el registro del número de moscas vivas en el tiempo (días) se graficó como curva de sobrevida.

### **Ensayo de ingesta**

Para estimar la cantidad de alimento ingerido por los animales de los distintos grupos experimentales antes y después de la intervención TRF, utilizamos un protocolo previamente establecido (<http://musselmanlab.com/index.php/protocols/>). El ensayo de ingesta se basa en la incorporación de un colorante en la comida, el cual posteriormente se cuantifica a partir de su incorporación al intestino. Se añadió 1% colorante azul (Brilliant Blue, Sigma® grado alimento) a la dieta, a la que las moscas se expusieron por una hora (a modo de adaptación). Posteriormente, las moscas retornaron a tubos con comida sin colorante por una hora, tras lo cual se inició el ensayo de ingesta, pasando las moscas nuevamente, a un tubo con comida con colorante por dos horas. Para la cuantificación de la ingesta, las moscas se congelaron en grupos de 4 en tubos de 1,5 mL a -20° C, posteriormente se homogeneizaron en 100 µL de PBS y se centrifugaron durante 1 minuto a 13.000 rpm. El sobrenadante se extrajo y traspasó a una placa multipocillo para cuantificar absorbancia del colorante azul en el homogenizado de moscas a 630 nm. El homogenizado de un grupo de moscas que no comieron alimento azul se usó como blanco en cada uno de los tratamientos. Finalmente, se estimó la cantidad de

comida promedio ingerida en una ventana de dos horas a partir de una curva estándar elaborada con una dilución seriada de comida con colorante y la ecuación descrita previamente por Musselman (37).

### **Contenido de TAGs**

La determinación del contenido total de TAGs se realizó siguiendo el protocolo de detección colorimétrica del kit Triglyceride Quantification Colorimetric/Fluorometric de Sigma-Aldrich®, cuyo principio se basa en que los TAGs se convierten en ácidos grasos libres y glicerol, por acción de la lipasa. El glicerol liberado, se oxida y emite un color fucsia, el cual es cuantificado por absorbancia en un espectrofotómetro a 570 nm. Se tomaron grupos de 5 moscas en duplicado por condición experimental en tubos de 1,5 mL en frío. Luego, se homogenizaron en 100  $\mu$ L de PBS y se añadieron 2  $\mu$ L de lipasa a cada tubo y se dejó incubando por 20 minutos a temperatura ambiente. Luego, se adicionó 50  $\mu$ L de “Master reaction mix” que contiene buffer y un mix enzimático a cada muestra y al blanco, que consistió en un homogenizado de un grupo de moscas sin la adición de lipasa. Subsecuentemente, las muestras se traspasaron a una placa multipocillo y se efectuó una incubación por una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se midió la absorbancia a 570 nm, utilizando un espectrofotómetro (TECAN Infinite f50). Finalmente, el contenido de TAGs totales fue determinado a partir de una curva estándar.

### **Extracción de ARN y expresión génica por RT-qPCR**

Evaluamos mediante RT-qPCR la expresión del gen *Nlaz*, genes del reloj molecular y *Ccha2*. Para evaluar la expresión génica del reloj central, se tomaron solo cabezas de moscas ( $n=30-40$ ) y para la evaluación del reloj periférico se tomó el cuerpo sin la cabeza ( $n=30-40$ ). Ambos tipos de tejidos se lisaron en Trizol (Invitrogen®) y se extrajo y purificó ARN según las instrucciones del kit E.Z.N.A.® Total RNA Kit I (Omega Biotek). Luego, a partir de 0,5 o 1  $\mu$ g de ARN se realizó retrosíntesis de ADNc utilizando High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermofisher®)

para las muestras de cabeza y para las muestras de cuerpo se usó M-MLV Reverse Transcriptase, Oligo(dT)15 Primer y dNTPs (Deoxynucleotide Triphosphates) de Promega®. Posteriormente, se efectuó Real-Time qPCR utilizando aproximadamente 200 ng de ADNc y Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems®) en dos replicas técnicas. Los resultados se normalizaron utilizando la expresión del gen Rpl-19 como gen *housekeeping*. La expresión de ARNm se evaluó con LightCycler® 96 System. El cálculo del cambio de expresión relativa se realizó mediante el método desarrollado por Pfaffl (38), y se expresó como veces de cambio de los niveles del transcrito de interés respecto de una condición control.

Los partidores para medir expresión de los transcritos fueron previamente validados en el laboratorio de biología celular y se presentan en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Secuencias de partidores utilizados.

Gen	Secuencia Forward (3´ a 5´)	Secuencia Reverse (3´ a 5´)
Rpl-19	AGGTCGGACTGCTTAGTGACC	CGCAAGCTTATCAAGGATGG
Nlaz	GGACAACCCTCGAATGTA ACT	GACGGCGTATGACTCGTAATC
Clock	GGATAAGTCCACGGTCCTGA	CTCCAGCATGAGGTGAGTGT
Cyc	TGGACAATCACCCGAACATAC	CTGAGGCAGGAAACCAATCA
Per	CGAGTCCACGGAGTCCACACACAACA	AGGGTCTGCGCCTGCCC
Tim	GGTGGCATCTGTGTACGAAA	GATCTCGGTTTCGCTCAAGTC
Ccha2	AAACAGCAACAGCAGCAAAC	AGGACCACGGTGCAGATAAC

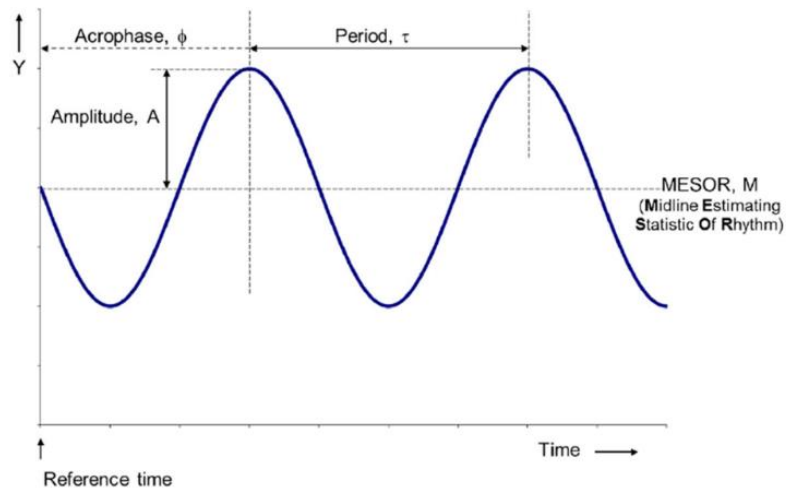
### **Evaluación de los genes reloj y Ccha2 como un ritmo circadiano**

Para identificar los cambios en el ritmo de expresión de los genes que codifican para proteínas del reloj molecular (Clock, Cyc, Per y Tim) y para Ccha2, se evaluaron sus niveles transcripcionales en distintos tiempos dentro de un periodo de 24 horas. Se tomó muestras de un subgrupo de moscas macho de los distintos grupos cada 4 horas, previo y posterior a la intervención con TRF. Los ARNm fueron aislados a partir de cabezas y cuerpos descabezados, según se describió previamente y luego se determinó la expresión relativa de los transcritos estudiados por qPCR. Finalmente, se evaluó la existencia de un patrón de expresión circadiano a partir de la curva generada por los cambios de expresión relativa en 24 h, mediante Análisis Cosinor. Este método es ampliamente usado en el estudio de ritmos circadianos y cronobiología, y efectúa un modelamiento matemático que asigna una función sinusoidal o de movimiento armónico simple a un curso temporal de datos (39). Para evaluar el ajuste de bondad del modelamiento, se realizó F-test para cada conjunto de datos por condición experimental, pre y post intervención TRF, de acuerdo con lo descrito en la literatura (39) (40). Luego de haber comprobado que hubiese un ajuste respecto al modelo matemático (función sinusoidal), se estimaron los parámetros cuantitativos (amplitud, desfase, periodo y mesor o línea basal) que describen un ciclo (39). De estos, se seleccionaron amplitud y desfase para comparar entre los grupos experimentales.

Para favorecer la comprensión de los resultados, a continuación, se presentan algunas definiciones de los parámetros del ritmo circadiano (39):

- i. Amplitud: La magnitud de un ritmo. Puede expresarse como la distancia media de la extensión (entre peak y mesor) o bien entre el peak y el valor más bajo dentro de un ciclo.
- ii. Fase: Tiempo (en horas) de un ritmo, se define en relación con un punto clave del ritmo, típicamente los valores altos o bajos recurrentes en cada ciclo.

- iii. Desfase: Desplazamiento (en tiempo; horas) de la fase un ritmo o ciclo respecto a una fase de un ritmo previsto o estándar.
- iv. Periodo: Tiempo que demora un ciclo en repetirse, es decir corresponde a la duración de un ciclo. En un ciclo/ritmo circadiano, se asume en el modelamiento un periodo de 24 h.
- v. Mesor (Midline Statistic of Rhythm) o baseline: Línea media dentro de un ritmo.



**Figura 2. Parámetros que caracterizan un ritmo (39).**

Los gráficos de los ritmos de expresión de los genes reloj y *ccha-2* y el Análisis Cosinor se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 9.0.3. La curva generada en el tiempo se muestra tanto en hora cronológica local (CT; Chronological Time) como su equivalente en hora Zeitgeber (ZT).



## 5.6 Técnicas estadísticas de análisis

El nivel de rechazo de hipótesis nula se estableció en  $valor-p < 0,05$  y los resultados se expresan en medias y desviación estándar. Para la comparación de las medias de peso, glicemia, contenido de TAGs totales y veces de cambio de los niveles de ARNm de los genes evaluados entre los grupos experimentales se utilizó la prueba de Wilcoxon Mann-Whitney, también conocida como U Mann Whitney. Para los casos en que se compararon más de dos condiciones experimentales, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis seguido de una prueba post-hoc de Dunn para comparaciones múltiples. Por otro lado, para evaluar la diferencia de las medias, de distintos tiempos, se usó la prueba de Friedman. Por último, para la determinación de la existencia de un ritmo/ciclo circadiano se usó el Análisis Cosinor y la Prueba-F. Los detalles de la aplicación de este test, y los resultados de estos análisis se encuentran en los Anexos 1 y 2 respectivamente.

En trabajos publicados que utilizan Análisis Cosinor, se presentan directamente la amplitud o acrofase pertenecientes a los grupos experimentales, cuando se obtiene solo una curva o ritmo por grupo, y solo cuando hay múltiples curvas en cada grupo experimental, utilizan el promedio de los valores de los parámetros de dichas curvas, para aplicar pruebas estadísticas (41) (42). De igual forma, en este trabajo de tesis, la comparación de los ritmos transcripcionales entre grupos experimentales se efectuó observando directamente la magnitud de los parámetros de amplitud o fase. Esto, dado que se generó un solo ritmo o curva transcripcional por grupo y no múltiples para estimar un promedio y poder aplicar una prueba estadística. Por lo tanto, se determinó que un cambio en algún parámetro del ritmo igual o mayor a un 20% en el grupo TRF (HFD o CD) se consideraría distinto de la condición AL. Esta decisión se basa en antecedentes de otros estudios *Drosophila* y en ratones (14) (15) (28) (43) en los cuales se registran cambios biológicamente relevantes y estadísticamente significativos en aspectos metabólicos y fisiológicos, cuyas magnitudes se encuentran entre un 9 a 40% respecto a un control, asociados a una

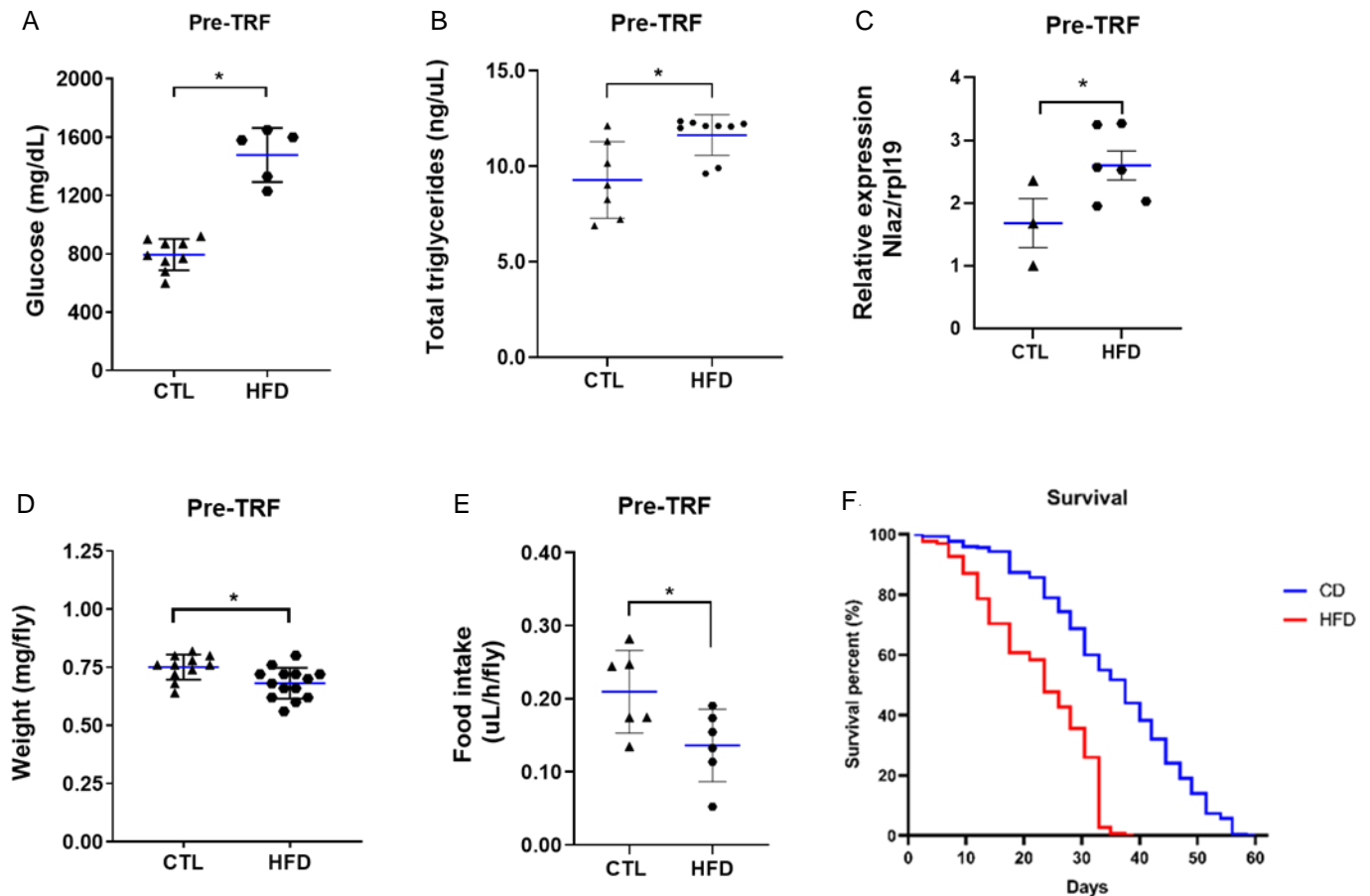
mejoría en la ritmicidad o aumento del peak de expresión génica (incluyendo genes reloj) luego de un periodo de intervención TRF. Además, se fundamenta en un hallazgo de cambios de un 17% y un 23% en el promedio de la acrofase de un conjunto de ciclos circadianos en modelos murinos, daba cuenta de una disrupción de ritmos circadianos (41) (44).

## 6. Resultados

### 6.1 HFD por diez días induce daño metabólico en moscas adultas macho.

A los diez días de exposición a HFD, previo a la intervención TRF (“pre-TRF”), las moscas *Drosophila melanogaster* presentaron mayor glucosa en hemolinfa (**Fig. 3A**), en comparación con aquellas alimentadas con CD (grupo CTL). Asimismo, se observó un mayor nivel de TAGs totales (**Fig. 3B**) y expresión del marcador de resistencia a la insulina Nlaz en el grupo HFD en comparación al grupo CTL (**Fig. 3C**). Además, las moscas mostraron una menor masa respecto a las moscas del grupo CTL (**Fig. 3D**).

Por otra parte, las moscas alimentadas con HFD mostraron menor ingesta promedio en 2 h que las moscas CTL (**Fig. 3E**). Sin embargo, dado que HFD tiene un 64% más de densidad calórica (kcal/ $\mu$ L de alimento), la ingesta energética de las moscas alimentadas con HFD fue un 6,5% mayor que las alimentadas con CD (Anexo 3). Complementariamente, también evaluamos el impacto de HFD en la sobrevivencia de las moscas. Se observó que HFD disminuyó en 31% la vida media de las moscas respecto al grupo CTL (**Fig. 3F**). En conjunto, estas observaciones confirman el impacto negativo de HFD por 10 días, reflejado en aumento de acumulación de grasas, “hiperglicemia”, resistencia a la insulina y menor vida media.



**Fig. 3. Efectos de la exposición a HFD por diez días en machos de *Drosophila melanogaster*.** Moscas macho, cepa Cantonese S., fueron alimentadas por diez días con CD o HFD. (A) Glucosa en hemolinfa. n=45-50 animales por punto, en 3-4 experimentos independientes. (B) TAGs totales n=5 animales por punto y 2 réplicas técnicas por punto en 3-4 experimentos independientes. (C) Expresión relativa (RT-qPCR) de Nlaz en cuerpo. n = 25-30 animales por punto en 3 experimentos independientes. (D) Masa de las moscas. n=5 animales por punto y cada punto corresponde a la masa promedio de las 5 moscas, con 3 réplicas técnicas en 3-4 experimentos independientes por grupo. (E) Ingesta estimada de alimento. n=4 animales por punto y 3 réplicas técnicas por punto en 3-4 experimentos independientes por grupo. (\*) representa  $p < 0,05$ . Test de Mann-Whitney. (F) Curva de sobrevivencia de moscas Cantonese alimentadas con CD o HFD hasta su muerte. n=300 animales por grupo.

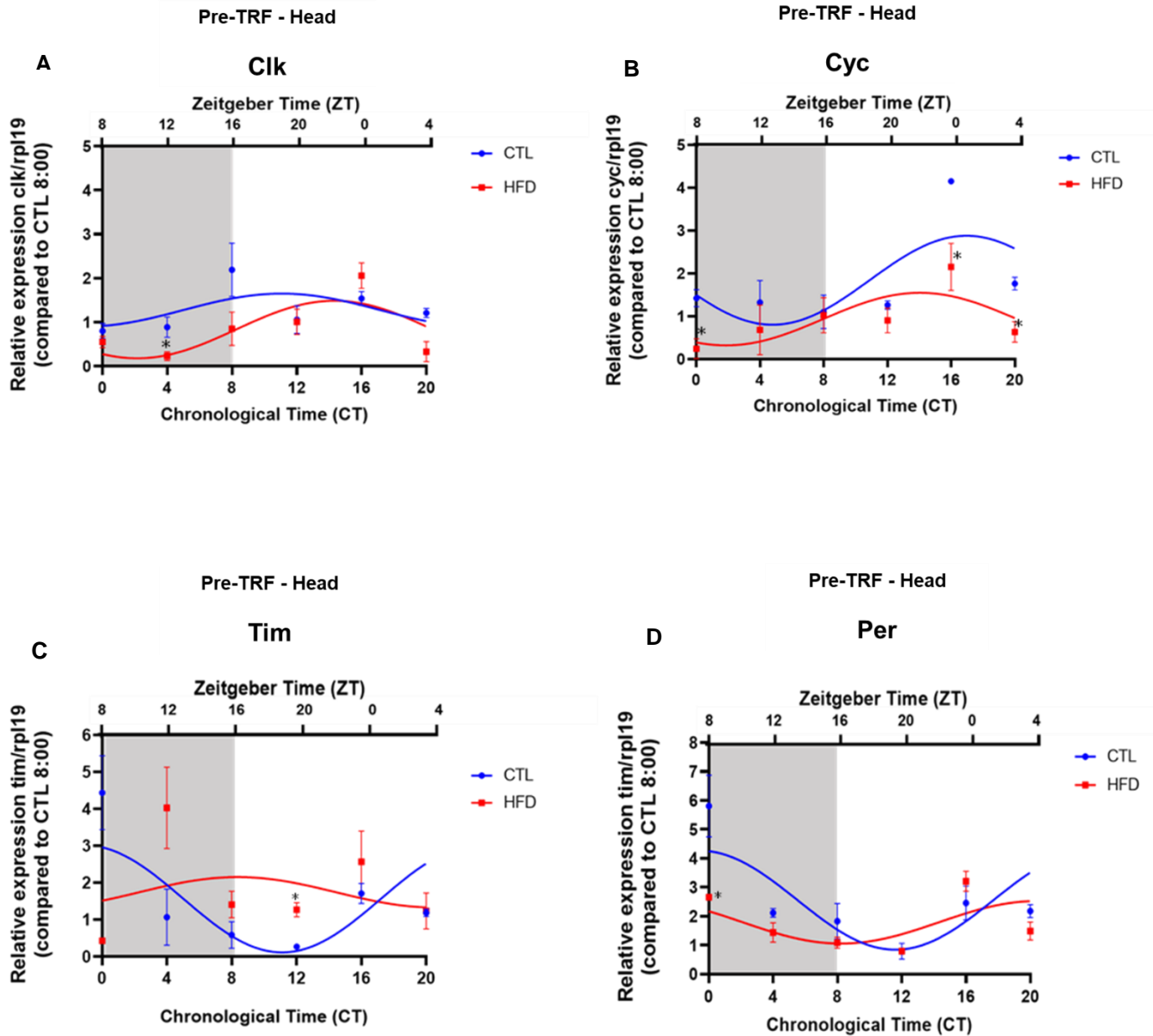
## 6.2 Las moscas macho exhibieron ritmos circadianos de expresión de genes reloj y Ccha2 alterados luego de un periodo de diez días de HFD

Estudiamos el efecto de HFD sobre la expresión circadiana de los genes del reloj molecular central y periférico evaluada como ritmos, y observamos que las moscas macho expuestas a HFD por diez días mostraron cambios en la forma de las curvas de los ritmos circadianos en comparación con el grupo CTL (**Fig. 4 A-I**).

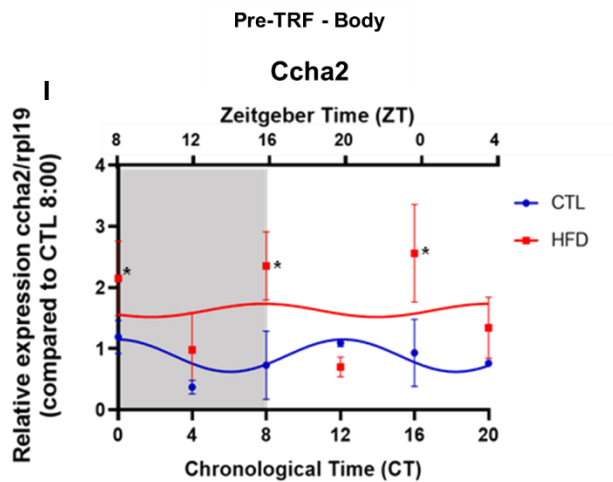
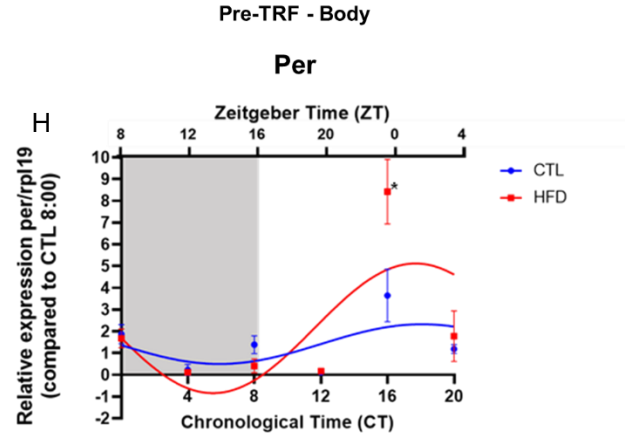
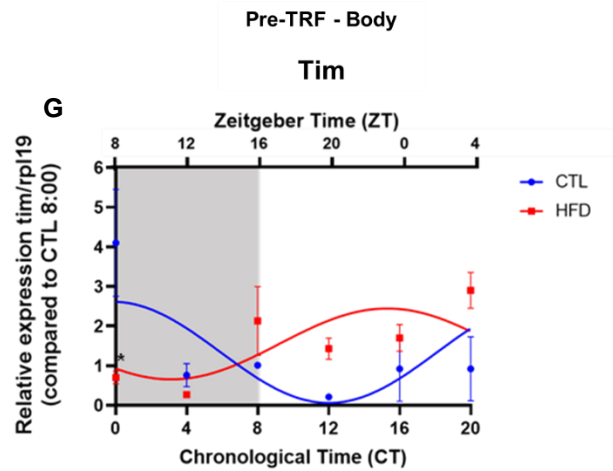
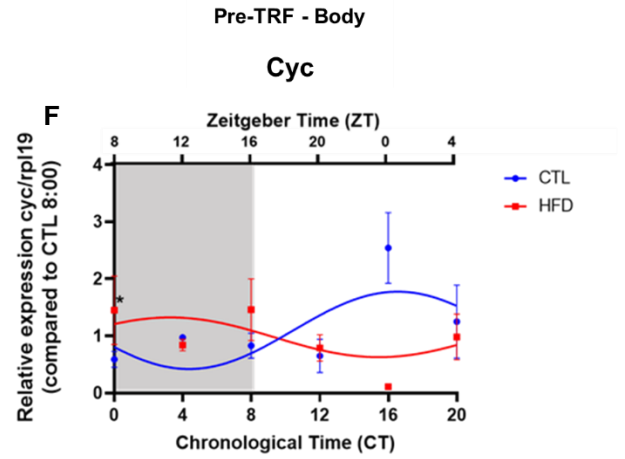
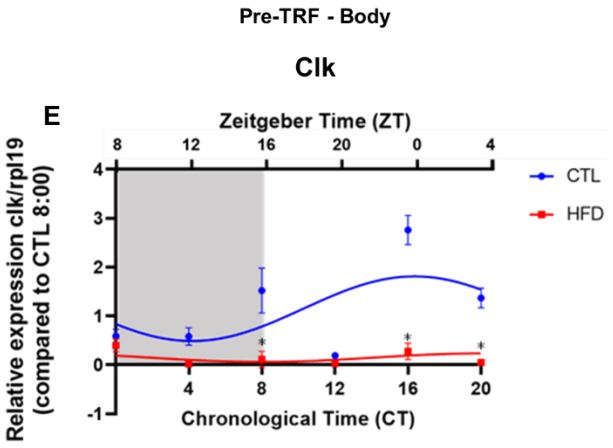
En general, HFD por diez días provocó una disminución de la amplitud del ritmo de expresión de todos los genes (Clk, Cyc, Tim, y Per) evaluados en el reloj central (head) en comparación con el CTL (**Fig. 4A-D, Tabla 2**). Además, se identificaron cambios en parámetro de desfase de los ciclos transcripcionales de Clk y Per (**Fig. 4Ay D, Tabla 2**), y visualmente se observa una fase retrasada o más tardía en los ritmos de Clk y Tim, mientras que se observa adelantada en Cyc (**Fig. 4 A-C, Tabla 2**). También se observó que los ritmos transcripcionales de los genes Clk, Cyc y Per tuvieron un desplazamiento vertical en su curva/onda, reflejado en una disminución de sus mesores, indicando menor intensidad del ritmo (**Fig. 4A, B y D, Tabla 2**).

Por otro lado, en el reloj periférico (body), en el grupo HFD comparado con el CTL, se observó una disminución en la amplitud del ritmo de Clk y Ccha2 y un aumento en Per (**Fig. 4E, H e I, Tabla 2**). Además, respecto al desfase de las curvas tuvo cambios tanto en genes activadores como represores del reloj molecular periférico. Se produjo una fase adelantada en el ritmo de Cyc (**Fig.4F**) y una fase atrasada en Tim (**Fig.4G**), observándose una inversión de las fases de los ritmos de Cyc y Tim en condiciones HFD. Además, destaca un aplanamiento de las curvas de Clk (**Fig. 4E**) y de Ccha2 (**Fig. 4I**), en las que también se observaron cambios en el mesor, lo que también fue identificado en la curva de Per (**Fig.4 H**).

## Head



**Body**



**Fig. 4. Ritmo de expresión circadiana de genes del reloj molecular central y periférico luego de diez días de HFD o CD en machos de *Drosophila melanogaster*.** Ritmo de expresión relativa evaluada a partir de RT-qPCR cada 4 h de (A) Clk, (B) Cyc, (C) Tim y (D) Per en cabezas y de (E) Clk, (F) Cyc, (G) Tim, (H) Per e (I) Ccha2 en cuerpos descabezados de moscas alimentadas con CD (azul) o HFD (rojo) por 10 días. \* $p < 0,05$ . Test de Mann-Whitney para comparaciones en un horario específico.  $n=25-30$  cabezas de moscas por punto, 3 puntos obtenidos de una réplica técnica por horario de medición, para cada grupo experimental en paralelo. Cada punto o cuadrado representa la media, y las barras, su respectiva desviación estándar. La zona en color gris indica la fase de oscuridad (noche, luces apagadas). El eje X inferior muestra la hora cronológica local (CT) y el eje X superior la equivalencia en hora Zeitgeber (ZT).



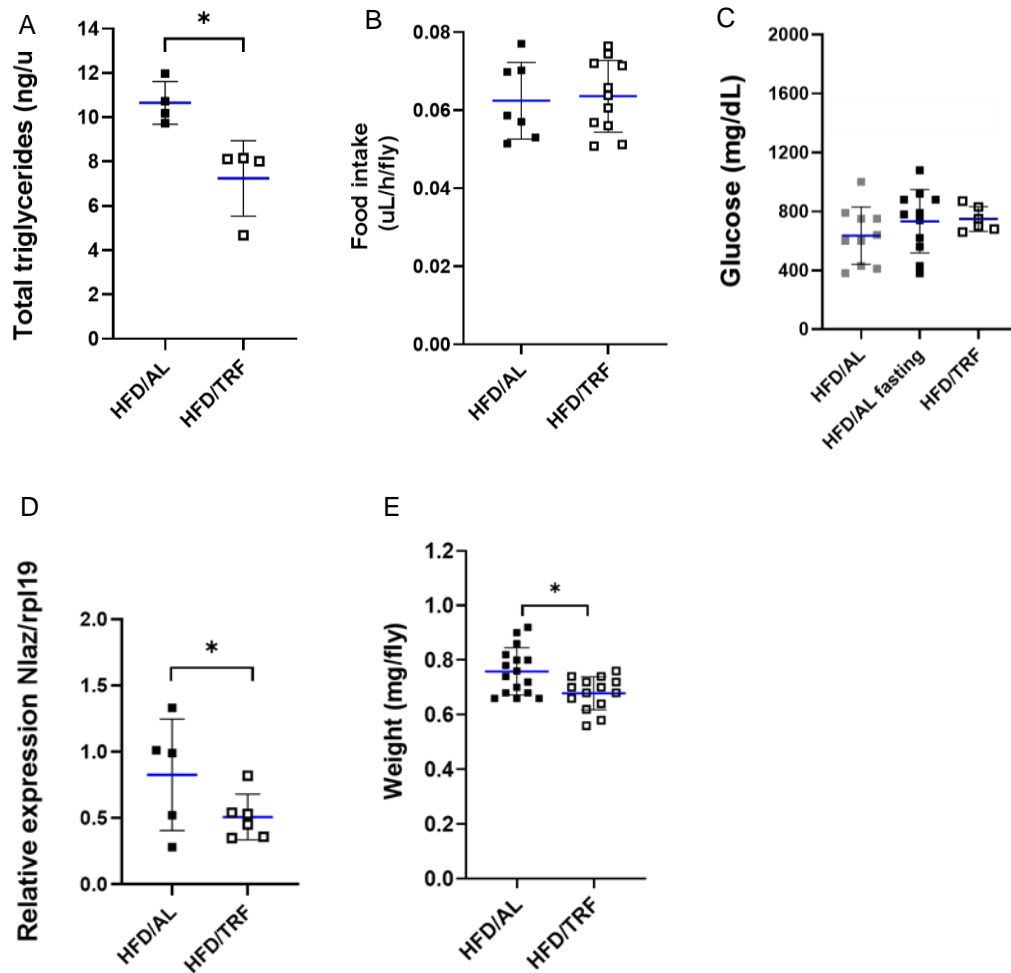
**Tabla 2.** Parámetros del ritmo circadiano de expresión de genes activadores y represores del reloj molecular central y periférico en moscas macho alimentadas con CD (grupo CTL) o HFD por diez días.

Reloj Central			Reloj Periférico		
Clk	CTL	HFD	Clk	CTL	HFD
Amplitud (veces de cambio) #	0,37	0,65*	Amplitud (veces de cambio)	0,66	0,08*
Desfase (h)	-4:53	3:54 *	Desfase (h)	1:52	-1:52 *
Mesor o baseline (veces de cambio)	1,28	0,83*	Mesor o baseline (veces de cambio)	1,15	0,15*
Cyc	CTL	HFD	Cyc	CTL	HFD
Amplitud (veces de cambio)	1,04	0,61*	Amplitud (veces de cambio)	0,43	0,35
Desfase (h)	1:18	-	Desfase (h)	2:08	-5:16*
Mesor o baseline (veces de cambio)	1,84	0,93*	Mesor o baseline (veces de cambio)	1,05	0,97
Tim	CTL	HFD	Tim	CTL	HFD
Amplitud (veces de cambio)	1,45	0,41*	Amplitud (veces de cambio)	1,04	0,88
Desfase (h)	-	2:15	Desfase (h)	19:08	18:58
Mesor o baseline (veces de cambio)	1,56	1,74*	Mesor o baseline (veces de cambio)	1,68	1,55
Per	CTL	HFD	Per	CTL	HFD
Amplitud (veces de cambio)	1,71	0,73*	Amplitud (veces de cambio)	0,91	2,98*
Desfase (h)	-17:27	-2:06*	Desfase (h)	0:11	0:34*
Mesor o baseline (veces de cambio)	2,56	1,79*	Mesor o baseline (veces de cambio)	1,41	2,14*
*indica >20% de cambio en el parámetro comparado con la condición CTL.  #Veces de cambio del gen evaluado respecto del gen <i>housekeeping</i> en comparación a una muestra CTL de las 08:00 h.			Ccha2	CTL	HFD
			Amplitud (veces de cambio)	0,26	0,11*
			Desfase (h)	1:06	0:27*
			Mesor o baseline (veces de cambio)	0,89	1,63*

### 6.3 Efectos de la intervención TRF en moscas macho con daño metabólico y resistencia a la insulina que continúan en HFD.

Respecto al primer objetivo específico de la presente Tesis (evaluar el efecto de TRF de 12 h sobre marcadores de acumulación de grasas), se obtuvo que en el grupo HFD/TRF no se presentó el aumento de los TAGs totales observado en HFD/AL (**Fig. 5A**). Este efecto no es atribuible a un eventual menor volumen de ingesta de alimento (o ingesta energética), ya que no existen diferencias respecto a la ingesta de las moscas en HFD/AL (**Fig. 5B, anexo 4**).

Con relación al segundo objetivo, en el que se evaluaron marcadores del metabolismo energético y resistencia a la insulina, no observamos diferencias entre el grupo con régimen TRF respecto a la condición AL en glucosa circulante, tanto en condiciones habituales de disponibilidad de alimento, como después de un ayuno nocturno de 12 h (**Fig. 5C**). Sin embargo, se observó un menor nivel de expresión relativa de ARNm de *Nlaz* en el grupo HFD/TRF, (**Fig. 5D**). También, las moscas HFD/TRF tuvieron menor masa corporal que las HFD/AL (**Fig. 5E**), lo que posiblemente corresponda a menor masa adiposa. Por otro lado, las moscas HFD/TRF no presentaron diferencias en el peso promedio comparado con el grupo CTL a los 17 días (datos no mostrados), lo que permite especular que las moscas HFD/TRF perdieron peso.



**Fig. 5. Impacto del régimen de alimentación TRF sobre parámetros metabólicos en moscas mantenidas en HFD.** (A) Triglicéridos totales. n=5 animales por punto y 2 réplicas técnicas por punto en 4 experimentos independientes. (B) Ingesta estimada de alimento. n=4 animales por punto y 3 réplicas técnicas por punto en 3-4 experimentos independientes por grupo. (C) Glucosa en hemolinfa. n=45-50 animales por punto, en 3 experimentos independientes. Los símbolos grises representan mediciones tomadas entre las 8:00 a 9:00 hrs en condiciones de disponibilidad de alimento. Los símbolos negros representan la medición luego del ayuno de una noche. Letras distintas indican  $p < 0,05$  Test de Kruskal Wallis y Test de comparaciones múltiples de Dunn. (D) Expresión relativa (RT- qPCR) de Niiaz en cuerpo. n= 25-30 animales por punto en 3 experimentos independientes. (E) Masa de moscas HFD. n=5 animales por punto y cada punto corresponde a la masa promedio de las 5 moscas, con 3 réplicas técnicas en 3-4 experimentos independientes por grupo. \* $p < 0,05$ . Test de Mann-Whitney.

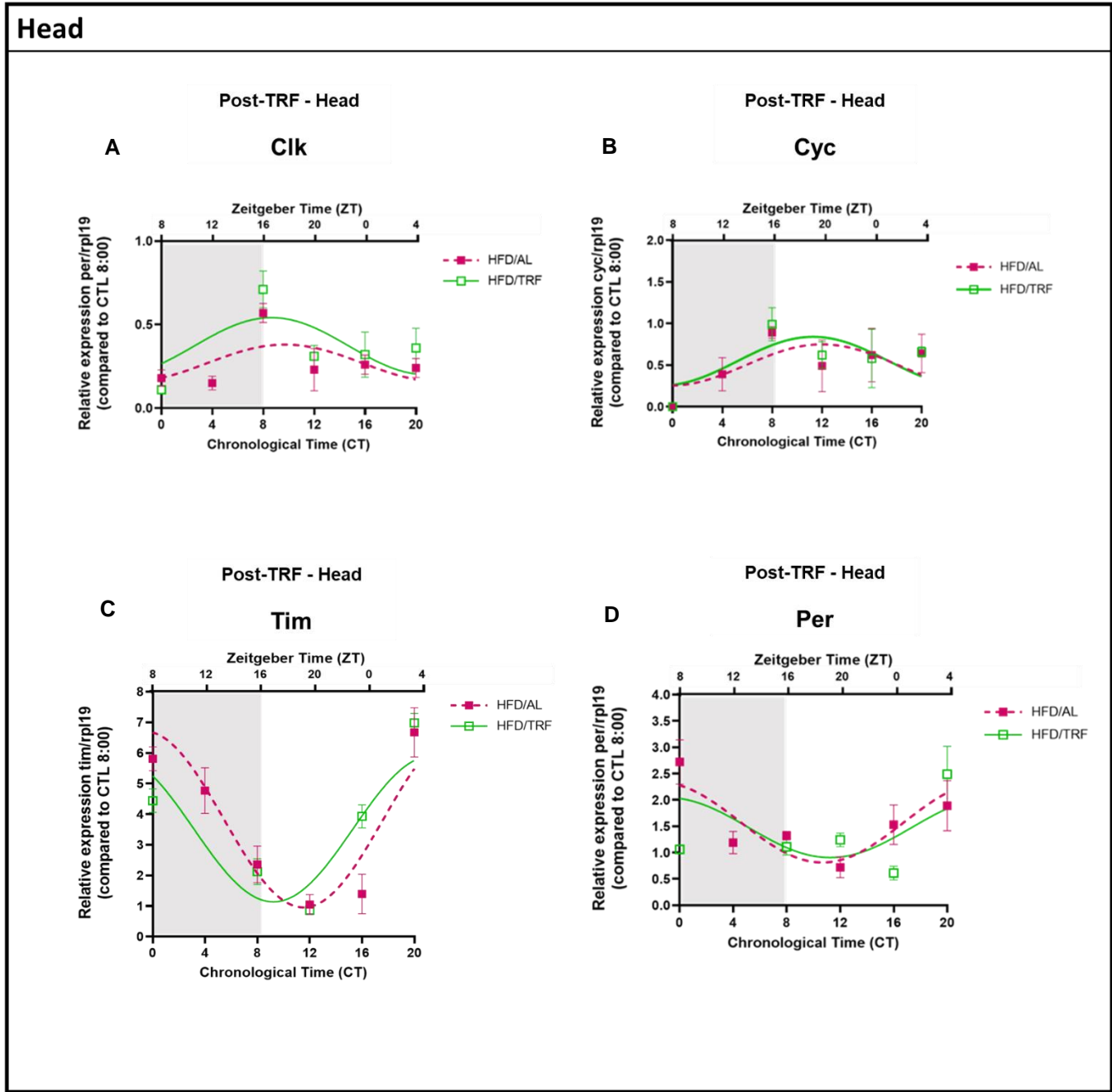
#### 6.4 Efecto de TRF en el ritmo circadiano de expresión de genes del reloj molecular central y periférico y de Ccha2 en moscas alimentadas con HFD

Concerniente al tercer objetivo específico de este estudio, se evaluó el impacto del régimen TRF sobre el ritmo circadiano de transcripción (niveles de ARNm) de Clk, Cyc, Tim y Per, y del neuropéptido Ccha2 en moscas previamente sometidas a HFD por diez días y que continuaron con una alimentación HFD (**Fig. 6A-I**). Observamos al final de la intervención HFD/TRF (“Post-TRF”), a nivel central (Head) una mayor amplitud en el ritmo de expresión de Clk y aumento en su mesor (**Fig. 6A, Tabla 3**). Sin embargo, al comparar los valores finales (post intervención) en ambos grupos con los ritmos de moscas CTL de la misma edad (que nunca consumieron HFD), se identificó una menor amplitud para todos los genes (**Tabla 3, anexo 5 y 6**).

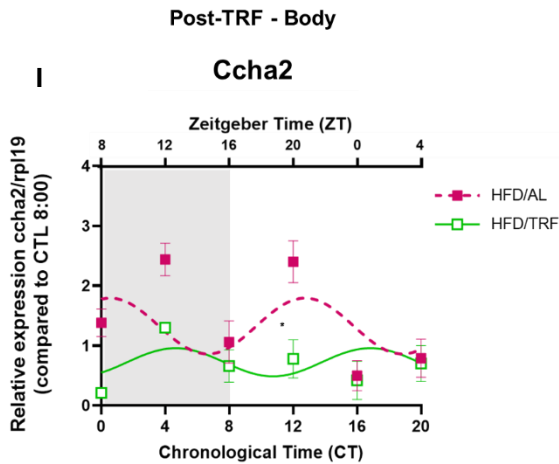
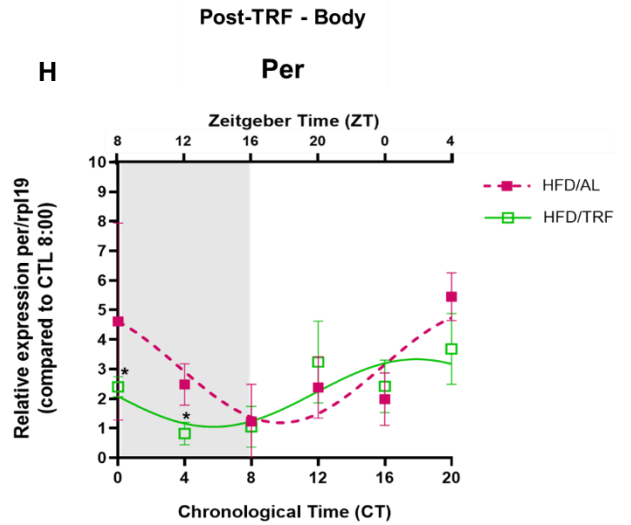
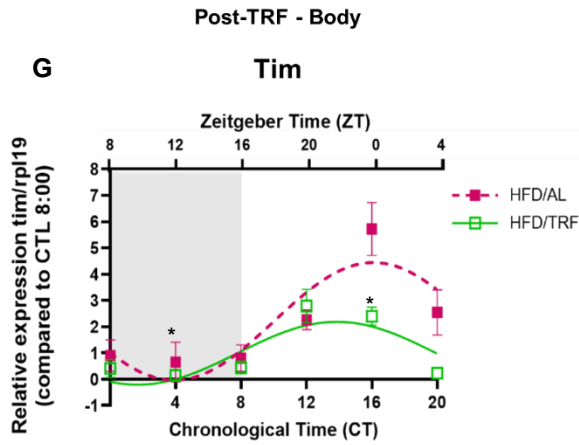
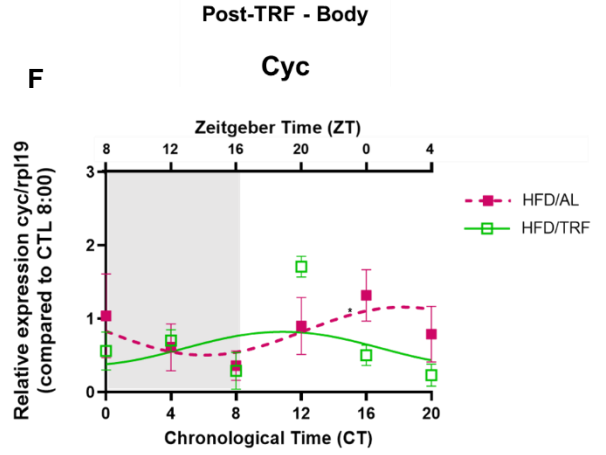
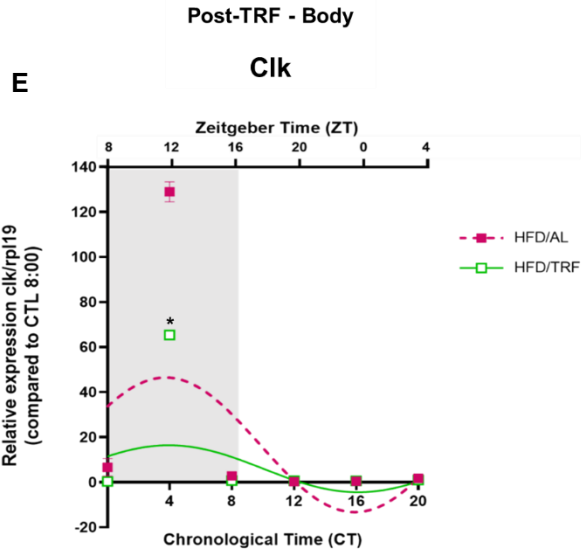
En cuanto al reloj periférico (body), se observó en general una menor amplitud de los ritmos circadianos de expresión en el grupo HFD/TRF (**Fig. 6E-I, Tabla 3**) y también cambios en el desfase del ciclo, comparados con el grupo HFD/AL. En los ritmos de Cyc (**Fig. 6F**), Tim (**Fig. 6G**) y Per (**Fig. 6H**) se observó una fase más adelantada, en comparación HFD/AL. En cambio, el ritmo transcripcional de Ccha2 mostró una fase más tardía respecto a la condición AL (**Fig. 6I**). Los cambios en los desfases de las curvas de los genes reloj periférico y Ccha2 en el grupo HFD/TRF no exhibieron un único efecto de la intervención. Es decir, encontramos tanto aumento como disminución del tiempo de desplazamiento de las fases (**Tabla 3**). También, se identificaron mesores más bajos en las curvas de Clk, Tim, Per y Ccha2.

Por otro lado, en comparación con los ritmos CTL de la misma edad, ambos grupos HFD presentaron mesores distintos a las de moscas CTL, siendo más altos o bajos en los distintos ciclos transcripcionales evaluados (**Anexo 6**). Adicionalmente, los *peaks* de expresión de los genes Clk y Tim se observaron en fases del día opuestas a las exhibidas en los ritmos del grupo CTL; encontrándose el peak de Clk en la fase

de oscuridad (noche) (**Fig. 6E**) en los grupos HFD y en la fase luminosa (día) en el CTL (**Anexo 5E, G**), mientras que se observa lo opuesto en el ciclo de Tim (**Fig. 6G, Anexo 5G**).



Body



**Fig. 6. Efecto de una semana de TRF sobre el ritmo de expresión circadiana de genes del reloj molecular central y periférico y de Ccha2 en moscas alimentadas con HFD.**

Ritmo de expresión relativa evaluada por RT-qPCR cada 4 h de (A) Clk, (B) Cyc, (C) Tim y (D) Per en cabezas de moscas (medición Post-TRF) y de (E) Clk, (F) Cyc, (G) Tim, (H) Per e (I) Ccha2 en cuerpos descabezados. \* $p < 0,05$ . Test de Mann-Whitney para comparaciones en un horario específico.  $n = 25-30$  cabezas de moscas por punto, 3 puntos obtenidos de una réplica técnica por horario de medición, para cada grupo experimental en paralelo. Cada cuadrado representa la media, y las barras, su respectiva desviación estándar. La zona en color gris indica la fase de oscuridad (noche, luces apagadas). El eje X inferior muestra la hora local (CT) y el eje X superior la equivalencia en hora Zeitgeber (ZT).

**Tabla 3.** Parámetros del ritmo circadiano de expresión de genes clock activadores y represores del reloj molecular central y periférico en moscas alimentadas con HFD.

Reloj central			Reloj periférico		
Clk	HFD/AL	HFD/TRF	Clk	HFD/AL	HFD/TRF
Amplitud (veces de cambio) #	0,11	0,17*	Amplitud (veces de cambio)	23,87	23,41
Desfase (h)	-3:55	-2:24*	Desfase (h)	2:17	2:06
Mesor o baseline (veces de cambio)	0,27	0,37*	Mesor o baseline (veces de cambio)	16,58	5,96*
Cyc	HFD/AL	HFD/TRF	Cyc	HFD/AL	HFD/TRF
Amplitud (veces de cambio)	0,25	0,29	Amplitud (veces de cambio)	0,33	0,22
Desfase (h)	-	-	Desfase (h)	0:02	-4:42 *
Mesor o baseline (veces de cambio)	0,5	0,54	Mesor o baseline (veces de cambio)	0,83	0,6
Tim	HFD/AL	HFD/TRF	Tim	HFD/AL	HFD/TRF
Amplitud (veces de cambio)	2,88	2,39	Amplitud (veces de cambio)	2,24	1,19*
Desfase (h)	6:58	6:52	Desfase (h)	2:08	-7:38*
Mesor o baseline (veces de cambio)	3,83	3,52	Mesor o baseline (veces de cambio)	2,2	0,99*
Per	HFD/AL	HFD/TRF	Per	HFD/AL	HFD/TRF
Amplitud (veces de cambio)	1,89	1,14	Amplitud (veces de cambio)	1,88	1,14*
Desfase (h)	3:35	-0:22*	Desfase (h)	-3:35	0:20 *
Mesor o baseline (veces de cambio)	3,07	2,19*	Mesor o baseline (veces de cambio)	3,09	2,19*
* Indica >20% de cambio en el parámetro comparado con la condición AL.  #Veces de cambio del gen evaluado respecto del gen <i>housekeeping</i> en comparación a una muestra CTL de las 08:00 h.			Ccha2	HFD/AL	HFD/TRF
			Amplitud (veces de cambio)	0,47	0,23*
			Desfase (h)	5:04	-2:45*
			Mesor o baseline (veces de cambio)	1,34	0,7*

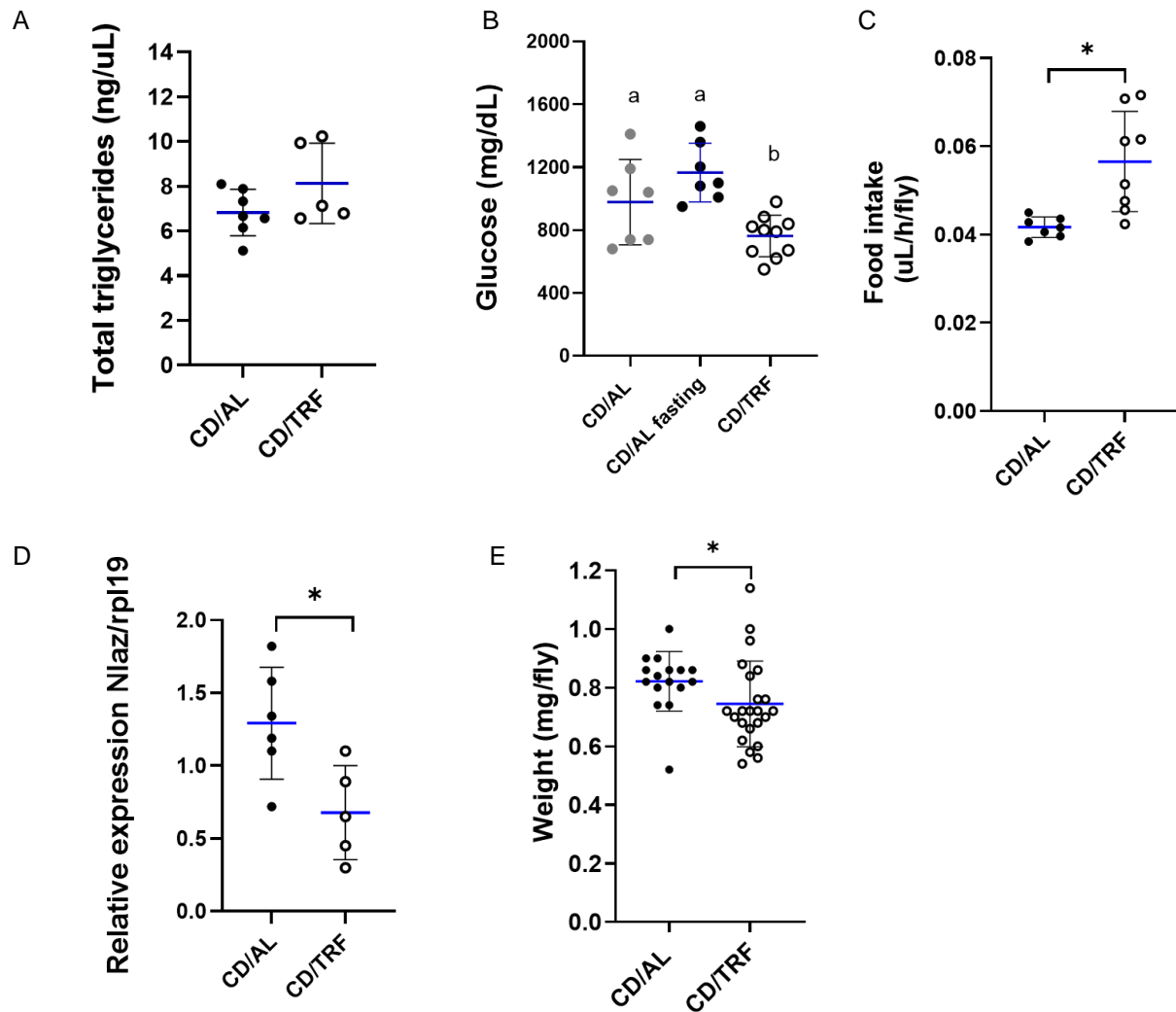


### 6.5 Efecto de TRF en moscas macho con daño metabólico y resistencia a la insulina alimentadas con CD

Al evaluar el contenido de triglicéridos totales de moscas macho previamente sometidas a HFD y que durante la intervención TRF (o AL) se cambiaron a una alimentación con CD, no se identificaron diferencias entre el grupo TRF y AL (**Fig. 7A**). Por otro lado, observamos que el grupo CD/TRF mostró un menor nivel de glucosa en hemolinfa en comparación con el grupo CD/AL (**Fig. 7B**), lo cual no puede ser explicado por la cantidad de alimento ingerido en los grupos, pues CD/TRF presentó mayor consumo de alimento que el grupo CD/AL (**Fig. 7C y Anexo 4**).

Consistentemente con lo observado en los niveles de glucosa circulante, el grupo TRF mostró menores niveles de expresión de Nlaz en comparación con el grupo AL (**Fig. 7D**). El grupo TRF mostró también menor masa respecto a la condición AL (**Fig. 7E**).

Los valores promedio de las variables de glucosa circulante, TAGs totales y peso de los grupos experimentales post-TRF y sus porcentajes de cambios se encuentran en el Anexo 7.



**Fig. 7. Impacto del régimen de alimentación TRF sobre parámetros metabólicos en moscas previamente alimentadas con HFD que fueron cambiadas a una alimentación CD.** (A) Triglicéridos totales. n=5 animales por punto y 2 réplicas técnicas por punto en 3-4 experimentos independientes. (B) Glucosa en hemolinfa. n=45-50 animales por punto, en 3 experimentos independientes. Símbolos grises representan mediciones tomadas entre las 08:00 - 09:00 hrs en condiciones de disponibilidad de alimento. Los símbolos negros representan la medición luego del ayuno de una noche. Letras distintas indican  $p < 0,05$  Test de Kruskal-Wallis y Test de comparaciones múltiples de Dunn. (C) Ingesta estimada de alimento. n=4 animales por punto y 3 réplicas técnicas por punto en 3-4 experimentos independientes por grupo. (D) Expresión relativa (RT-qPCR) de Niaz en cuerpo. n= 25-30 animales por punto en 3 experimentos independientes. (E) Masa de las moscas. n=5 animales por punto y cada punto corresponde a la masa promedio de las 5 moscas, con 3 réplicas técnicas en 3-4 experimentos independientes por grupo. \* $p < 0,05$ . Test de Mann-Whitney.

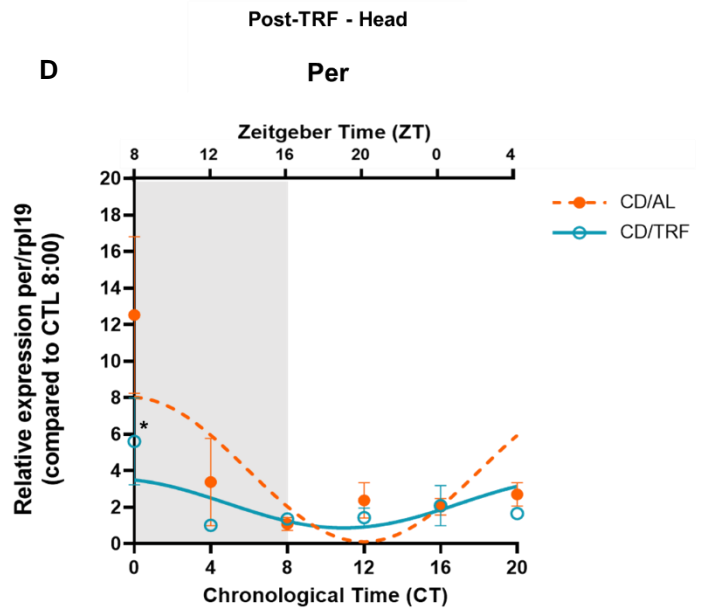
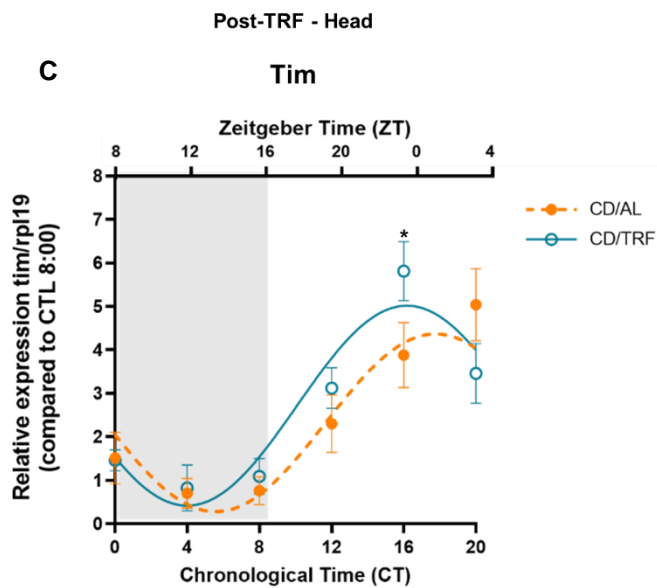
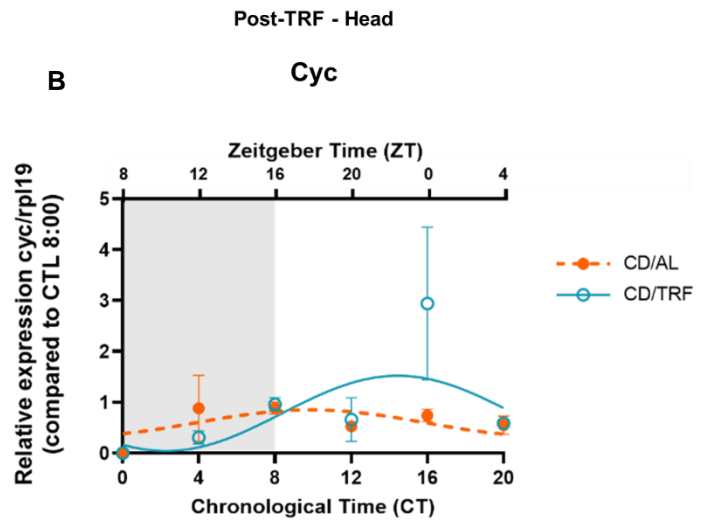
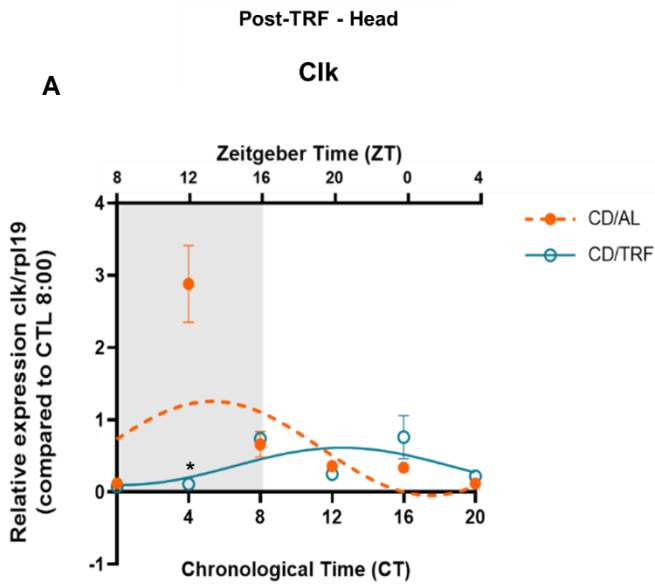
### 6.6 Efectos de TRF en el ritmo circadiano de expresión genes del reloj molecular central y periférico y de Ccha2 en moscas macho con daño metabólico y resistencia a la insulina que fueron cambiadas a CD

La evaluación de los ritmos de expresión de Clk, Cyc, Tim y Per en cabeza de moscas, como reflejo del reloj central (Head), mostró más de un efecto de TRF sobre los parámetros evaluados, en comparación con el grupo AL. El ritmo de transcripción del grupo con régimen TRF mostró menor amplitud en Clk y una fase más tardía en comparación a las moscas con alimentación AL (**Fig. 8A, Tabla 4**), mayor amplitud de Cyc, que también mostró una fase más tardía y un mayor mesor (**Fig. 8B, Tabla 4**), una mayor magnitud de desfase de Tim (**Tabla 4**) y menor amplitud y mesor en el ritmo de Per respecto a lo observado en el grupo AL (**Fig. 8D, Tabla 4**).

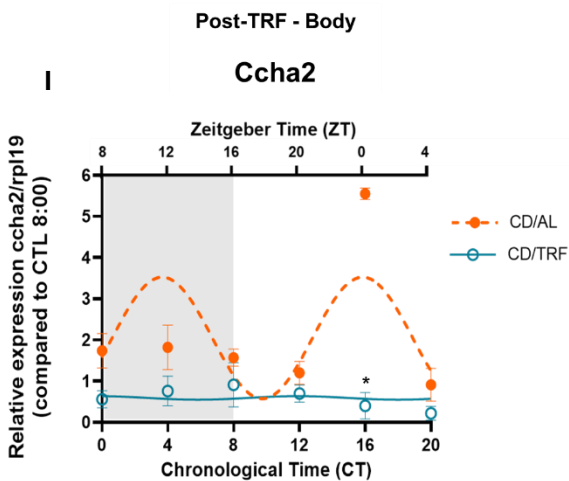
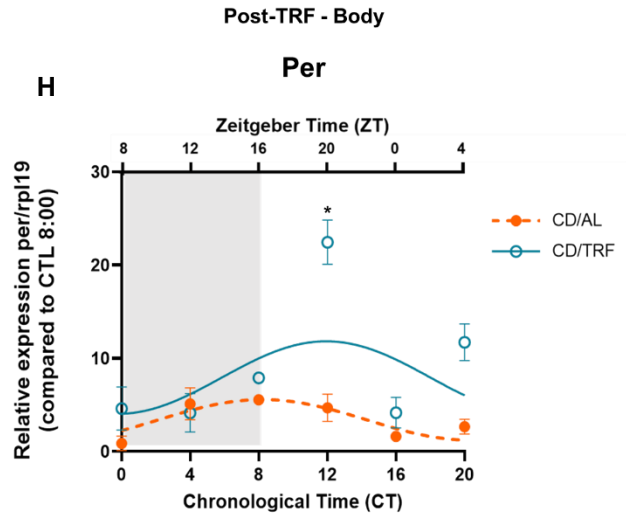
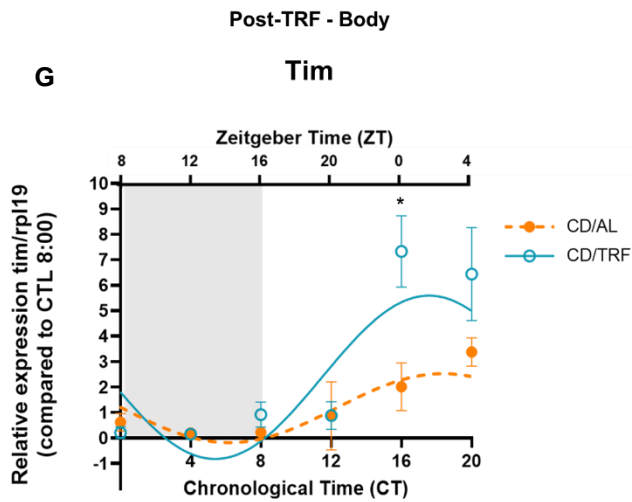
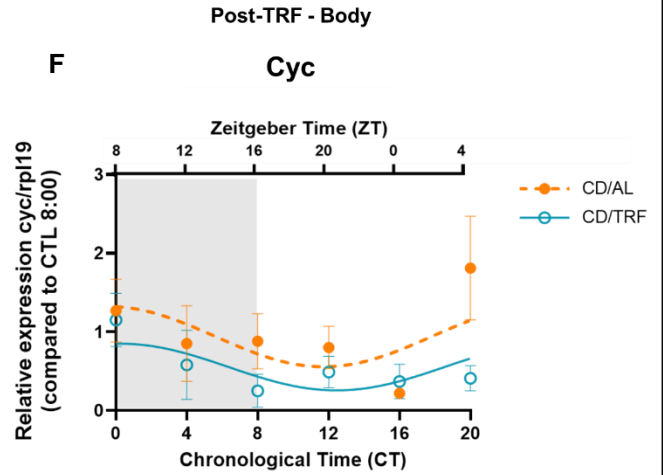
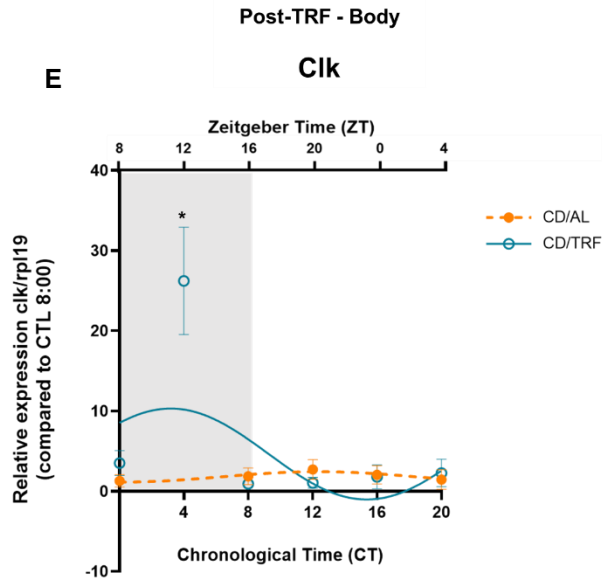
En cuanto al reloj periférico (body), Clk mostró un ritmo con mayor amplitud y una fase más adelantada en comparación con CD/AL, cuya curva muestra un aplanamiento del ritmo (**Fig. 8E, Tabla 4**). También se observa un aumento de la amplitud en el ritmo de Tim y Per en moscas con intervención TRF en comparación al grupo AL (**Fig. 8G y H, Tabla 4**). En el ritmo de Per también se observó una fase más tardía y una mayor magnitud de desfase en el grupo CD/TRF comparado con CD/AL (**Fig. 8 H, Tabla 4**). Por otro lado, en base a nuestros datos transcripcionales, no se observa un ritmo circadiano para el gen Ccha2 en la condición TRF (**Fig. 8I, Tabla 4**), lo cual posiblemente puede estar reflejado en la mayor ingesta observada en CD/TRF (**Fig. 6E**).

Al comparar los valores de ambos grupos CD (AL y TRF) con los ritmos de moscas CTL, se identificó una menor amplitud en los ritmos del gen Clk del reloj central (**Fig. 8A, Anexo 5A, Tabla 4**). No obstante, al realizar la Prueba-F, se determinó que no había un ritmo para la expresión temporal de Cyc en cabeza y cuerpo en las muestras obtenidas de moscas CTL (**Anexo 5B y F, Tabla 4**).

Head



Body



**Fig. 8. Efecto de una semana de TRF en el ritmo de expresión circadiana de genes del reloj molecular central y periférico y de Ccha2 en moscas previamente alimentadas con HFD que fueron cambiadas a una alimentación CD.** Ritmo de expresión relativa evaluada por RT-qPCR cada 4 h de (A) Clk, (B) Cyc, (C) Tim y (D) Per en cabezas de moscas (mediciones Post-TRF) y de (E) Clk, (F) Cyc, (G) Tim, (H) Per e (I) Ccha2 en cuerpos descabezados. \* $p < 0,05$ . Test de Mann-Whitney para comparaciones en un horario específico.  $n=25-30$  cabezas de moscas por punto, 3 puntos obtenidos de una réplica técnica por horario de medición, para cada grupo experimental en paralelo. Cada punto o cuadrado representa la media, y las barras, su respectiva desviación estándar. La zona en color gris indica la fase de oscuridad (noche, luces apagadas). El eje X inferior muestra la hora local (CT) y el eje X superior la equivalencia en hora Zeitgeber (ZT).

**Tabla 4.** Parámetros del ritmo circadiano de expresión de genes clock activadores y represores del reloj molecular central y periférico en moscas alimentadas con HFD que luego fueron cambiadas a una alimentación CD.

Reloj central			Reloj periférico		
Cik	CD/AL	CD/TRF	Cik	CD/AL	CD/TRF
Amplitud (veces de cambio)	0,65	0,26*	Amplitud (veces de cambio)	0,65	5,67*
Desfase (h)	0:45 h	17:36*	Desfase (h)	-	2:28
Mesor o baseline (veces de cambio)	0,6	0,36*	Mesor o baseline (veces de cambio)	1,78	4,6*
Cyc	CD/AL	CD/TRF	Cyc	CD/AL	CD/TRF
Amplitud (veces de cambio)	0,26	0,73*	Amplitud (veces de cambio)	0,38	0,29*
Desfase (h)	-3:42	3:44	Desfase (h)	-17:31	29,72
Mesor o baseline (veces de cambio)	0,59	0,78*	Mesor o baseline (veces de cambio)	0,93	0,55*
Tim	CD/AL	CD/TRF	Tim	CD/AL	CD/TRF
Amplitud (veces de cambio)	2,04	2,3	Amplitud (veces de cambio)	1,35	3,2*
Desfase (h)	0:30	2:36*	Desfase (h)	-0:06	0:41*
Mesor o baseline (veces de cambio)	2,32	2,72	Mesor o baseline (veces de cambio)	1,17	2,39*
Per	CD/AL	CD/TRF	Per	CD/AL	CD/TRF
Amplitud (veces de cambio)	3,84	1,3*	Amplitud (veces de cambio)	2,18	3,89*
Desfase (h)	-	-	Desfase (h)	-2:03	-5:46*
Mesor o baseline (veces de cambio)	4,01	2,2*	Mesor o baseline (veces de cambio)	3,4	7,93
*Indica >20% de cambio en el parámetro comparado con la condición AL.  #Veces de cambio del gen evaluado respecto del gen <i>housekeeping</i> en comparación a una muestra CTL de las 08:00 h.			Ccha2	CD/AL	CD/TRF
			Amplitud (veces de cambio)	1,48	-
			Desfase (h)	-1:13	-
			Mesor o baseline (veces de cambio)	2,05	-

## 7. Discusión

En el marco del planteamiento de nuestra hipótesis, que proponía que: *“Un régimen TRF de 12 h por una semana contribuye a revertir la disfunción metabólica y la alteración del ciclo circadiano central y/o periférico, en comparación con alimentación Ad Libitum (AL), en moscas machos previamente alimentadas con HFD por 10 días que continúan con HFD o cambian a CD”*, podemos señalar que se cumple parcialmente pues nuestros resultados muestran una mejoría en algunos parámetros metabólicos en HFD/TRF o CD/TRF y mayor amplitud de ciclos de transcripción de algunos genes, especialmente del reloj periférico en HFD/TRF o CD/TRF, siendo más frecuente el hallazgo en este último grupo. Por lo tanto, existe la posibilidad de que la causa de las mejoras vistas en indicadores de acumulación de grasas, glicemia y resistencia a la insulina se asocie a la reversión del desajuste molecular circadiano producido por HFD. A pesar de que no fue estudiada la causalidad de manera directa en el presente trabajo, existen antecedentes en la literatura que apoyan esta idea. Se ha descrito que TRF contribuiría a restaurar la salud metabólica aún en presencia del silenciamiento de la expresión de genes clock y de HFD, y que los ratones que se alimentan AL, con esta misma mutación, exhiben obesidad, síndrome metabólico y disminución de la sobrevivencia (18).

En nuestro conocimiento, a la fecha no hay trabajos publicados en modelos animales en los que se haya evaluado el impacto de TRF sobre ciclos circadianos moleculares con una disrupción ya establecida por HFD (punto inicial). En conjunto, los hallazgos metabólicos y en indicadores moleculares de ciclos circadianos nos permitieron corroborar que previo a la intervención TRF, disponíamos de un modelo que exhibía características de daño metabólico y resistencia a insulina, y de disrupción de los ciclos circadianos a nivel molecular, útiles para poder poner a prueba nuestra hipótesis. Las características metabólicas presentadas por el modelo animal luego de diez días de HFD se encuentran dentro de las reportadas



por Musselman et. Al (32), y descritas en numerosos trabajos que han buscado establecer daño metabólico u obesidad inducida por dieta para estudiar diversas variables de interés en moscas (29) (45) (46) (15). Asimismo, los desajustes observados en los ritmos transcripcionales de genes reloj y del neuropéptido orexigénico *Ccha2* coinciden también con el daño inducido por HFD descrito en ratones (menor amplitud), sin embargo, en dichos estudios no se efectuó un Análisis Cosinor detallado de los ritmos circadianos (17) (24).

La alimentación con HFD (5% aceite de coco) por diez días redujo en un 31% de la vida media de las moscas macho respecto a la misma cepa alimentada con CD. Consistente con esto, Cormier et al (47), describieron una reducción del 51% de la vida media de moscas macho alimentadas con HFD (20% aceite de coco) en moscas cultivadas en condiciones ambientales similares a las efectuadas en este trabajo de tesis. Otros estudios en moscas tipo silvestres mostraron una reducción del 28% condiciones HFD 10%, y de un 35% y 50% de vida media en condiciones HFD 20% aceite de coco respectivamente (48) (45). A pesar de que la concentración de materia grasa usada en nuestro diseño fue menor, igualmente observamos el efecto deletéreo de HFD en la sobrevivencia de las moscas macho, lo que se reflejó también en mayores niveles de glucosa circulante, mayor expresión del marcador de resistencia a la insulina, y mayores niveles del marcador de la acumulación de grasas.

Las moscas macho alimentadas con HFD por diez días mostraron menor amplitud del ritmo circadiano transcripcional de algunos genes del reloj central y periférico, en comparación al grupo CTL. Lo anterior, se asemeja a lo encontrado por Kohsaka et al (27) en los ritmos moleculares de *Clock* y *BMAL1 (Cyc)*, en el hipotálamo (reloj central), y en hígado y tejido adiposo (relojes periféricos) de ratones. Por otro lado, el aumento que observamos en la amplitud del ritmo de *Per* en el reloj periférico y *Ccha2*, si bien no era esperada, coincide con lo reportado en ciclos circadianos de transcritos de algunas enzimas del metabolismo de lípidos y de neuropéptidos en hígado e hipotálamo de ratones respectivamente (27). No obstante, los cambios que

identificamos en amplitud y fase reflejan un desajuste de los ciclos producido por HFD. Este hallazgo muestra que el consumo de HFD, como estímulo ambiental mediante algún mecanismo no estudiado en este trabajo, es capaz de perturbar las oscilaciones o ciclos circadianos no solo de los tejidos periféricos (como intestino, tejido adiposo e hígado) sino también a nivel central, a pesar de recibir adecuadamente el *Zeitgeber* de luz, que es el principal sincronizador ambiental en los seres vivos.

La intervención TRF se asoció a cambios en los ritmos circadianos en el reloj central en el grupo HFD, aumentando la amplitud y el mesor del ritmo de *Clk*, lo que refleja un aumento en la intensidad del ritmo en comparación a la condición AL y un impacto de un estímulo periférico (régimen de alimentación TRF) sobre la regulación central del ritmo molecular de transcripción de *Clk*. Por otro lado, en el reloj periférico se encontró una menor amplitud en HFD/TRF comparado con la condición AL, lo cual está asociado a cambios en la fase del ciclo. Respecto del grupo CTL de referencia (no incluido en la hipótesis de investigación), es posible identificar que ambas condiciones HFD mostraron una menor amplitud del ritmo que las exhibidas por moscas no intervenidas de la misma edad. Este resultado fue inesperado y contrasta con lo reportado por Hatori et al (28) en su intervención TRF en ratones alimentados con HFD, en los que se mostró que TRF aumentaba la amplitud de los ritmos de expresión génica respecto al grupo con la misma alimentación, pero en condiciones AL. No obstante, una diferencia importante en el diseño es el punto inicial de los experimentos, ya que en dicho estudio usaron ratones sanos metabólicamente, a los que se les incorporó una HFD en el tiempo, paralelo a un régimen TRF o AL. Esto significa que el daño metabólico inducido por la dieta se producía de manera gradual, y el efecto benéfico de TRF corresponde a una prevención de la disrupción circadiana, específicamente de una menor amplitud, y no a una reversión, que fue el enfoque de estudio en este trabajo de tesis. Además, al comparar los parámetros de los ritmos de moscas HFD (TRF y AL) con los del grupo CTL (nunca intervenidas), se identifica una menor amplitud en ambos grupos

en todos los genes (reloj y *ccha2*), lo que puede ser atribuible al daño ocasionado por HFD previo a la intervención. En este sentido, es también posible que la extensión de la intervención TRF haya sido acotada y en consecuencia no se alcanzaran a restaurar los parámetros rítmicos del ciclo.

Concerniente al efecto metabólico de TRF sobre moscas que estuvieron permanentemente expuestas a HFD, destaca un menor contenido de TAGs totales (marcador de acumulación de grasas), en comparación con HFD/AL, lo que ha sido también descrito por otros autores, en modelos murinos. En dichos estudios, una HFD proporcionada con un régimen TRF previno o atenuó, respectivamente, la ganancia de peso y masa grasa en ratones (18) (28). La menor acumulación de grasas que observamos en nuestro estudio no pudo atribuirse a cambios en la ingesta calórica de los animales, ya que no hubo diferencias en el consumo entre los regímenes TRF y AL, lo cual también fue observado en ratones por Hatori et al (28). Asimismo, Villanueva et al (15), describió que moscas alimentadas con HFD (5% aceite de coco) y TRF mostraron menor contenido de triglicéridos ajustados por proteína del insecto, y también una menor área promedio de las gotas lipídicas, además de prevenir ganancia de peso. Este último hallazgo coincide con lo observado en este trabajo de tesis respecto del menor peso en las moscas HFD/TRF comparado con HFD/AL, que podría deberse al menor contenido de TAGs totales hallado en los animales. Esto es relevante, dado que una mayor acumulación de TAGs es condición característica de la obesidad y está frecuentemente asociada a una reducción de la esperanza de vida, no solo en *Drosophila*, sino también en humanos (49). Por lo tanto, una disminución en el contenido de TAGs totales eventualmente podría favorecer la sobrevida del animal.

Por otro lado, en el presente estudio no se produjo una reducción de los niveles de glucosa circulante en HFD/TRF respecto a HFD/AL contrario a lo reportado en otros trabajos. Esto podría deberse a un *plateau* en el aumento de la glucosa en respuesta a la dieta hipercalórica, y en el caso de TRF, es posible que la duración de la

intervención no haya sido suficiente para alcanzar una reducción en glicemia, en animales que tienen un daño metabólico inicial. Otra posibilidad es que puedan haberse presentado niveles más bajos de glucosa circulante en moscas con HFD/TRF en un horario distinto, dado que el control glicémico puede variar durante el día. No obstante, se presentaron beneficios en el marcador de resistencia a la insulina Nlaz en el grupo HFD/TRF, lo que también ha sido reportado en un estudio similar (15). Por lo tanto, un menor marcador de resistencia a la insulina en HFD/TRF, observado en nuestro estudio, podría reflejar un estadio temprano de recuperación de la sensibilidad a la insulina, que aún no ha cursado hacia un aumento sustancial de la captación de glucosa que se refleje en menores niveles de glucosa circulante. De este modo, estos resultados sugieren un efecto positivo de TRF en moscas que inician la intervención con daño metabólico y resistencia a la insulina, a pesar de ser mantenidas en HFD, lo cual es relevante dado el grado de complejidad biológica que representa una mejora o reversión de un daño aún en presencia de la noxa ambiental.

Respecto del efecto de TRF en moscas macho con disfunción metabólica inducida por HFD que luego recibieron alimentación CD, no se encontró diferencia en el contenido de triglicéridos totales, sin embargo, presentaron un menor peso. Este hallazgo contrasta con la literatura, pues en el estudio de Hatori et al, se observó que ratones que se alimentaban con dieta estándar, AL o TRF no tenían cambios en la composición de grasa ni en el peso (17). No obstante, como se ha mencionado anteriormente, el punto inicial de este trabajo de tesis corresponde a animales con disrupción metabólica, por lo que la comparación con los hallazgos referenciados debe ser cautelosa. Por otro lado, observamos que TRF en condiciones de CD mostró un efecto benéfico en el control metabólico de la glucosa, lo que no se asoció a una menor ingesta, y se reflejó también en la menor expresión de Nlaz, sugerente de menor resistencia a la insulina. Cabe destacar que el hallazgo en niveles de glucosa circulante contrasta con lo observado en el grupo que continuó en

condiciones HFD, en donde el grupo intervenido con TRF no mostró cambios en respecto al grupo HFD/AL, por lo que se podría especular que la reducción de este indicador (glucosa) en CD/TRF comparado con CD/AL, corresponde a un efecto combinado de TRF y del cambio a una dieta estándar (CD). Por lo tanto, estas observaciones refuerzan la idea de un efecto positivo de TRF sobre la homeostasis del metabolismo de glucosa, especialmente cuando las moscas macho previamente sometidas a HFD cambian a una alimentación CD.

La evaluación de los ritmos de expresión de los genes activadores y represores del reloj molecular del grupo CD, similar a lo encontrado en HFD, mostró que las moscas macho alimentadas con CD/TRF tuvieron diferentes parámetros de amplitud y de forma en las curvas, sin resultar en un efecto único de mayor o menor amplitud y fase. El resultado esperado era una mayor amplitud de todos los ciclos, dado que en condiciones iniciales de daño metabólico existe una atenuación de dicho parámetro (17). Esto se pudo observar en algunos de los ritmos, como el de *Cyc* a nivel central y de *Clk*, *Tim* y *Per* a nivel periférico. En este contexto, en el grupo CD se observó un efecto benéfico más claro de TRF revirtiendo el aplanamiento o pérdida del ritmo transcripcional. Esto podría reflejar que el impacto positivo de TRF en el ajuste de ritmos circadianos, reportado en la literatura, pudiera ser potenciado en presencia de un cambio dietario. Sin embargo, en ninguna de las condiciones alimentarias en las que se mantuvieron las moscas con disfunción metabólica (CD o HFD) y se intervinieron con régimen TRF de 12 hrs por una semana, se presentó una completa reversión del desajuste en los ritmos de expresión de los genes reloj y de *Ccha2*. Como ya se ha señalado, es posible que una mayor extensión de la intervención TRF nos hubiese permitido observar un mayor grado de reversión, tanto de los desajustes en los ciclos circadianos transcripcionales como de marcadores metabólicos (masa, TAGs totales, glucosa circulante y *Nlaz*).

Hemos identificado oportunidades de mejora en la metodología de este trabajo. Entre ellas destaca la toma de muestras de cabeza y cuerpos descabezados cada 4 horas para el análisis de la expresión de los transcritos de los genes de interés. En la construcción de las curvas de los ritmos circadianos, habría sido deseable contar con al menos un punto adicional, justo a las 24 h cronológicas después del primer horario de recolección de muestras, o aún mejor obtener muestras durante 48 h consecutivas, ya que permitiría evaluar los cambios en los ritmos de manera más clara y robusta. También, si el recurso humano y de insumos lo permitieran, sería interesante la obtención de datos de glicemia cada 4 horas para evaluar su ritmo circadiano, además de los ritmos circadianos moleculares.

Una limitación del diseño del presente estudio corresponde a que fue realizado solo en moscas macho, decisión tomada fundamentalmente para controlar las variables biológicas asociadas al ciclo reproductivo en moscas hembra. Sin embargo, dado que se observó un beneficio parcial de TRF en machos, esto da pie para evaluar el efecto en hembras, incorporando un mayor grado de variabilidad y complejidad biológica. En un estudio recientemente publicado en ratas, se describió que a pesar de que se observaron diferencias dependientes del sexo en el almacenamiento y distribución de grasa, TRF mejoró los parámetros metabólicos tanto en machos como en hembras (43).

Entre las proyecciones que se pueden realizar a partir de este trabajo de tesis, destaca el potencial benéfico de TRF para la salud cardiometabólica. Lo anterior es especialmente útil en presencia de resistencia a la insulina y de un aumento de tejido graso. Esta es una condición fisiopatológica que se asocia a la incidencia de enfermedades crónicas no transmisibles y otras patologías que tienen como plataforma la insulinoresistencia, por ejemplo, el síndrome de ovario poliquístico. En este sentido, este trabajo puede contribuir a sentar bases para expandir el conocimiento sobre el potencial terapéutico de TRF en moscas, incorporando herramientas genéticas y metodológicas que permitan explorar mecanismos asociados a los resultados expuestos. Dichos estudios permitirían profundizar sobre

los procesos biológicos y fisiológicos/fisiopatológicos compartidos con el humano, y fortalecer el entendimiento de la conexión entre la salud en términos de reversión de disfunción metabólica y del ajuste de ritmos circadianos moleculares mediante una herramienta práctica como TRF.

## 8. Conclusiones

En este trabajo de tesis se determinó el impacto de TRF de 12 h sobre parámetros metabólicos y marcadores del ciclo circadiano alterados en moscas macho con daño metabólico por dieta alta en grasa.

En base a nuestras observaciones en moscas macho con daño metabólico por HFD, sometidas luego a HFD o CD, podemos concluir que TRF de 12 h por una semana, tuvo un efecto positivo sobre el contenido total de triglicéridos, marcadores de control de la glucosa circulante, resistencia a la insulina y peso, en una o ambas dietas. Asimismo, se observó un efecto sobre alteraciones en la amplitud de ritmos circadianos moleculares en algunos genes, particularmente del reloj periférico en el grupo CD.

A la luz de los resultados previamente presentados, la hipótesis de trabajo se cumple parcialmente; el efecto de TRF mostró una reversión parcial de la disfunción metabólica y de la cronodisrupción de los ciclos circadianos.

Finalmente, estos antecedentes contribuyen a fortalecer la evidencia del potencial terapéutico de TRF en la recuperación de la homeostasis metabólica y su vínculo con los ritmos circadianos. Asimismo, nuestros hallazgos motivan nuevos estudios que profundicen en estos procesos biológicos y sus mecanismos. La obtención de información científica confiable sobre la aplicación de este esquema de restricción horaria de alimentación en el enfrentamiento de la malnutrición por exceso permitirá una difusión responsable de información al público sobre un tema de creciente interés popular.



## 9. Referencias

- (1) Boyd A Swinburn, Vivica I Kraak, Steven Allender et al. The Global Syndemic of Obesity, Undernutrition, and Climate Change: The Lancet Commission report. *Lancet* 2019; 23: 393(10173); 741-896.)
- (2) MINSAL. Gobierno de Chile. Encuesta Nacional de Salud. 2009-2010; 15.
- (3) MINSAL. Gobierno de Chile. Encuesta Nacional de Salud. 2016-2017; 34.)
- (4) Longo M, Zatterale F, Naderi J, et al. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Com
- (5) Carobbio S, Pellegrinelli V, Vidal-Puig A. Adipose Tissue Function and Expandability as Determinants of Lipotoxicity and the Metabolic Syndrome. *Adv Exp Med Biol*. 2017; 960: 161–196.
- (6) Oikonomou EK, Antoniades C. The role of adipose tissue in cardiovascular health and disease. *Nat Rev Cardiol*. 2019; 16(2):83–99.
- plications. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(9):2358
- (7) Egger G, Dixon J. Beyond obesity and lifestyle: a review of 21st century chronic disease determinants. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:731685
- (8) De Cabo R, Mattson MP. Effects of Intermittent Fasting on Health, Aging, and Disease. *N Engl J Med*. 2019; 381(26):2541-2551.
- (9) Lopez-Minguez J, Gómez-Abellán P, Garaulet M. Timing of Breakfast, Lunch, and Dinner. Effects on Obesity and Metabolic Risk. *Nutrients*. 2019 Nov 1;11(11):2624. doi: 10.3390/nu11112624. PMID: 31684003; PMCID: PMC6893547.
- (10) Sutton EF, Beyl R, Early KS, Cefalu WT, Ravussin E, Peterson CM. Early Time-Restricted Feeding Improves Insulin Sensitivity, Blood Pressure, and Oxidative Stress Even without Weight Loss in Men with Prediabetes. *Cell Metab*. 2018 Jun 5;27(6):1212-1221.
- (11) Jamshed H, Beyl RA, Della Manna DL, Yang ES, Ravussin E, Peterson CM. Early Time-Restricted Feeding Improves 24-Hour Glucose Levels and Affects Markers of the Circadian Clock, Aging, and Autophagy in Humans. *Nutrients*. 2019 May 30;11(6):1234.

- (12) Moon S, Kang J, Kim SH, Chung HS, Kim YJ, Yu JM, Cho ST, Oh CM, Kim T. Beneficial Effects of Time-Restricted Eating on Metabolic Diseases: A Systemic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. 2020 Apr 29;12(5):1267.
- (13) Wilkinson MJ, Manoogian ENC, Zadourian A et al. Ten-Hour Time-Restricted Eating Reduces Weight, Blood Pressure, and Atherogenic Lipids in Patients with Metabolic Syndrome. *Cell Metab*. 2020; 31(1):92-104.
- (14) Gill S, Le HD, Melkani GC, Panda S. Time-restricted feeding attenuates age-related cardiac decline in *Drosophila*. *Science*. 2015; 347(6227):1265-9.
- (15) Villanueva JE, Liveló C, Trujillo AS et al. Time-restricted feeding restores muscle function in *Drosophila* models of obesity and circadian-rhythm disruption. *Nat Commun*. 2019
- (16) Duncan MJ, Smith JT, Narbaiza J et al. Restricting feeding to the active phase in middle-aged mice attenuates adverse metabolic effects of a high-fat diet. *Physiol Behav*. 2016; 167: 1-9.
- (17) Hatori M, Vollmers C, Zarrinpar A et al. Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. *Cell Metab*. 2012; 15(6):848-60.
- (18) Chaix A, Lin T, Le HD, Chang MW, Panda S. Time-Restricted Feeding Prevents Obesity and Metabolic Syndrome in Mice Lacking a Circadian Clock. *Cell Metab*. 2019 Feb 5;29(2):303-319.
- (19) Carroll RG, Timmons GA, Cervantes-Silva MP, Kennedy OD, Curtis AM. Immunometabolism around the Clock. *Trends Mol Med*. 2019 Jul;25(7):612-625.
- (20) Takahashi JS. Molecular components of the circadian clock in mammals. *Diabetes Obes Metab*. 2015;17 Suppl 1(0 1):6-11.
- (21) Selcho M, Millán C, Palacios-Muñoz A, Ruf F, Ubillo L, Chen J, Bergmann G, Ito C, Silva V, Wegener C, Ewer J. Central and peripheral clocks are coupled by a neuropeptide pathway in *Drosophila*. *Nat Commun*. 2017 May 30;8:15563.
- (22) Manoogian ENC, Panda S. Circadian rhythms, time-restricted feeding, and healthy aging. *Ageing Res Rev*. 2017 Oct;39:59-67.

- (23) Konopka RJ, Benzer S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1971 Sep;68(9):2112-6.
- (24) Katewa SD, Akagi K, Bose N, et al. Peripheral Circadian Clocks Mediate Dietary Restriction-Dependent Changes in Lifespan and Fat Metabolism in *Drosophila*. *Cell Metab*. 2016;23(1):143-154.
- (25) Ren GR, Hauser F, Rewitz KF, et al. CCHamide-2 Is an Orexigenic Brain-Gut Peptide in *Drosophila*. *PLoS One*. 2015;10 (7):e0133017.
- (26) Page AJ, Christie S, Symonds E, Li H. Circadian regulation of appetite and time restricted feeding. *Physiol Behav*. 2020;220: 112873
- (27) Kohsaka A, Laposky AD, Ramsey KM, Estrada C, Joshu C, Kobayashi Y, Turek FW, Bass J. High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice. *Cell Metab*. 2007 Nov;6(5):414-21.
- (28) Hatori M, Vollmers C, Zarrinpar A, DiTacchio L, Bushong EA, Gill S, Leblanc M, Chaix A, Joens M, Fitzpatrick JA, Ellisman MH, Panda S. Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. *Cell Metab*. 2012 Jun 6;15(6):848-60.
- (29) Rajan A, Perrimon N. Of flies and men: insights on organismal metabolism from fruit flies. *BMC Biol*. 2013; 11: 38.
- (30) Heier C, Kühnlein RP. Triacylglycerol Metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 2018; 210(4):1163-1184
- (31) Musselman LP, Kühnlein RP. *Drosophila* as a model to study obesity and metabolic disease. *J Exp Biol*. 2018;221 (Pt Suppl 1):jeb163881.
- (32) Musselman LP, Fink JL, Narzinski K, Ramachandran PV, Hathiramani SS, Cagan RL, Baranski TJ. A high-sugar diet produces obesity and insulin resistance in wild-type *Drosophila*. *Dis Model Mech*. 2011;4(6):842-9
- (33) Diop SB, Birse RT, Bodmer R. High Fat Diet Feeding and High Throughput Triacylglyceride Assay in *Drosophila Melanogaster*. *J Vis Exp*. 2017; (127):56029
- (34) Katewa SD, Akagi K, Bose N, et al. Peripheral Circadian Clocks Mediate Dietary Restriction-Dependent Changes in Lifespan and Fat Metabolism in *Drosophila*. *Cell Metab*. 2016;23(1):143-154.

- (35) Lewy A.J, Emens J, Songer J, Rough J. Hormones, Brain and Behavior (Second Ed). Academic Press; 2009, Chapter 5.80.6, Zeitgeber Time; p. 2505-2528.)
- (36) Lourido F, Quenti D, Salgado-Canales D, Tobar N. Domeless receptor loss in fat body tissue reverts insulin resistance induced by a high-sugar diet in *Drosophila melanogaster*. *Sci Rep*. 2021 Feb 5;11(1):3263
- (37) Musselman L.P. Feeding Assay- blue food. USA. [Consultado Jun 2020]. Disponible en: <http://musselmanlab.com/index.php/protocols/>
- (38) Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9): e45.
- (39) Cornelissen G. Cosinor-based rhythmometry. *Theor Biol Med Model*. 2014 Apr 11; 11:16.
- (40) Weisberg S: Applied Linear Regression. New York: J Wiley & Sons; 1980. 45.
- (41) Mendez N, Halabi D, Spichiger C, Salazar ER, Vergara K, Alonso-Vasquez P, Carmona P, Sarmiento JM, Richter HG, Seron-Ferre M, Torres-Farfan C. Gestational Chronodisruption Impairs Circadian Physiology in Rat Male Offspring, Increasing the Risk of Chronic Disease. *Endocrinology*. 2016 Dec;157(12):4654-4668.
- (42) Mendez N, Torres-Farfan C, Salazar E, Bascur P, Bastidas C, Vergara K, Spichiger C, Halabi D, Vio CP, Richter HG. Fetal Programming of Renal Dysfunction and High Blood Pressure by Chronodisruption. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019 Jun 6; 10:362.
- (43) Ramanathan C, Johnson H, Sharma S, Son W, Puppa M, Rohani SN, Tipirneni-Sajja A, Bloomer RJ, van der Merwe M. Early Time-Restricted Feeding Amends Circadian Clock Function and Improves Metabolic Health in Male and Female Nile Grass Rats. *Medicines (Basel)*. 2022 Feb 21;9(2):15.
- (44) Mendez N, Abarzua-Catalan L, Vilches N, Galdames HA, Spichiger C, Richter HG, Valenzuela GJ, Seron-Ferre M, Torres-Farfan C. Timed maternal melatonin treatment reverses circadian disruption of the fetal adrenal clock imposed by exposure to constant light. *PLoS One*. 2012.

- (45) Heinrichsen ET, Haddad GG. Role of high-fat diet in stress response of *Drosophila*. *PLoS One*. 2012;7(8): e42587
- (46) Heinrichsen ET, Zhang H, Robinson JE, Ngo J, Diop S, Bodmer R, Joiner WJ, Metallo CM, Haddad GG. Metabolic and transcriptional response to a high-fat diet in *Drosophila melanogaster*. *Mol Metab*. 2013 Oct 23;3(1):42-54
- (46) Rovenko BM, Kubrak OI, Gospodaryov DV, Perkhulyyn NV, Yurkevych IS, Sanz A, Lushchak OV, Lushchak VI. High sucrose consumption promotes obesity whereas its low consumption induces oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol*. 2015; 79:42-54.
- (47) Cormier RPJ, Champigny CM, Simard CJ, St-Coeur PD, Pichaud N. Dynamic mitochondrial responses to a high-fat diet in *Drosophila melanogaster*. *Sci Rep*. 2019;9(1):4531.
- (48) Trindade de Paula M, Poetini Silva MR, Machado Araujo S, Cardoso Bortolotto V, Barreto Meichtry L, Zemolin AP, Wallau GL, Jesse CR, Franco JL, Posser T, Prigol M. High-Fat Diet Induces Oxidative Stress and MPK2 and HSP83 Gene Expression in *Drosophila melanogaster*. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;4018157.
- (49) Fontaine KR, Redden DT, Wang C, Westfall AO, Allison DB. Years of life lost due to obesity. *JAMA*. 2003 Jan 8;289(2):187-93.

## Anexos

### **Anexo 1. Procedimiento de aplicación de la prueba-F para determinar el ajuste de los datos de expresión relativa de los niveles de ARNm de genes reloj y Ccha2.**

Una vez obtenidos los datos de la expresión relativa de los transcritos, sus promedios y desviación estándar, cada 4 horas, en un curso temporal de aproximadamente 24 h, fueron sometidos a una función de tipo sinusoidal en GraphPad Prism 9; *Sine waves*. A partir de dicho análisis, se obtienen parámetros del conjunto de datos, que luego servirán para estimar el valor del estadístico F, mencionados más adelante. El estadístico F, perteneciente a la prueba F sirve para determinar si el curso temporal de una variable biológica se comporta como un ritmo.

En primer lugar, se identificó cual sería la prueba de hipótesis para cada conjunto de datos analizado, la que se presenta a continuación:

- Hipótesis Nula (H0): No hay ritmo. La Amplitud= 0. Los datos observados no se ajustan a una función sinusoidal.
- Hipótesis alternativa (H1): Existe un ritmo. La amplitud es > 0. Los datos observados se ajustan a una función sinusoidal.

La hipótesis nula se rechaza cuando F estadístico es mayor al Valor F crítico obtenido en la tabla de distribución F. Por lo que el siguiente paso consistió en estimar los valores de F crítico para cada conjunto de datos.

El F estadístico se obtiene con relación a la suma de cuadrados (MSS) y la suma de residuos cuadrados (RSS) del modelo sinusoidal:

$$F = (MSS/K)/(RSS/N-K) \text{ ó}$$

$$F = (MSS/2)/(RSS/N-3)$$

En donde 2 y  $N-3$  o  $N-K$  son los grados de libertad atribuidos al modelo.

Donde  $K$ =Parámetros del ritmo (3): Amplitud, desfase y mesor – 1; por lo tanto,  $K=2$ .

Y el error= $N-K=N-3$ , correspondiendo  $N$  a grados de libertad.

En el software utilizado, MSS está indicado como “Sum of Squares (SS)” y la razón ( $RSS/N-K$ ) está indicada como  $Sy.x$ . Por lo que el F-estadístico= $((SS/2) / Sy.x)$ .

Luego el F-estadístico es comparado con el valor F (2,  $N-3$ ) obtenido de la tabla de distribución F para  $\alpha=0.05$ . Cabe destacar que  $N$  también es determinado por el software.

Para clarificar el proceso detallado anteriormente, se expone un ejemplo tomado de los datos de expresión relativa del gen Clk pre-TRF en cabeza (luego de 10 días de HFD):

- $SS=9,507$
- $Sy.x=0,5367$
- F estadístico estimado= $8,86$
- $N=33$

Se determina el valor F (2,  $33-3$ ) crítico en la tabla, correspondiente a la columna 2, fila 30 (encerrado con rojo), el cual equivale a 3,32.

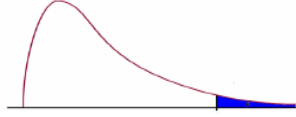
En este ejemplo, el F estadístico **8,86** > F crítico **3,32**, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula. En consecuencia, con una probabilidad de error menor al 5% es razonable pensar que el conjunto de datos de expresión relativa en aprox. 24 del gen Clk analizado en cabeza Pre-TRF tiene un ritmo, con una amplitud > 0, por lo tanto, puede ser modelado como una función sinusoidal.



• *Tabla de Distribución F para  $\alpha=0,05$ :*

**Distribución F 0.05**

En las columnas se encuentran los valores F que corresponden al área 0.05 a la derecha  
En las columnas se encuentran los grados de libertad del numerador  
En los renglones se encuentran los grados de libertad del denominador.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	15	20	24	30	40	60	120
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.0	243.9	245.9	248.0	249.1	250.1	251.1	252.2	253.3
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.40	19.41	19.43	19.45	19.45	19.46	19.47	19.48	19.49
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.76	8.74	8.70	8.66	8.64	8.62	8.59	8.57	8.55
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.94	5.91	5.86	5.80	5.77	5.75	5.72	5.69	5.66
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.70	4.68	4.62	4.56	4.53	4.50	4.46	4.43	4.40
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.03	4.00	3.94	3.87	3.84	3.81	3.77	3.74	3.70
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.60	3.57	3.51	3.44	3.41	3.38	3.34	3.30	3.27
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.31	3.28	3.22	3.15	3.12	3.08	3.04	3.01	2.97
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.10	3.07	3.01	2.94	2.90	2.86	2.83	2.79	2.75
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.94	2.91	2.85	2.77	2.74	2.70	2.66	2.62	2.58
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.82	2.79	2.72	2.65	2.61	2.57	2.53	2.49	2.45
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.72	2.69	2.62	2.54	2.51	2.47	2.43	2.38	2.34
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.63	2.60	2.53	2.46	2.42	2.38	2.34	2.30	2.25
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.57	2.53	2.46	2.39	2.35	2.31	2.27	2.22	2.18
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.51	2.48	2.40	2.33	2.29	2.25	2.20	2.16	2.11
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.46	2.42	2.35	2.28	2.24	2.19	2.15	2.11	2.06
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.41	2.38	2.31	2.23	2.19	2.15	2.10	2.06	2.01
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.37	2.34	2.27	2.19	2.15	2.11	2.06	2.02	1.97
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.34	2.31	2.23	2.16	2.11	2.07	2.03	1.98	1.93
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.31	2.28	2.20	2.12	2.08	2.04	1.99	1.95	1.90
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.28	2.25	2.18	2.10	2.05	2.01	1.96	1.92	1.87
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.26	2.23	2.15	2.07	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.24	2.20	2.13	2.05	2.01	1.96	1.91	1.86	1.81
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.22	2.18	2.11	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84	1.79
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.20	2.16	2.09	2.01	1.96	1.92	1.87	1.82	1.77
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	2.18	2.15	2.07	1.99	1.95	1.90	1.85	1.80	1.75
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	2.20	2.17	2.13	2.06	1.97	1.93	1.88	1.84	1.79	1.73
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19	2.15	2.12	2.04	1.96	1.91	1.87	1.82	1.77	1.71
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18	2.14	2.10	2.03	1.94	1.90	1.85	1.81	1.75	1.70
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.13	2.09	2.01	1.93	1.89	1.84	1.79	1.74	1.68
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.04	2.00	1.92	1.84	1.79	1.74	1.69	1.64	1.58
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.95	1.92	1.84	1.75	1.70	1.65	1.59	1.53	1.47
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.18	2.09	2.02	1.96	1.91	1.87	1.83	1.75	1.66	1.61	1.55	1.50	1.43	1.35



**Anexo 2.** Resultados de análisis de la Prueba-F aplicada a los conjuntos de datos de expresión relativa de los niveles de ARNm de genes reloj y Ccha2.

Head Pre-TRF			Body Pre-TRF		
Clk	CTL	HFD	Clk	CTL	HFD
SS	25,17	9,507	SS	24,09	0,8917
Sy.x	1,295	0,5367	Sy.x	1,417	0,1696
F estadístico	9,72	8,86	F estadístico	8,50	2,63
F tabla	3,68	3,32	F tabla	3,68	3,32
¿Rechazo H0?	sí	sí	¿Rechazo H0?	sí	sí
Ajusta el modelo	sí	sí	Ajusta el modelo	sí	sí
Cyc	CTL	HFD	Cyc	CTL	HFD
SS	33,86	11,07	SS	4,124	9,47
Sy.x	1,502	0,5792	Sy.x	0,5244	0,5527
F estadístico	11,27	9,56	F estadístico	3,93	8,57
F tabla	3,68	3,32	F tabla	3,68	3,32
¿Rechazo H0?	sí	sí	¿Rechazo H0?	sí	sí
Ajusta el modelo	sí	sí	Ajusta el modelo	sí	sí
Per	CTL	HFD	Per	CTL	HFD
SS	32,82	28,15	SS	30,99	313,6
Sy.x	1,479	0,9236	Sy.x	1,607	3,181
F estadístico	11,10	15,24	F estadístico	19,28	98,59
F tabla	3,68	3,32	F tabla	3,89	3,32
¿Rechazo H0?	sí	sí	¿Rechazo H0?	sí	sí
Ajusta el modelo	sí	sí	Ajusta el modelo	sí	sí
Tim	CTL	HFD	Tim	CTL	HFD
SS	23,35	352,3	SS	26,34	26,1
Sy.x	1,248	3,267	Sy.x	1,325	0,9176
F estadístico	9,35	53,92	F estadístico	19,88	28,44
F tabla	3,68	3,32	F tabla	3,68	3,32
¿Rechazo H0?	sí	sí	¿Rechazo H0?	sí	sí
Ajusta el modelo	sí	sí	Ajusta el modelo	sí	sí

Head Post-TRF					
<b>Cik</b>	<b>CTL</b>	<b>CD/AL</b>	<b>CD/TRF</b>	<b>HFD/AL</b>	<b>HFD/TRF</b>
SS	49,5	20,18	4,858	1,355	27893
Sy.x	1,82	0,7821	0,3837	0,2027	29,07
F estadístico	13,60	12,90	6,33	3,34	479,76
F tabla	3,89	3,32	3,32	3,32	3,32
¿Rechazo H0?	sí	sí	sí	sí	sí
Ajusta el modelo	sí	sí	sí	sí	sí
<b>Cyc</b>	<b>CTL</b>	<b>CD/AL</b>	<b>CD/TRF</b>	<b>HFD/AL</b>	<b>HFD/TRF</b>
SS	4,1	4,64	21,54	13,39	10631
Sy.x	0,528	0,375	0,8079	0,637	17,95
F estadístico	3,88	6,19	13,33	10,51	296,13
F tabla	3,89	3,32	3,32	3,32	3,32
¿Rechazo H0?	no	sí	sí	sí	sí
Ajusta el modelo	no	sí	sí	sí	sí
<b>Per</b>	<b>CTL</b>	<b>CD/AL</b>	<b>CD/TRF</b>	<b>HFD/AL</b>	<b>HFD/TRF</b>
SS	48,3	398	93,27	23,23	12718
Sy.x	1,79	3,473	1,681	0,8391	19,63
F estadístico	13,49	57,30	27,74	13,84	323,94
F tabla	3,89	3,32	3,32	3,32	3,32
¿Rechazo H0?	sí	sí	sí	sí	sí
Ajusta el modelo	sí	sí	sí	sí	sí
<b>Tim</b>	<b>CTL</b>	<b>CD/AL</b>	<b>CD/TRF</b>	<b>HFD/AL</b>	<b>HFD/TRF</b>
SS	14,3	24,09	72,76	266,8	30558
Sy.x	0,975	1,278	1,485	2,844	30,43
F estadístico	7,33	9,42	24,50	46,91	502,10
F tabla	3,89	3,32	3,32	3,32	3,32
¿Rechazo H0?	sí	sí	sí	sí	sí
Ajusta el modelo	sí	sí	sí	sí	sí

<b>Body Post-TRF</b>					
<b>Cik</b>	<b>CTL</b>	<b>CD/AL</b>	<b>CD/TRF</b>	<b>HFD/AL</b>	<b>HFD/TRF</b>
SS	49,5	20,18	4,858	1,355	27893
Sy.x	1,82	0,7821	0,3837	0,2027	29,07
F estadístico	13,60	12,90	6,33	3,34	479,76
F tabla	3,89	3,32	3,32	3,32	3,32
¿Rechazo H0?	sí	sí	sí	sí	sí
Ajusta el modelo	sí	sí	sí	sí	sí
<b>Cyc</b>	<b>CTL</b>	<b>CD/AL</b>	<b>CD/TRF</b>	<b>HFD/AL</b>	<b>HFD/TRF</b>
SS	4,1	4,64	21,54	13,39	10631
Sy.x	0,528	0,375	0,8079	0,637	17,95
F estadístico	3,88	6,19	13,33	10,51	296,13
F tabla	3,89	3,32	3,32	3,32	3,32
¿Rechazo H0?	no	sí	sí	sí	sí
Ajusta el modelo	no	sí	sí	sí	sí
<b>Per</b>	<b>CTL</b>	<b>CD/AL</b>	<b>CD/TRF</b>	<b>HFD/AL</b>	<b>HFD/TRF</b>
SS	48,3	398	93,27	23,23	12718
Sy.x	1,79	3,473	1,681	0,8391	19,63
F estadístico	13,49	57,30	27,74	13,84	323,94
F tabla	3,89	3,32	3,32	3,32	3,32
¿Rechazo H0?	sí	sí	sí	sí	sí
Ajusta el modelo	sí	sí	sí	sí	sí
<b>Tim</b>	<b>CTL</b>	<b>CD/AL</b>	<b>CD/TRF</b>	<b>HFD/AL</b>	<b>HFD/TRF</b>
SS	14,3	24,09	72,76	266,8	30558
Sy.x	0,975	1,278	1,485	2,844	30,43
F estadístico	7,33	9,42	24,50	46,91	502,10
F tabla	3,89	3,32	3,32	3,32	3,32
¿Rechazo H0?	sí	sí	sí	sí	sí
Ajusta el modelo	sí	sí	sí	sí	sí

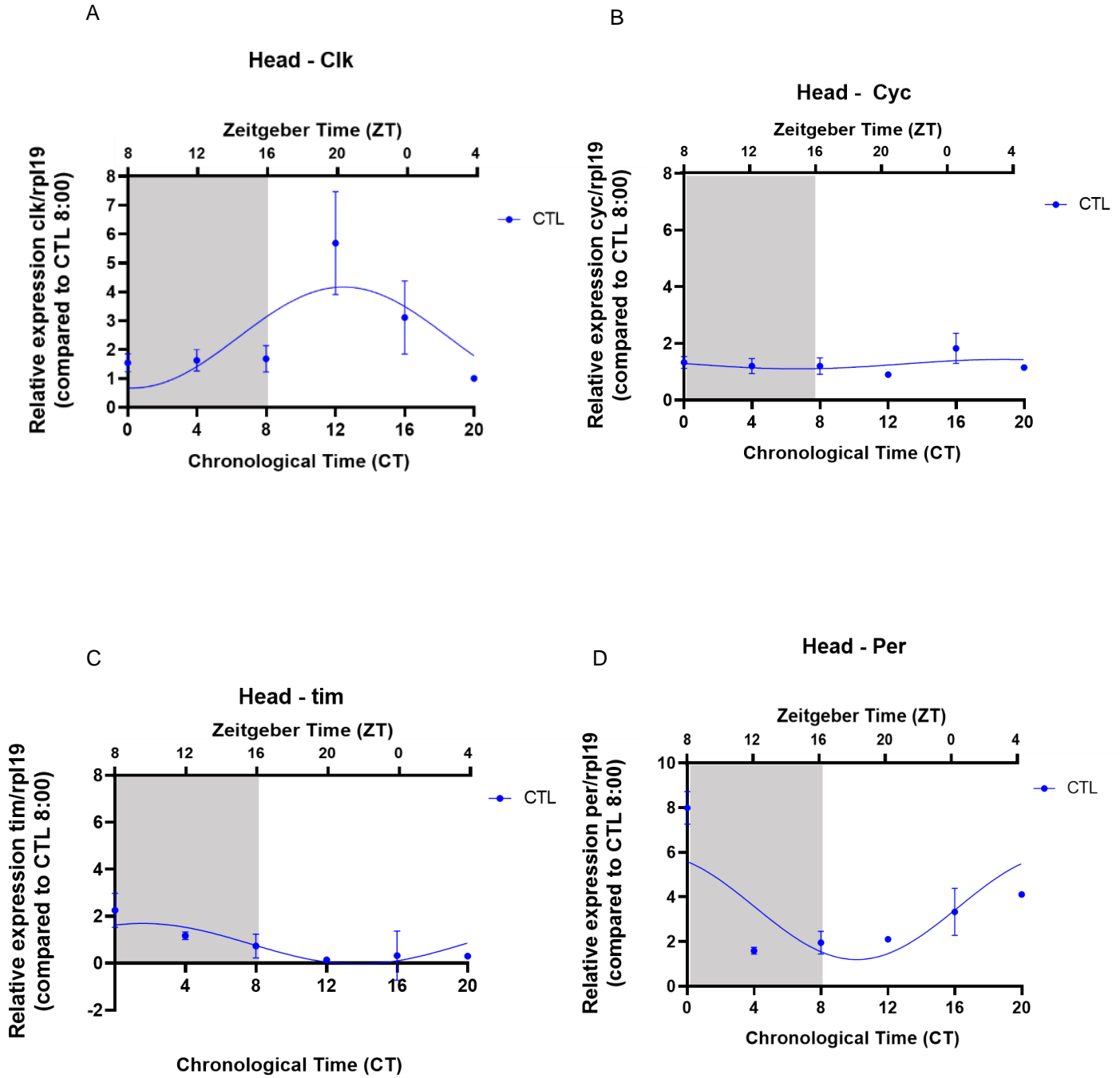
**Anexo 3.** Composición nutricional de las dietas experimentales y aporte energético promedio consumido en un periodo de 2 h por *Drosophila melanogaster* previo a la intervención TRF (Pre-TRF).

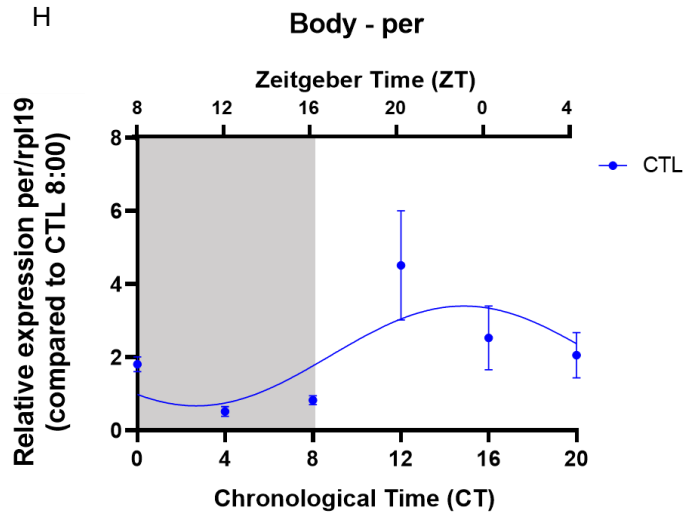
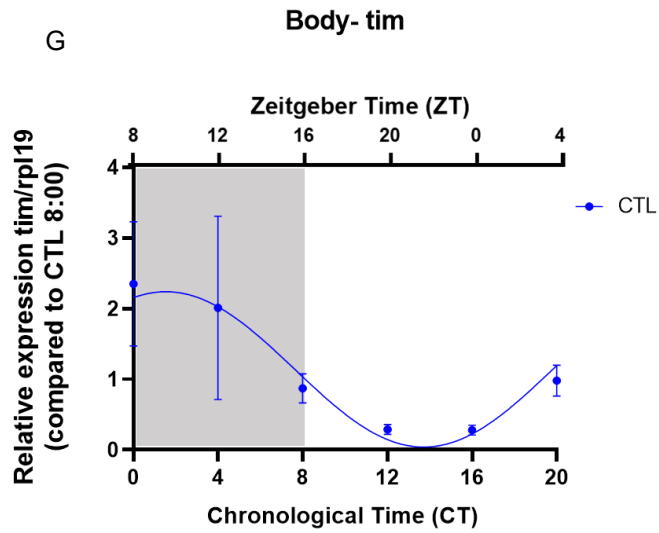
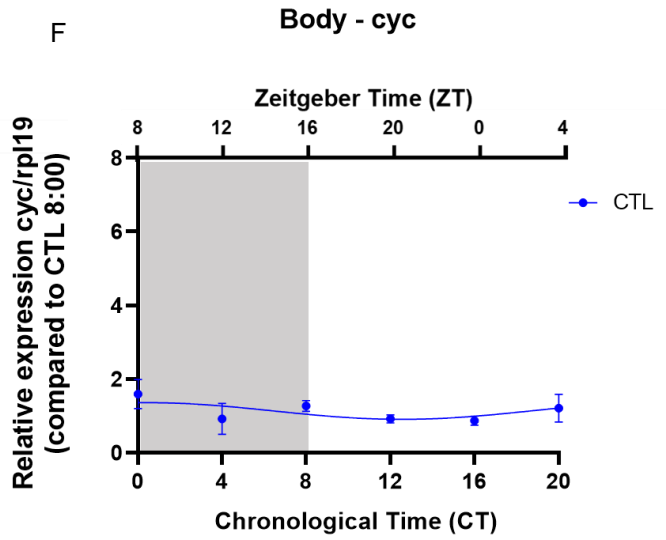
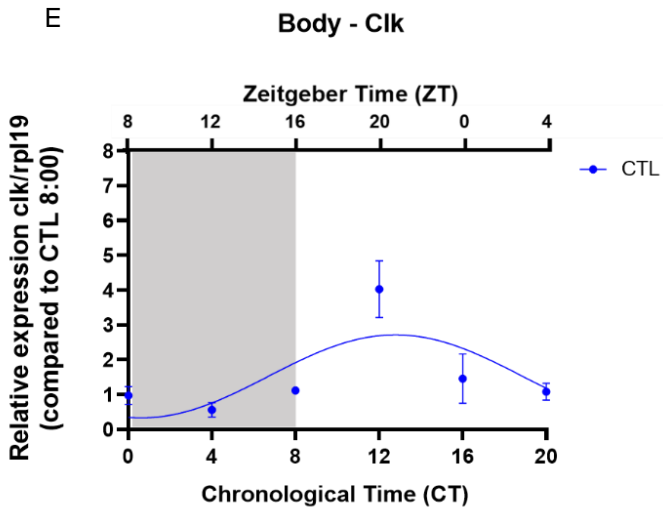
Tipo de dieta experimental		Aporte estándar del alimento		Aporte del volumen promedio ingerido
		por mL	por $\mu$ L	por $\mu$ L
<b>CD</b>	Kcal	0,703	7,E-04	1,E-04
	Proteínas (g)	0,061	6,E-05	1,E-05
	H. de C. (g)	0,112	1,E-04	2,E-05
	Lípidos (g)	0,001	9,E-07	2,E-07
<b>HFD 5%</b>	Kcal	1,153	1,E-03	2,E-04
	Proteínas (g)	0,062	6,E-05	2,E-07
	H. de C. (g)	0,112	1,E-04	3,E-07
	Lípidos (g)	0,051	5,E-05	1,E-09

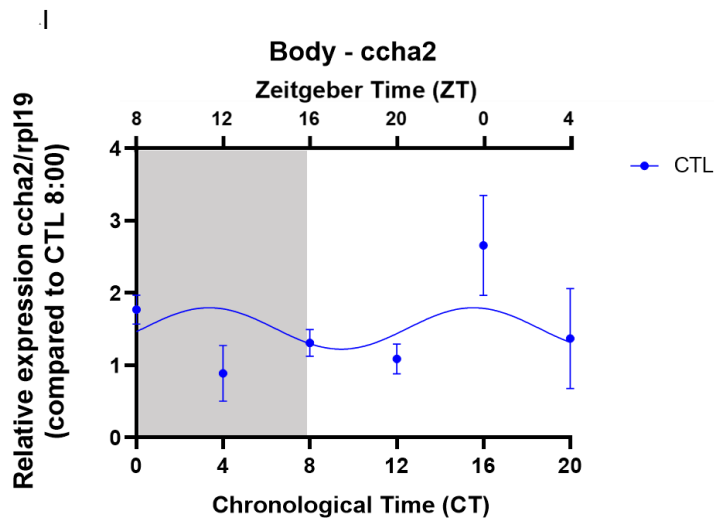
**Anexo 4.** Aporte energético promedio consumido en 2 h por *Drosophila melanogaster* Post-TRF en cada grupo experimental

Aporte del volumen promedio ingerido por $\mu\text{L}$	<b>CTL</b>	<b>CD/AL</b>	<b>CD/TRF</b>	<b>HFD/AL</b>	<b>HFD/TRF</b>
Kcal	4,3E-05	2,9E-05	4,0E-05	7,2E-05	7,3E-05
Proteínas (g)	3,8E-06	2,6E-06	3,5E-06	3,9E-06	4,0E-06
H. de C. (g)	6,9E-06	4,7E-06	6,3E-06	7,0E-06	7,1E-06
Lípidos (g)	5,5E-08	3,7E-08	5,1E-08	3,2E-06	3,2E-06

**Anexo 5.** Ritmos circadianos transcripcionales de genes reloj y *ccha2* en moscas CTL a los 17 días de vida.







**Ritmo de expresión circadiana de genes del reloj molecular central y periférico y de Ccha2 observados en un grupo control de moscas (CTL).** Ritmo de expresión relativa evaluada por RT-qPCR cada 4 h de (A) Clk, (B) Cyc, (C) Tim y (D) Per en cabezas de *Drosophila* a los 17 días y de (E) Clk, (F) Cyc, (G) Tim, (H) Per y (I) Ccha2 en cuerpos descabezados. n=25-30 cabezas de moscas por punto, 3 puntos obtenidos de una réplica técnica por horario de medición, para cada grupo experimental en paralelo. Cada punto o cuadrado representa la media, y las barras, su respectiva desviación estándar. La zona en color gris indica la fase de oscuridad (noche, luces apagadas). El eje X inferior muestra la hora local (CT) y el eje X superior la equivalencia en hora Zeitgeber (ZT).



**Anexo 6.** Parámetros del ritmo circadiano de expresión de genes clock activadores y represores del reloj molecular central y periférico en moscas CTL (no intervenidas) a los 17 días.

Reloj central		Reloj periférico	
Clk	CTL	Clk	CTL
Amplitud (veces de cambio)	1,75	Amplitud (veces de cambio)	1,19
Desfase (h)	6:18	Desfase (h)	17:25
Mesor o baseline (veces de cambio)	2,42	Mesor o baseline (veces de cambio)	1,52
<b>Cyc</b>		<b>Cyc</b>	
Amplitud (veces de cambio)	-	Amplitud (veces de cambio)	-
Desfase (h)	-	Desfase (h)	-
Mesor o baseline (veces de cambio)	-	Mesor o baseline (veces de cambio)	-
<b>Tim</b>		<b>Tim</b>	
Amplitud (veces de cambio)	0,87	Amplitud (veces de cambio)	1,1
Desfase (h)	4:25	Desfase (h)	4:28
Mesor o baseline (veces de cambio)	0,83	Mesor o baseline (veces de cambio)	1,14
<b>Per</b>		<b>Per</b>	
Amplitud (veces de cambio)	2,35	Amplitud (veces de cambio)	1,36
Desfase (h)	3:58	Desfase (h)	3:21
Mesor o baseline (veces de cambio)	3,55	Mesor o baseline (veces de cambio)	2,04
		<b>Ccha2</b>	
		Amplitud (veces de cambio)	0,28
		Desfase (h)	0:36
		Mesor o baseline (veces de cambio)	1,51

#Veces de cambio del gen evaluado respecto del gen housekeeping en comparación a una muestra CTL de las 08:00 h.

“-“indica la ausencia de expresión rítmica del transcrito al realizar el Análisis Cosinor.

**Anexo 7.** Impacto de la intervención TRF sobre los valores promedio de glucosa circulante, peso y TAGs totales en condiciones CD y HFD

	<b>CD/AL</b>	<b>CD/TRF</b>	<b>HFD/AL</b>	<b>HFD/TRF</b>
<b>Glucosa promedio (mg/dL)</b>	979	762*	635	748
SD	272	132	195	85
% cambio TRF respecto a AL		-22,1		17,8
<b>Peso promedio (mg/mosca)</b>	0,84	0,74*	0,76	0,71*
SD	0,06	0,15	0,09	0,14
% cambio TRF respecto a AL		-12,2		-6,8
<b>TAGs totales promedio (ng/uL)</b>	6,82	8,12	10,65	7,24*
SD	1,04	1,80	0,97	1,71
% cambio TRF respecto a AL		19,04		-32,02

\*p<0,05 Test de Mann-Whitney.