

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

UNIDAD MONTERREY

***Estudio de la robustez del reloj circadiano acoplado con
metabolismo en hepatocito a través de un modelo matemático***

Tesis que presenta

Leonardo López Ortiz

para obtener el Grado de

Maestro en Ciencias

en

Ingeniería y Física Biomédicas

Director de la tesis

Dr. Jesús Guadalupe Rodríguez González

Apodaca, Nuevo León

Agosto, 2018

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante mis estudios de maestría.

Agradezco al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Monterrey por aceptarme en su programa de maestría y permitirme realizar mis estudios en sus instalaciones. También a su personal administrativo por la ayuda brindada durante este proceso.

Agradezco profundamente al Dr. Jesus G. Rodriguez, por su guía y confianza para realizar este proyecto y concluirlo de la mejor manera posible, sus enseñanzas y consejos me han ayudado a seguir creciendo profesionalmente.

Agradezco a los docentes y estudiantes del grupo de biología de sistemas que han contribuido con su experiencia a mejorar el proyecto y a comunicarlo de la mejor manera.

También agradezco a los amigos que desde la distancia me han apoyado con sus consejos y a los nuevos amigos de generación que han hecho de la experiencia algo inolvidable haciéndome sentir como en casa.

Finalmente, le agradezco a mi familia por ser el soporte que me tiene en pie en la vida, no importa el sitio donde este siempre estarán allí para apoyar mi camino.

A todos, gracias totales.

“El tiempo es al reloj lo que la mente al cerebro. En cierto modo, el reloj contiene el tiempo, y sin embargo el tiempo se niega a que lo embotellen como a un genio encerrado en una lámpara. Tanto si fluye cual la arena como si gira sobre unas ruedas dentro de otras ruedas, el tiempo se escapa irremediabilmente, mientras nosotros sólo sabemos observar”

-Dava Sobel

Contenido

Resumen	1
Lista de Figuras	5
Lista de Tablas	6
1 Introducción	7
1.1 Arquitectura molecular	8
1.2 Modelos matemáticos	9
1.3 Robustez	10
1.4 Interacción entre el reloj y el metabolismo	11
2 Justificación, Hipótesis y Objetivos	16
2.1 Justificación	16
2.2 Hipótesis	16
2.3 Objetivos	16
2.3.1 Objetivo General	16
2.3.2 Objetivos Específicos	17
3 Metodología	18
3.1 Desarrollo del modelo matemático	18
3.2 Característica del Zeitgeber	23
3.3 Análisis de la robustez	24
4 Resultados	27
4.1 Implementación y validación del modelo	27
4.1.1 Oscilaciones autosostenidas del RCAM	27
4.1.2 Oscilaciones del RCAM en presencia de la dinámica energética	28
4.2 Estudio de la robustez	29
4.2.1 Robustez del RCAM con oscilaciones autosostenidas	29
4.2.2 Robustez del RCAM con dinámica energética normal	31
4.2.3 Robustez del RCAM con dinámica energética alta	34
4.2.4 Robustez del RCAM con dinámica energética baja	36
5 Discusión	38
6 Conclusión	40
7 Perspectivas	41
Referencias	42

Resumen

El reloj circadiano es responsable de la regulación de los ritmos internos en la mayoría de los organismos vivos. Permite la anticipación de los cambios medioambientales y una mejor adaptación de los procesos fisiológicos. En los mamíferos, el reloj principal está ubicado en el núcleo supraquiasmático y sincroniza los relojes periféricos en todo el organismo. Sus componentes moleculares forman una red intracelular que dicta el tiempo circadiano y regula los genes del reloj. Estos genes controlados por el reloj están presentes de manera conservada en los demás relojes periféricos y están involucrados en procesos biológicos cruciales como el metabolismo. Este último llevado a cabo por el hígado, el cual desempeña funciones vitales indispensables como la desintoxicación, síntesis de energía y su almacenamiento, está compuesto por células llamadas hepatocitos. Su mal funcionamiento puede provocar la interrupción de los ritmos biológicos y causar daños graves al organismo. Los relojes periféricos ubicados en células como los hepatocitos pueden ser sincronizados no solo por el reloj maestro del cerebro sino también por otras señales periódicas externas como es el caso de la alimentación que a su vez tiene como consecuencia la alteración del balance energético celular. Los mecanismos detallados que gobiernan esta interacción molecular entre el reloj circadiano y el metabolismo aún no se conocen por completo y son tema de investigación. Los modelos matemáticos pueden ser de gran ayuda para explorar y entender el mecanismo de los relojes circadianos. Se desarrollo un modelo matemático para el sistema de reloj circadiano acoplado con metabolismo en hepatocito utilizando los datos disponibles en la literatura. Este modelo se usó para estudiar la robustez asociada a los relojes circadianos, ya que se sabe que en neuronas estos exhiben una robustez en el periodo ante diferentes estímulos externos, surgiendo las siguientes preguntas ¿son la robustez en el periodo y la amplitud afectados por el metabolismo? ¿Es el reloj circadiano más sensible a los parámetros asociados al metabolismo? Los resultados indican que parámetros asociados a moléculas metabólicas afectan en mayor medida el periodo circadiano siendo en algunos casos responsables de la perdida de comportamiento circadiano. Además de proporcionar evidencia del potencial efecto de las dinámicas energéticas en el comportamiento circadiano, llevando a cabo experimentos con diferentes condiciones de energía celular y periodos de oscilación que afectan su comportamiento. Estos hallazgos indicaron cómo el sistema mejora su

comportamiento en presencia de una actividad energética normal a pesar de las variaciones paramétricas. En conclusión, el metabolismo acoplado a la maquinaria molecular circadiana juega un papel fundamental en los relojes circadianos de hepatocito mostrando que mejora la robustez del periodo y no la amplitud ante perturbaciones.

Abstract

The circadian clock is responsible for the regulation of internal rhythms in most living organisms. It allows the anticipation of environmental changes and a better adaptation of physiological processes. In mammals, the main clock is in the suprachiasmatic nucleus and synchronizes peripheral clocks throughout the organism. Its molecular components form an intracellular network that dictates the circadian time and regulates the clock genes. These clock-controlled genes are present conserved in the other peripheral clocks and are involved in crucial biological processes such as metabolism. The latter is carried out by the liver, which performs essential vital functions such as detoxification, energy synthesis and storage, is composed of cells called hepatocytes. Its malfunction can cause the interruption of biological rhythms and cause serious damage to the organism. Peripheral clocks located in cells such as hepatocytes can be synchronized not only by the master clock of the brain but also by other external periodic signals such as feeding, which in turn has the consequence of altering the cellular energy balance. The detailed mechanisms that govern this molecular interaction between the circadian clock and metabolism are not yet fully understood and are the subject of research. Mathematical models can be of great help to explore and understand the mechanism of circadian clocks. A mathematical model for the circadian clock system coupled with hepatocyte metabolism was developed using the data available in the literature. This model was used to study the robustness associated with the circadian clocks, since it is known that in neurons these exhibit a robustness in the period due to different external stimuli, the following questions arise: are the robustness in the period and the amplitude affected by the metabolism? Is the circadian clock more sensitive to the parameters associated with metabolism? The results indicate that parameters associated with metabolic molecules affect the circadian period, being in some cases responsible for the loss of circadian behavior. In addition to providing evidence of the potential effect of energy dynamics on circadian behavior, conducting experiments with different cellular energy conditions and periods of oscillation that affect their behavior. These findings indicated how the system improves its behavior in the presence of a normal energy activity despite the parametric variations. In conclusion, the metabolism coupled to the circadian molecular machinery plays a

fundamental role in hepatocyte circadian clocks showing that it improves the robustness of the period and not the amplitude due to disturbances.

Lista de Figuras

<i>Figura 1. Esquema molecular del reloj circadiano con sus lazos de retroalimentación...</i>	9
<i>Figura 2. Presencia del reloj molecular circadiano en tejidos periféricos.....</i>	12
<i>Figura 3. Niveles de ARNm del componente del reloj circadiano Per2 en hígado a diferentes horas del día.</i>	13
<i>Figura 4. Lazo de retroalimentación negativa que involucra NAMPT/NAD funcionando como un oscilador metabólico complementario.....</i>	15
<i>Figura 5. Esquema de la interacción entre el reloj y el metabolismo.....</i>	15
<i>Figura 6. Red molecular del reloj circadiano acoplado con metabolismo.</i>	19
<i>Figura 8. Oscilaciones autosostenidas.</i>	28
<i>Figura 9. Oscilaciones en presencia de la función $u(t)=A$.....</i>	29
<i>Figura 10. Graficas de la robustez con oscilaciones autosostenidas.l.....</i>	31
<i>Figura 11. Graficas de la robustez con oscilaciones en presencia de la función $u(t)=A$ con tres distintos periodos.....</i>	33
<i>Figura 12. Graficas de la robustez con oscilaciones en presencia de la función $u(t)=B$ con tres distintos periodos.....</i>	35
<i>Figura 13. Graficas de la robustez con oscilaciones en presencia de la función $u(t)=C$ con tres distintos periodos.....</i>	37

Lista de Tablas

<i>Tabla 1. Ecuaciones del modelo</i>	<i>20</i>
<i>Tabla 2. Parámetros del modelo</i>	<i>22</i>
<i>Tabla 3. Características de la función dependiente del tiempo</i>	<i>24</i>
<i>Tabla 4. Resumen del estudio realizado en este trabajo</i>	<i>25</i>

1 Introducción

Los ritmos fisiológicos son de vital importancia para el desarrollo de la vida, estos ritmos interactúan unos con otros de formas complejas a pesar de las fluctuaciones medioambientales a los que se encuentran expuestos. Se encuentran controlados por innumerables sistemas de retroalimentación que proveen de orden y estabilidad al sistema permitiendo así la vida (Glass 2001). Algunos de estos ritmos siguen los periodos de día y noche producto de la rotación de la tierra, y son llamados ritmos circadianos, que derivan del término “circa”, que significa “aproximadamente”, y “dies”, que significa “día”. Es bien sabido que estos ritmos son gobernados por un reloj molecular llamado reloj circadiano, localizado en una región del hipotálamo llamado núcleo supraquiasmático (NSQ) (Stephan and Zucker 1972). Las neuronas del NSQ están conectadas unas con otras e interactúan de manera sincronizadas, encontrándose experimentalmente que, si son disociadas del tejido y son aisladas unas de otras, cada neurona puede presentar oscilaciones autónomas a periodos circadianos diferentes (Welsh et al. 1995; Honma et al. 2004). Estos ritmos son por tanto endógenos y generados por un mecanismo molecular interno con periodo de oscilación libre cercano a las 24 h. Sus propiedades son entonces, que posee oscilaciones autosostenidas con periodo libre de oscilación, puede estar sujeto a un “entrenamiento”, definido como la alineación del periodo y fase de un sistema circadiano con el periodo y la fase de un ritmo externo. Este ritmo externo este dado por una señal periódica externa o clave temporal llamada “Zeitgeber”, palabra alemana que significa “donador de tiempo”, como ejemplo de estos, son los periodos de día y noche, a pesar de ser los más estudiados, estos no son los únicos, también los ciclos de alimentación, la temperatura corporal y los ciclos hormonales son otros importantes Zeitgeber. El entrenamiento del reloj por parte del Zeitgeber informa a un organismo acerca del tiempo local y le permite ajustar su horario de actividades de forma apropiada durante el día o la noche. Esto implica que el periodo y fase de oscilación de su reloj interno coincida con el del Zeitgeber. Finalmente, otra característica fundamental de los relojes circadianos es la capacidad de mantener un periodo estable en presencia de fluctuaciones en la temperatura. Esta propiedad se denomina compensación en temperatura y es interesante debido a que en general las reacciones bioquímicas dependen de la temperatura de acuerdo con la ley de Arrhenius. El mecanismo preciso que permite esta

regulación es aún incierto, de hecho una característica fundamental del reloj circadiano es su robustez en el periodo no solo a fluctuaciones en temperatura sino también a fluctuaciones externas en general (Buhr and Takahashi 2013).

1.1 Arquitectura molecular

La arquitectura de la red que comprende al reloj en el NSQ de mamíferos ha sido bien estudiada, los progresos en la biología molecular han permitido identificar varios lazos de retroalimentación en los procesos de transcripción-traducción que son responsables de las oscilaciones circadianas (Aronson et al. 1994). Como por ejemplo, los lazos de retroalimentación que forman un complejo activador, compuesto por las moléculas CLOCK (*circadian locomotor output cycles kapout*) y BMAL1 (*brain and muscle ARNT like 1*) (Bunger et al. 2000), que activa la transcripción de los genes controladores del reloj, los genes Periodo (*per 1, 2, 3*), y Cryptocromo (*cry 1, 2*) (Zheng et al. 2001), que una vez son traducidos y las proteínas resultantes se heterodimerizan en el citoplasma, para posteriormente ser trasladadas al núcleo donde al formar un complejo PER-CRY, inhiben la actividad del complejo activador CLOCK-BMAL1, y de este modo apagan su producción. (ver Figura 1). Adicionalmente existen mecanismos de degradación que disminuyen la concentración de estas proteínas llevando a una reactivación de los complejos activadores, así el ciclo comienza de nuevo (Deborah Bell-Pedersen, Vincent M. Cassone and , Susan S. Golden, Paul E. Hardin 2005).

Existen otros lazos de retroalimentación en la transcripción-traducción adicionales, que incluyen los receptores nucleares ROR- α, β, γ (*retinoid-related orphan receptor alpha, beta, and gamma*) y REV-ERB α, β (*reverse-erythroblastosis virus alpha and beta*), los cuales son transcritos bajo la regulación del complejo activador CLOCK-BMAL1, para luego unirse competitivamente a los sitios de unión del promotor de *Bmal1*, donde ROR- α, β activan y REV-ERB α inhibe su transcripción (Partch, Green, and Takahashi 2014) (ver Figura 1). El lazo principal comprende la activación de la transcripción de los genes circadianos que son eventualmente traducidos a proteínas y estas a su vez pueden sufrir modificaciones y regresar al núcleo donde inhiben la expresión de sus propios genes. Adicionalmente la formación del

complejo activador involucra lazos de retroalimentación positiva y negativa. Por otro lado, se sabe que mutaciones en los genes del reloj pueden modificar la robustez en el reloj, alterando tanto el periodo de las oscilaciones como la amplitud de la expresión de las moléculas.

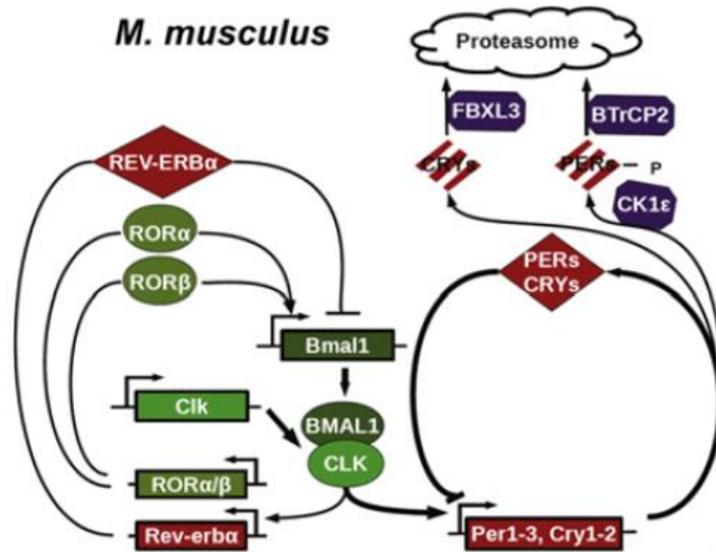


Figura 1. Esquema molecular del reloj circadiano con sus lazos de retroalimentación. (Brown, Kowalska, and Dallmann 2012). En el esquema molecular se muestran rectángulos que representan los E-box de los genes circadianos. Las elipses representan proteínas con función activadora sobre los genes. En rombos se muestran los complejos que forman las proteínas con función inhibitoria. Finalmente, los polígonos cumplen la función de modificar la estabilidad de las proteínas para su degradación en proteasoma.

1.2 Modelos matemáticos

Como la dinámica del reloj circadiano es compleja, se han usado modelos para estudiar el papel de los lazos de retroalimentación en estos sistemas, así como su robustez (Leloup and Goldbeter 2003). En particular, modelos conceptuales como el oscilador de Goodwin (Goodwin 1965) permiten comparar propiedades dinámicas, determinando cómo estos requieren matemáticamente altos grados de no-linealidad para desarrollar oscilaciones. Se han reportado modelos detallados que describen los mecanismos moleculares del reloj circadiano y que han sido usados para lograr elucidar cuestiones que son difíciles de resolver experimentalmente, como el efecto de modificaciones post-traducción en las proteínas involucradas, (fosforilaciones, acetilaciones, etc...), o investigar las afectaciones debidas a

alteraciones en ciertos componentes del reloj (D. B. Forger and Peskin 2003). Por otro lado también existen modelos menos detallados pero que mantienen las características esenciales de los sistemas y son llamados modelos mínimos. Estos modelos permiten estudiar propiedades dinámicas genéricas y explorar propiedades como la sincronización de osciladores celulares autónomos utilizando niveles globales de un neurotransmisor (Gonze et al. 2005). Estos modelos han permitido ganar conocimiento acerca de los principios de diseño de los relojes circadianos y su control sobre una gran variedad de procesos y sistemas fisiológicos en organismos superiores, como lo son el sistema inmune, el ciclo celular, el metabolismo entre otros. El estudio de los componentes moleculares del reloj y sus mutaciones utilizando modelos matemáticos, permiten brindar pistas acerca de los desórdenes asociados al mal funcionamiento del reloj en el cerebro, como el desorden del sueño, y en general de desajustes del reloj con los ciclos medioambientales (Zelinski, Deibel, and McDonald 2014).

1.3 Robustez

La robustez definida por Alderson y Doyle dice que: “una (propiedad) de un (sistema) es robusta si esta es invariante respecto a un (conjunto de perturbaciones)” (Alderson and Doyle 2010). La conclusión de estudiar dicha robustez dependerá de cómo cada elemento en los paréntesis es definido. Así pues, la robustez ha sido estudiada a través del análisis de datos, simulaciones, y una variedad de técnicas experimentales, cada una con sus limitaciones, pero confirmando la intrínseca robustez que exhiben los sistemas biológicos (Whitacre 2012), desde redes de señalización, redes metabólicas, redes neuronales, expresión de patrones, redes bioquímicas en la quimiotaxis, ritmos circadianos, etc. La robustez puede ser estudiada usando modelos matemáticos y herramientas computacionales, conociendo el sistema biológico y los parámetros tomados de datos experimentales. Los relojes circadianos y los comportamientos complejos que exhiben han sido relativamente bien estudiados *in silico* y se ha mostrado su robustez en diferentes condiciones (Gonze, Halloy, and Goldbeter 2002; Panda, Hogenesch, and Kay 2002; Roenneberg and Merrow 2003; Relógio et al. 2011), pero solo en la red molecular fundamental del NSQ. Sin embargo, es sabido que la robustez

involucra no solo al sistema sino también a su ambiente y las señales que lo rodean. Este el caso de los relojes circadianos y su interacción con el metabolismo, cuya robustez ha sido poco estudiada.

1.4 Interacción entre el reloj y el metabolismo

Actualmente se sabe que la maquinaria molecular que permite las oscilaciones del reloj en mamíferos no se encuentra solamente en las células del NSQ, sino también en la mayoría de los tejidos periféricos incluyendo el hígado, la glándula adrenal, los riñones, el corazón, tejido adiposo, pulmones, musculo esquelético, cerebelo... (Froy 2011). Pero de entre todos estos tejidos, ha sido de gran interés estudiar la relación entre el NSQ y el mayor centro de distribución de nutrientes: el hígado. Esto debido a que se ha asociado directamente al reloj circadiano con desordenes metabólicos por interrupciones entre el reloj y rutas metabólicas (Green, Takahashi, and Bass 2008). En un estudio se compararon los perfiles de expresión genética del NSQ y el hígado, donde se encontraron 28 genes en común para ambos tejidos. La expresión circadiana de los genes en cada tejido es específica y apropiada para su óptima función (Panda et al. 2002). La maquinaria molecular de los relojes circadianos se ha conservado en muchas de las células de los organismos superiores, teniendo presencia en tejidos tan importantes como el hígado, siendo este último estimulado no solo por el reloj maestro del cerebro sino también por el estado energético producto de la alimentación periódica (ver Figura 2).

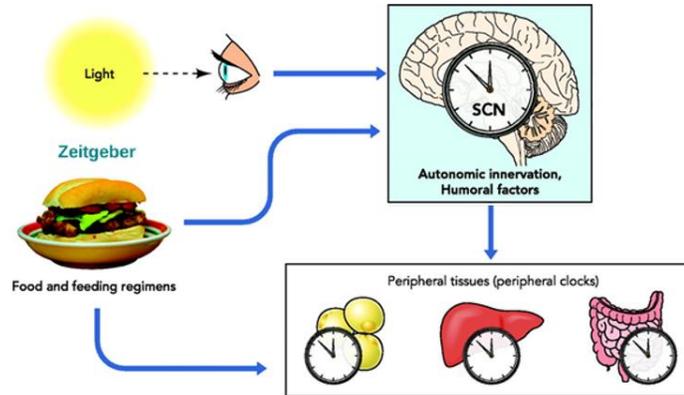


Figura 2. Presencia del reloj molecular circadiano en tejidos periféricos. Imagen modificada de (Froy 2011). En la figura se muestra como reloj circadiano en el cerebro recibe a través de la retina el estímulo visual que le permite ajustarse a los ciclos de luz y alimentación. Los relojes periféricos en otros órganos reciben señales del cerebro, pero también de los ciclos de alimentación directamente, permitiéndoles ajustarse a ellos.

El NSQ genera una cadena de señalización que ajusta los ritmos fisiológicos y la expresión de los genes del reloj propios de cada tejido periférico, pero también estos relojes pueden ser ajustados por señales sistémicas provenientes de otras fuentes como lo son la alimentación, la temperatura corporal e inmunidad humoral. Estudios han mostrado que en el hígado, la fase en la expresión de genes del reloj circadiano puede ser desacoplada del resto del cuerpo, si hay alimentación en un periodo que debería ser destinado al ayuno y sueño (Damiola et al. 2000). Este reajuste de fase en los relojes periféricos inducido por la alimentación, se debe en parte a la habilidad de los glucocorticoides en el sistema circulatorio para modificarlas (Pocai et al. 2005). En general se puede decir que el reloj circadiano maestro que se encuentra en el NSQ se ajusta con los ciclos día-noche, y está encargado de ajustar a su vez a los relojes periféricos por medio de hormonas, además los relojes periféricos pueden ser ajustados por la ingesta de comida siendo esta la dominante en tejidos como el hígado, brindándonos información importante sobre la relación de los genes de este reloj periférico y la influencia metabólica en el mismo. Los efectos de una dieta específica sobre la expresión de genes circadianos han sido probados por Hatori y colaboradores, en el cual un grupo de ratones macho de ocho semanas C57BL/6J son sometidos a una dieta de ingesta diaria de alimento (Kcal/ratón) alta en calorías (18% proteína, 61% grasa, 21% carbohidratos) a dos diferentes condiciones, una en donde estos pueden alimentarse *ad libitum*, y otra restringida a sus horas

de actividad. Después de varias semanas se encontró que con una dieta *ad libitum* desarrollaban obesidad, problemas metabólicos y una disminución en la amplitud de las oscilaciones en las concentraciones relativas de componentes del reloj como *Per2*, adicional a una disminución en los niveles de varios metabolitos. En el régimen restrictivo mejoraba la función en la vía de señalización de la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK) y por tanto restauraba la expresión de los genes del reloj circadiano (Figura 3) (Hatori et al. 2012), esto debido a que el consumo de alimentos está bien definido a intervalos periódicos sin importar la ingesta calórica. Estos cambios en las vías anabólicas y catabólicas alteran el metaboloma del hígado, mejorando la utilización de nutrientes y el gasto energético.

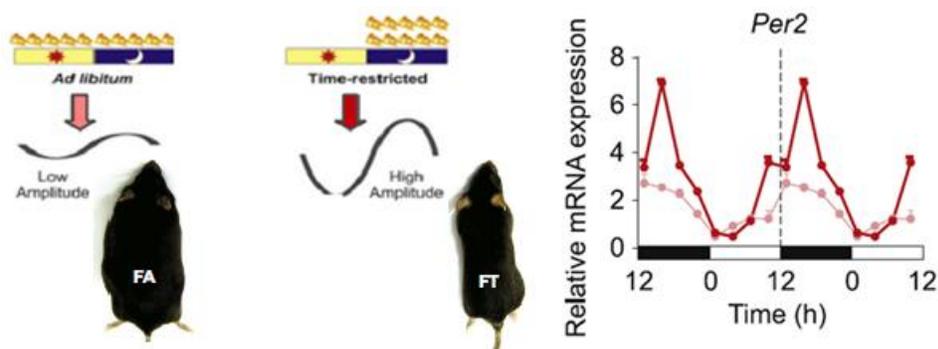


Figura 3. Niveles de ARNm del componente del reloj circadiano *Per2* en hígado a diferentes horas del día. Imagen modificada de (Hatori et al. 2012). En la imagen de la izquierda se muestra los dos grupos de ratones alimentados con dos condiciones (*ad libitum* y restringida a sus horas de actividad). Se puede ver como los ratones alimentados *ad libitum* (FA) presentan sobre peso, y los ratones con dieta restringida (FT) presentan un peso normal. La imagen de la derecha muestra los dos perfiles de expresión relativa (+SEM, n=4) de la molécula *Per2*. Se muestra como la amplitud de la oscilación disminuye en el grupo con sobre peso, mientras se mantiene constante en el grupo control. Los niveles de expresión fueron medidos usando qRT-PCR y normalizados usando los niveles de ARNm *Gapdh*.

La glucosa, vista como el combustible fundamental para la obtención de energía necesaria para la maquinaria celular de todos los tejidos, debe mantenerse en niveles apropiados y constantes, a pesar de que su producción y consumo son alternantes de acuerdo a los periodos de alimentación y ayuno. Existen mecanismos de almacenamiento de glicógeno a partir de glucosa cuando hay exceso, y en caso de privación de alimentos, los riñones y el hígado pueden sintetizar glucosa a partir de otros precursores (Arthur C. Guyton. John E. Hall 2011).

Las reacciones químicas donde se consume la glucosa para producir energía a partir de la oxidación de moléculas orgánicas se conocen como reacciones catabólicas. La energía producida en estas reacciones es llevada por unas moléculas acarreadoras llamadas adenosina trifosfato (ATP), esta energía está almacenada en el enlace covalente entre el fosfato inorgánico y la adenosina difosfato (ADP). La hidrólisis del ATP en ADP o adenosín monofosfato (AMP) es energéticamente favorable. Metabolitos como la nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) también son usados como acarreadores de energía (Alberts et al. 2014). La producción y consumo de energía en los procesos fisiológicos produce cambios en las proporciones de AMP/ATP y NAD/NADH, que a su vez activan de forma periódica a los sensores de nutrientes AMPK activado por niveles altos de AMP, y la Sirtuina1 que es una deacetilasa dependiente de NAD (SIRT1) activado por niveles altos de NAD⁺ (Lee and Kim 2013).

Se conoce de la interacción del reloj con los sensores de energía celular, por ejemplo, la deacetilación periódica de la histona H3 en el promotor de genes circadianos es regulada por SIRT1, y la proteína CRY1 es fosforilada y marca para su degradación proteosomal por el AMPK (Cantó and Auwerx 2009; Imai 2010) (ver Figura 4). Así como el complejo activador comienza el ciclo de transcripción-traducción que lleva al complejo de proteínas Per-Cry a inhibir su propia expresión, también comprende un lazo de retroalimentación de la enzima Nicotinamida fosforibosiltransferasa (NAMPT), el metabolito NAD y la SIRT1 que inactiva al complejo Bmal1-Clock. Estas interacciones han permitido desarrollar modelos que vinculan el reloj molecular circadiano con moléculas y reacciones asociados al metabolismo y la energía celular en órganos periféricos como el hígado (Woller et al. 2016) (ver Figura 5).

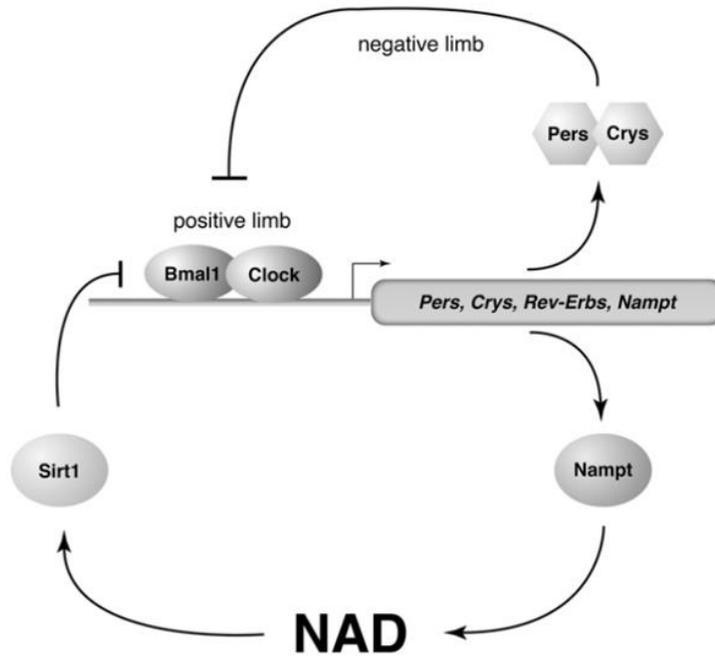


Figura 4. Lazo de retroalimentación negativa que involucra NAMPT/NAD funcionando como un oscilador metabólico complementario. (Imai 2010). La transcripción circadiana esta mediada por el complejo CLOCK: BMAL1 que comprende una extremidad positiva del ciclo de retroalimentación circadiano de transcripción-traducción. El complejo de proteínas PER y CRY inhibe la función de CLOCK: BMAL1, formando la extremidad negativa de este ciclo de retroalimentación. NAMPT / NAD / SIRT1 comprende un nuevo ciclo de retroalimentación circadiano que media la regulación rítmica de muchos eventos fisiológicos. En este ciclo de retroalimentación impulsado por NAMPT / NAD, NAD funciona como un "oscilador metabólico".

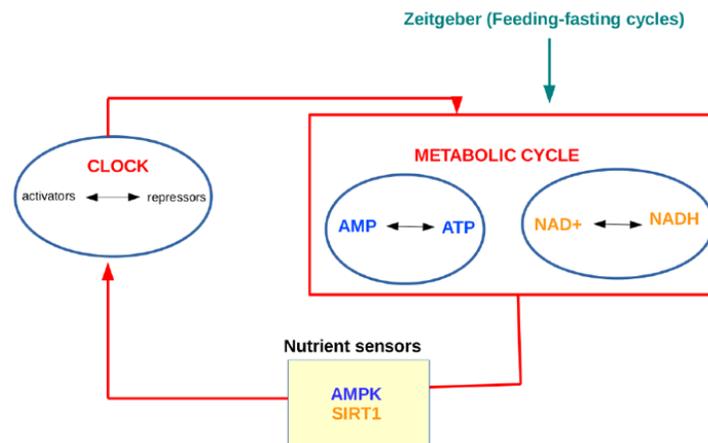


Figura 5. Esquema de la interacción entre el reloj y el metabolismo. (Woller 2016). En la figura se muestra como la periodicidad en la ingesta de alimentos da lugar a la alternancia entre los procesos metabólicos que consumen y producen energía. En consecuencia, hay variaciones diarias en los metabolitos ATP y NAD, esto lleva a una activación periódica de los sensores AMPK y SIRT1 que brindan información sobre el estado energético al reloj.

2 Justificación, Hipótesis y Objetivos

2.1 Justificación

Se sabe que los relojes circadianos interactúan con una amplia variedad de eventos fisiológicos, incluyendo el metabolismo. Moléculas asociadas al metabolismo como la AMPK y la SIRT1 presentan dinámicas con periodicidad circadiana. El hígado juega un papel central en el mantenimiento de la homeostasis energética de un organismo. De acuerdo con (Froy 2011), los ciclos de alimentación en mamíferos son un importante Zeitgeber para el reloj circadiano en el hígado, y perturbaciones en los patrones diarios de alimentación están asociados a desordenes en el metabolismo y ritmo circadiano. Por lo que surge las siguientes preguntas ¿es posible a través de un modelo matemático estudiar la interacción entre el reloj circadiano acoplado con metabolismo en hepatocito? ¿Son la robustez en el periodo y la amplitud afectados por el metabolismo? ¿Es el reloj circadiano más sensible a los parámetros asociados al metabolismo? Para responder estas preguntas se plantean la hipótesis y los objetivos siguientes.

2.2 Hipótesis

El periodo y la amplitud en la expresión del ARN mensajero *per* son características robustas del reloj circadiano en hepatocito si se toma en cuenta la interacción con el metabolismo.

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo General

Estudiar el efecto de variaciones paramétricas en la robustez del reloj circadiano acoplado con el metabolismo en hepatocito.

2.3.2 Objetivos Específicos

- Desarrollar y validar un modelo reducido de la interacción entre el reloj circadiano y el metabolismo.
- Estudiar la robustez en el periodo y la amplitud en el reloj circadiano acoplado con metabolismo ante variaciones paramétricas y diferentes dinámicas energéticas.

3 Metodología

En este capítulo se explicará la metodología que se llevará a cabo para cumplir los objetivos de este trabajo, y comprende el desarrollo del modelo matemático, las características del Zeitgeber, y el análisis de la robustez a emplear.

3.1 Desarrollo del modelo matemático

Para desarrollar el modelo matemático se parte de las interacciones moleculares básicas de la Figura 4 tomando en cuenta los desarrollos de modelos de relojes circadianos reportados en la literatura de (Daniel B Forger et al. 2003) (Gonze et al. 2005) y (Woller et al. 2016). Se usan las interacciones entre las especies químicas más relevantes de la realidad biológica de interés, realizando una simplificación como la propuesta por (Gonze et al. 2005) para un modelo de reloj circadiano. La red molecular propuesta se puede ver completa en la Figura 6. Este esquema reducido muestra la interacción entre el lazo asociado a moléculas típicas del reloj circadiano y el lazo de moléculas asociadas al metabolismo, usando la interacción metabólica propuesta por (Woller et al. 2016). La participación de la actividad de AMPK se da como una función dependiente del tiempo que altera la estabilidad de las proteínas en la interacción.

Se modela el reloj circadiano a partir de la topología básica de retroalimentación negativa que forman los genes *per* con sus ARN mensajeros, las proteínas Periodo (PER) y los complejos de proteínas Periodo-Cryptocromo (PER:CRY). Estos complejos inhiben la expresión de los genes *per*. La interacción con el metabolismo se da de acuerdo con el lazo de retroalimentación negativa reportado por (Bass 2012) en donde el complejo (SIRT1:NAD) inhibe al complejo Clock:Bmal1. Dicho complejo activa la expresión de los genes *per*, y desestabiliza a la proteína PER favoreciendo su degradación. Siguiendo a (Imai 2010) la concentración de NAD dependerá de la enzima Nicotinamida Fosforribosiltransferasa (NAMPT) la cual convierte nicotinamida en mononucleotido de nicotinamida en la biosíntesis de NAD, esta enzima es traducida de su ARN mensajero *nampt*.

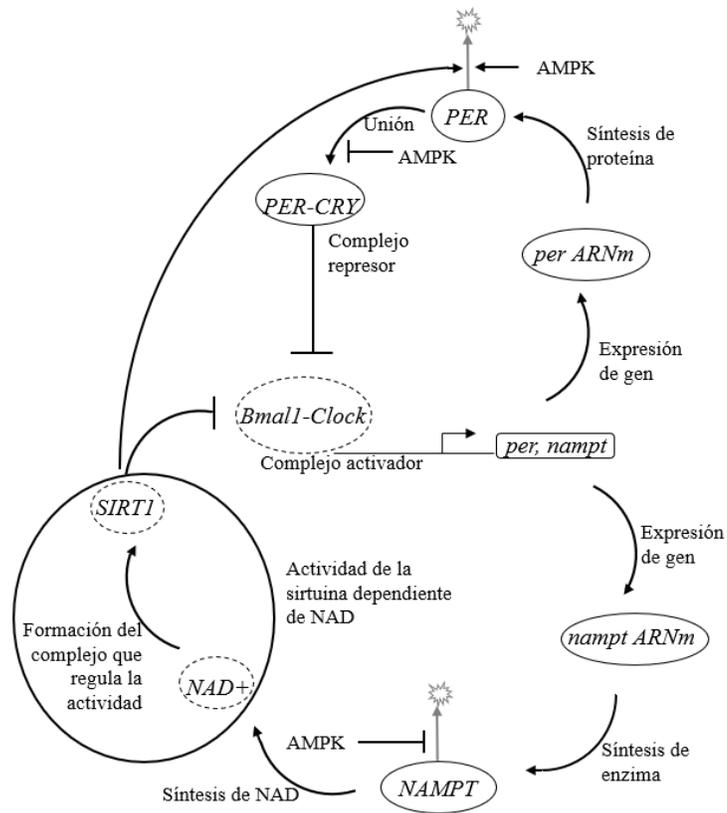


Figura 6. Red molecular del reloj circadiano acoplado con metabolismo.

Se definen así seis ecuaciones diferenciales Ec.1-6, el conjunto de variables corresponde a las moléculas en línea negra sólida de la Figura 6 y se muestran en la tabla 1. Las variables x_1 , x_2 y x_3 que representan la concentración del ARN mensajero *per*, la proteína PER y el complejo PER:CRY respectivamente cerrando así el primer lazo de retroalimentación negativa. El segundo lazo corresponde a las variables x_4 , x_5 y x_6 asociadas al metabolismo que representan la concentración del ARN mensajero *nampt*, la concentración de la enzima NAMPT y el complejo SIRT1:NAD respectivamente. Usualmente en los relojes moleculares circadianos, las moléculas sufren una serie de modificaciones que permiten su degradación. Estas modificaciones corresponden a fosforilaciones, desacetilaciones y ubiquitinaciones, donde la cinética de Michaelis-Menten es asumida, así como en otros modelos reportados (Leloup and Goldbeter 2003).

$$\begin{aligned}
x_1 &= per(t) \\
x_2 &= PER(t) \\
x_3 &= (PER:CRY)(t) \\
x_4 &= nampt(t) \\
x_5 &= NAMPT(t) \\
x_6 &= (NAD:SIRT)(t)
\end{aligned}$$

Tabla 1. Ecuaciones del modelo

Ec.	Conjunto de ecuaciones diferenciales acopladas
1	$\frac{dx_1}{dt} = v_p \left(\frac{1}{1 + \left(\frac{x_3}{k_{pe1}}\right)^n} \right) \left(\frac{1}{1 + \left(\frac{x_6}{k_{pe2}}\right)^n} \right) - v_1 \frac{x_1}{k_1 + x_1}$
2	$\frac{dx_2}{dt} = k_p x_1 - v_2 \frac{x_2}{k_2 + x_2} (1 + \alpha u(t) + \beta x_6)$
3	$\frac{dx_3}{dt} = \frac{k_{pc} x_2}{(1 + \varepsilon u(t))} - v_3 \frac{x_3}{k_3 + x_3}$
4	$\frac{dx_4}{dt} = v_n \left(\frac{1}{1 + \left(\frac{x_6}{k_{na1}}\right)^m} \right) \left(\frac{1}{1 + \left(\frac{x_3}{k_{na2}}\right)^m} \right) - v_4 \frac{x_4}{k_4 + x_4}$
5	$\frac{dx_5}{dt} = k_n x_4 - v_5 \frac{x_5}{(k_5 + x_5)(1 + \gamma u(t))}$
6	$\frac{dx_6}{dt} = k_{ns} \frac{x_5 (NADt - x_6)}{k_{nam} + (NADt - x_6)} - v_6 \frac{(x_6 - NADb)}{k_6 + (x_6 - NADb)}$

Cada ecuación posee un término de producción y otro de degradación de la especie química, En la Ec.1 el termino de producción posee una cinética tipo Hill multiplicativa de dos funciones debido a la naturaleza no competitiva de los complejos inhibidores. La tasa de acumulación v_p es una constante que representa la expresión constitutiva del gen *per* por parte del complejo activador para producir la hebra de ARNm, el parámetro n es el coeficiente de Hill y los parámetros k_{pe1} y k_{pe2} representan las constantes de inhibición asociadas a la concentración de x_3 y x_6 respectivamente. El termino de degradación está compuesto del parámetro v_1 que es la tasa constante de degradación, y del parámetro k_1 que es la constante de Michaelis-Menten.

Para la Ec.2 el termino de producción es lineal con un parámetro de tasa de acumulación constante k_p . El termino de degradación involucra un parámetro de tasa constante de

degradación v_2 , una función de Michaelis-Menten con constante k_2 y a los parámetros α y β que modulan la estabilidad de la proteína PER. La estabilidad es afectada por la actividad de la AMPK y el complejo SIRT1-NAD.

Para la Ec.3 el termino de producción está conformado por el parámetro constante k_{pc} y el parámetro ϵ que modula la estabilidad del complejo PER-CRY cuando es afectada por la AMPK para su formación. El termino de degradación involucra el parámetro v_3 como tasa de degradación y el parámetro k_3 como constante de Michaelis-Menten.

Para la Ec.4 los términos de producción y degradación comparten la misma forma que en la Ec.1 solo que ahora la tasa de acumulación es v_n , el coeficiente de Hill es m , las constantes de inhibición son k_{na1} y k_{na2} para las concentraciones de x_6 y x_3 respectivamente. El termino de degradación tiene un parámetro de tasa de degradación constante v_4 y un parámetro constante de Michaelis-Menten k_4 .

Para la Ec.5 el termino de producción es lineal con un parámetro constante de tasa de acumulación k_n , y un término de degradación que involucra un parámetro de tasa de degradación v_5 con una función Michaelis-Menten con parámetro constante k_5 y parámetro γ de modulación de la estabilidad de la enzima NAMPT cuando esta es afectada por la actividad de AMPK para impedir su degradación.

Para la Ec.6 el termino de producción posee cinética de Michaelis-Menten con un parámetro constante de tasa de acumulación k_{ns} , una constante k_{nam} que representa una concentración tal que la velocidad de producción de NAD es la mitad de su máximo valor. Adicionalmente la constante $NADt$ representa la contribución total a la concentración de NAD por parte de las diferentes vías que llevan a su síntesis, como lo son por triptófano, ácido nicotínico, nicotinamida ribósido, y nicotinamida (White and Schenk 2012). El termino de degradación posee un parámetro de tasa de degradación constante v_6 , una constante de Michaelis-Menten k_6 y una constante $NADb$ que representa la concentración basal de NAD.

Todos los parámetros de las ecuaciones son constantes positivas tomadas de las referencias (Gonze et al. 2005) (Woller 2016) y están tabulados en la Tabla 1. Los parámetros numerados del 1-13 son parámetros asociados al lazo de moléculas circadianas mientras que del 14-31

al lazo de moléculas asociadas al metabolismo. La validación del modelo se encuentra en la sección de resultados.

Tabla 2. Parámetros del modelo

Nº	Parámetros	Descripción	Valor
1	vp	Tasa de acumulación de per	0.7 nM h^{-1}
2	n	Coefficiente de Hill	4
3	$kpe1$	Constante de inhibición	1 nM
4	$v1$	Tasa de degradación de per	0.35 nM h^{-1}
5	$k1$	Constante de Michaelis para degradación de per	1 nM
6	kp	Tasa de acumulación de PER	0.7 h^{-1}
7	$v2$	Tasa de degradación de PER	0.35 nM h^{-1}
8	$k2$	Constante de Michaelis para degradación de PER	1 nM
9	kpc	Tasa de acumulación del complejo PER-CRY	0.7 h^{-1}
10	ϵ	Modulación de la estabilidad de PER por AMPK	0.22
11	$v3$	Tasa de degradación del complejo PER-CRY	0.35 nM h^{-1}
12	$k3$	Constante de Michaelis para degradación de PER-CRY	1 nM
13	$kna2$	Constante de inhibición	1 nM
14	$kpe2$	Constante de inhibición	1 nM
15	α	Modulación de la estabilidad de PER por AMPK	0.05
16	β	Modulación de la estabilidad de PER por SIRT1	0.25 nM^{-1}
17	vn	Tasa de acumulación de nampt	0.7 nM h^{-1}
18	m	Coefficiente de hill	4
19	$kna1$	Constante de inhibición	1 nM
20	$v4$	Tasa de degradación de nampt	0.35 nM h^{-1}
21	$k4$	Constante de Michaelis para degradación de nampt	1 nM
22	kn	Tasa de acumulación de NAMPT	0.7 nM
23	$v5$	Tasa de degradación de NAMPT	0.35 nM h^{-1}
24	$k5$	Constante de Michaelis para degradación de NAMPT	1 nM
25	γ	Modulación de la estabilidad de NAMPT por AMPK	0.62
26	kns	Tasa de acumulación de NAD	0.7 h^{-1}
27	$NADt$	Concentración total de NAD	4.19 nM
28	$knam$	Constante de Michaelis para acumulación de NAD	1 nM
29	$v6$	Tasa de degradación de NAD	0.35 nM h^{-1}
30	$NADb$	Concentración basal de NAD	0.91 nM
31	$k6$	Constante de Michaelis para degradación de SIRT-NAD	1 nM

Los parámetros asociados a los lazos de retroalimentación están representados por los números 2, 3, 13, 14, 18, y 19 de la Tabla 2. El resto son considerados parámetros cinéticos asociados a las reacciones químicas de producción y degradación.

3.2 Característica del Zeitgeber

El Zeitgeber que se utilizó en este trabajo fue la actividad de la molécula AMPK, esta es modelada como una función dependiente del tiempo $u(t)$ que representa la dinámica energética en el hepatocito. Un estado alto de actividad significa bajos niveles de ATP y estados bajos denotan altos niveles de ATP. Esta función esta reportada por (Woller et al. 2016) para un periodo de oscilación de 24 h y es ajustada a partir de datos experimentales reportados por (Gowans et al. 2013) donde el perfil de expresión de la AMPK se toma de hepatocitos de un grupo de ratones durante 24 h. Es construida a partir de la función señal escalón de entrada, Ec.7, aplicada a modelos de relojes circadianos propuesta por (Adams et al. 2012). Esta función hace las veces de control en los experimentos numéricos y está configurada por seis parámetros: *offset* (Θ_0), *amplitud* (Θ_1), *duración de pulso* (T_p), *periodo de oscilación* (T_c), *duración de la rampa* (T), y *fase* (ϕ). Adicionalmente se utilizan periodos de ciclo de 21 y 27 h como nuevas condiciones, las descripciones están resumidas en la Tabla 3.

$$\begin{aligned} f(t) = & \Theta_0 + 0.5 * \Theta_1 * \left(1.0 + \tanh \left(T_c * \left((t + \phi) / T_c - \text{floor}((t + \phi) / T_c) \right) / T \right) \right) \\ & - 0.5 * \Theta_1 * \left(1.0 + \tanh \left((T_c * \left((t + \phi) / T_c - \text{floor}((t + \phi) / T_c) \right) - T_p) / T \right) \right) \\ & + 0.5 * \Theta_1 * \left(1.0 + \tanh \left((T_c * \left((t + \phi) / T_c - \text{floor}((t + \phi) / T_c) \right) - T_c) / T \right) \right) \end{aligned} \quad (7)$$

Tabla 3. Características de la función dependiente del tiempo

Perfil de expresión del Zeitgeber	función $u(t)$	Periodos de oscilación en h	Interpretación biológica
	A	1=21 2=24 3=27	Representa la ingesta de alimentos durante los periodos de actividad de un ratón en condiciones normales (control)
	B		Representa una situación en la que el animal come la mayor parte del tiempo <i>Ad libitum</i> .
	C		Representa una situación en la que el animal está privado de alimento la mayor parte del tiempo.

De la Tabla 3 se puede observar las características de las funciones que representan las dinámicas energéticas debidas a la actividad de la AMPK. Sus formas están dadas por los parámetros de la Ec.7 como se muestran a continuación.

A: $u(t) = f_1 + f_2$. Donde

$$f_1 = f(t), \text{ con } \theta_0 = 0.0, \theta_1 = 2.5, T_c = 24, T_p = 5, T = 1.2, \phi = -3$$

$$f_2 = f(t), \text{ con } \theta_0 = 0.0, \theta_1 = 0.4, T_c = 24, T_p = 4, T = 1.2, \phi = 9$$

$$B: u(t) = f(t), \text{ con } \theta_0 = 0.0, \theta_1 = 0.35, T_c = 24, T_p = 4, T = 1.2, \phi = -3$$

$$C: u(t) = f(t), \text{ con } \theta_0 = 2.0, \theta_1 = 0.45, T_c = 24, T_p = 4, T = 1.2, \phi = -3.5$$

3.3 Análisis de la robustez

Para estudiar la robustez del Reloj Circadiano Acoplado con el Metabolismo (RCAM), primero se llevan a cabo las simulaciones numéricamente utilizando el software MATLAB, resolviendo el sistema de ecuaciones utilizando la función ode15 para diferentes condiciones

iniciales. Con el fin de verificar que el sistema siempre alcance el mismo equilibrio en las oscilaciones, se mide el periodo y la amplitud en una ventana de tiempo en dicho equilibrio para la variable x_1 que representan el ARNm *per*. Esto se hace para el sistema con oscilaciones autosostenidas y con oscilaciones entrenadas por el Zeitgeber.

Luego cada parámetro de la Tabla 2 se modifica $\pm 30\%$ de su valor nominal, utilizando un numero aleatorio de distribución uniforme se genera esta modificación, la variación se hace para un total de 100 hepatocitos. Se mide el cambio en el periodo y la amplitud pico-pico respecto a los valores iniciales y se gráfica. En las gráficas, el eje de las (x) representa el total de parámetros numerados de 1-31. En el eje de las (y) se muestran el porcentaje de variación del periodo y la amplitud para oscilaciones autosostenidas y entrenadas, donde un rombo representa la media y sus barras la desviación estándar. Se utiliza un criterio de $\pm 12\%$ de variación en el periodo de 24 h tomado de trabajos experimentales reportados por (Welsh et al. 1995) (Honma et al. 2004) para determinar si el periodo medido exhibe una dinámica circadiana. Para la amplitud no existe un criterio definido debido a que en la literatura los datos reportados solo hablan de expresiones relativas, es por esto que se propone en este trabajo un criterio igual de $\pm 12\%$ de variación en la amplitud pico-pico. Primero, se hace una medición de la amplitud respecto de la amplitud en la oscilación autosostenida para el estudio de la robustez en ese caso. Segundo, respecto de la amplitud cuando el sistema esta en presencia de la función $u(t)=A$, que es la que posee más relevancia biológica y de la que se desprenden la mayoría de los resultados, esta última servirá de control para las demás condiciones B y C. Se puede ver un resumen de la metodología en la Tabla 4.

Tabla 4. Resumen del estudio realizado en este trabajo

Sistema	Contexto biológico	Propiedad de estudio	Conjunto de perturbaciones			
			Parámetros cinéticos y topológicos			
RCAM	Hepatocito	Periodo	Oscilación autosostenida	Oscilación con Zeitgeber		
		Amplitud		A	B	C

En la Tabla 4 se muestra a manera representativa el estudio que es llevado a cabo en este trabajo. Primero se utiliza un sistema que comprende un modelo de reloj circadiano acoplado con metabolismo, en el contexto biológico de un hepatocito. Las propiedades por estudiar son el periodo y la amplitud de oscilación de un reportero de esta maquinaria molecular, que es el ARNm *per*. El conjunto de perturbaciones corresponde a los parámetros del modelo y que bajo los valores que poseen describen la dinámica circadiana. Pero no todos los parámetros son de la misma naturaleza, algunos representan la fuerza de los lazos de retroalimentación y otros las reacciones químicas que se llevan a cabo para la producción y degradación de las especies químicas. Finalmente se prueba el modelo ante variaciones paramétricas cuando exhibe oscilaciones autosostenidas, y luego cuando este sujeto a una dinámica energética por parte de la AMPK.

4 Resultados

El estudio de robustez desarrollado en este trabajo consiste en el modelo desarrollado de RCAM en hepatocito. En este capítulo se describen los resultados obtenidos al validar el modelo en sus dos condiciones (autosostenida y con Zeitgeber) y los resultados de periodo y amplitud de la oscilación en el ARNm *per* ante las variaciones en los parámetros cinéticos y topológicos.

4.1 Implementación y validación del modelo

En esta sección se ven los resultados de la utilización del modelo para reproducir una dinámica circadiana, en sus dos condiciones. Siguiendo a (Relógio et al. 2011) se normalizo la amplitud de oscilación en el ARNm *per* entre el máximo y mínimo valor de sus concentraciones relativas.

4.1.1 Oscilaciones autosostenidas del RCAM

Para validar el modelo se realizó una serie de simulaciones con la función $u(t) = 0$ para representar oscilaciones autosostenidas. La Figura 8(a) muestra la oscilación normalizada de la concentración relativa del ARNm *per*, se puede notar como el sistema se comporta de manera autónoma completando un ciclo de oscilación cada 24 h. El periodo medido fue de 24.02 h. La Figura 8(b) muestra el plano fase entre la concentración del ARNm *per* y la concentración de la proteína PER normalizados, se puede observar como exhiben oscilaciones autosostenidas. El modelo es por tanto consistente con una dinámica circadiana.

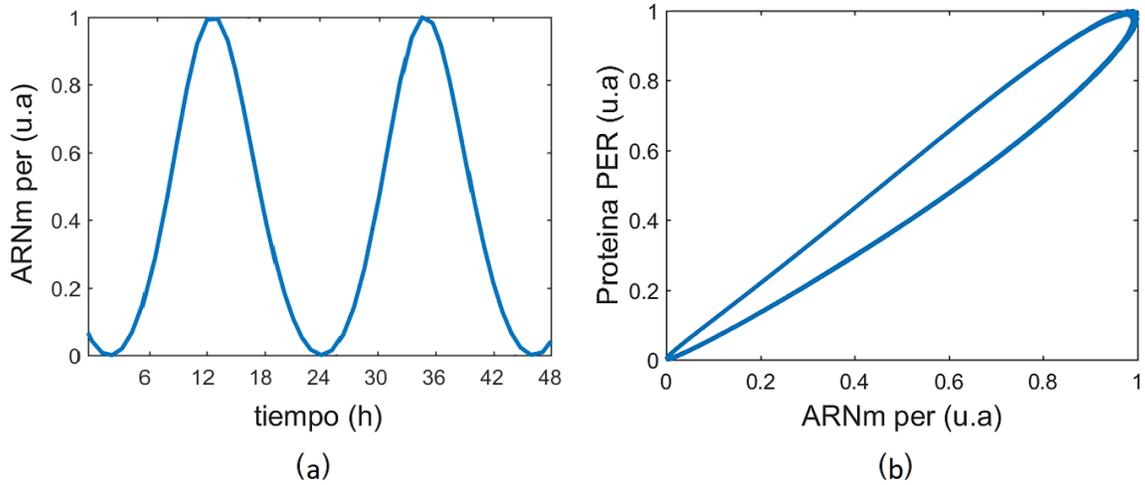


Figura 7. Oscilaciones autosostenidas. (a) oscilación circadiana en el ARNm *per*. (b) plano de fase entre el mensajero y la proteína.

4.1.2 Oscilaciones del RCAM en presencia de la dinámica energética

Para validar el modelo en esta condición se hace uso de la función $u(t)=A$ de la Tabla 3, que representa la dinámica energética de AMPK en una condición normal de alimentación siguiendo a (Woller et al 2016). La Figura 9(a) muestra la oscilación circadiana normalizada del ARNm *per* con periodo de 24 h, se puede notar cómo el sistema sigue la dinámica circadiana. La Figura 9(b) muestra el plano fase entre el mensajero y la proteína, donde se puede notar cómo la proteína cambia su dinámica respecto a la condición autosostenida, esto es debido a que la actividad de la AMPK afecta directamente la estabilidad de la proteína en su degradación alterando así la fase de producción y degradación respecto del mensajero.

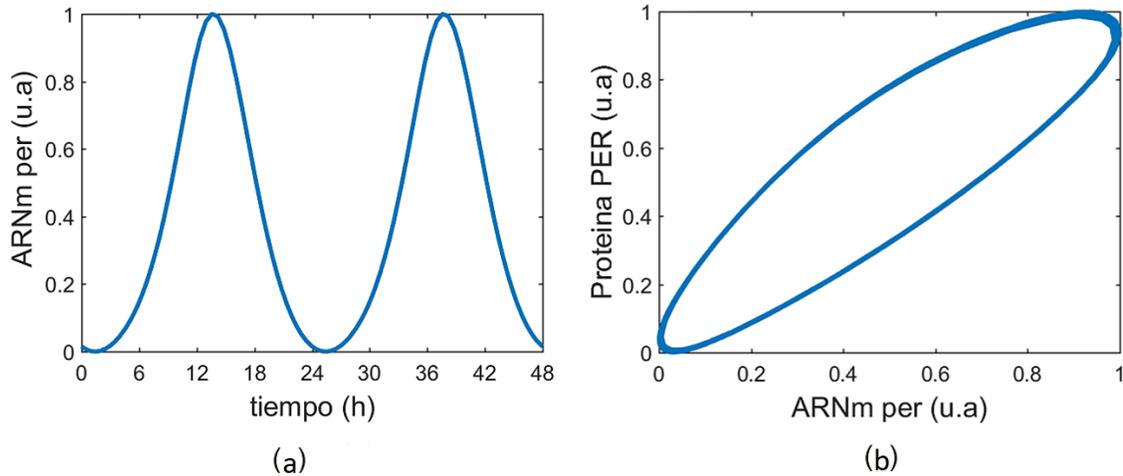


Figura 8. Oscilaciones en presencia de la función $u(t)=A$. (a) oscilación circadiana en el ARNm per. (b) plano de fase entre el mensajero y la proteína.

4.2 Estudio de la robustez

En esta sección se muestran los resultados de la variación paramétrica en las diferentes condiciones, esta variación comprende todos los parámetros de la Tabla 2. Con el fin de identificar bajo que condiciones hay mayor robustez y en que parámetros esta se ve afectada. En las gráficas, la línea roja marca el criterio en el periodo y amplitud para oscilación en el rango circadiano.

4.2.1 Robustez del RCAM con oscilaciones autosostenidas

Para estudiar la robustez en el modelo primero se debe de conocer cuál es la variación del sistema ante las variaciones paramétricas. Esto con el fin de identificar cuáles son los parámetros más sensibles a estos cambios que alteran la dinámica circadiana. Es aquí donde los criterios antes mencionados en la metodología para determinar si las oscilaciones siguen un ciclo circadiano en cuanto al el periodo y la amplitud son requeridos, ya que nos dan información acerca del comportamiento del modelo en un intervalo de tiempo y amplitud dado. La Figura 10(a) muestra la variación del periodo resultante al ir variando cada uno de los parámetros utilizados, nótese como el modelo es sensible a un conjunto de parámetros

cuya media y desviación estándar están fuera de rango de $\pm 12\%$, estos son: 2,4,7,13,14,17,18,19,20,23,29,30,31. De estos parámetros, el grupo (2,4,7,13) pertenecen al lazo de moléculas circadianas, con dos parámetros cinéticos y dos topológicos que corresponden al coeficiente de Hill en la Ec.1, tasa de degradación de ARNm *per*, tasa de degradación de proteína PER, y constante de inhibición en la función Hill en la Ec.4 dependiente de la concentración del complejo PER:CRY. El grupo (14-31) pertenecen al lazo de moléculas metabólicas, con cuatro parámetros topológicos y cinco cinéticos que corresponden en orden a la constante de inhibición en la función Hill Ec.1 dependiente de la concentración del complejo SIRT1:NAD, tasa de acumulación de ARNm *nampt*, coeficiente de Hill Ec.4, constante de inhibición en la función Hill Ec.4 dependiente de la concentración del complejo SIRT1:NAD, tasa de degradación de ARNm *nampt*, tasa de degradación de proteína NAMPT, tasa de degradación de NAD, concentración basal de NAD, y constante de Michaelis-Menten para degradación de proteína NAMPT, respectivamente. La Figura 10(b) muestra la variación resultante en las amplitudes al modificar los diferentes parámetros, la cual se ve alterada por casi todos los parámetros a excepción de ϵ, α, γ que modulan la estabilidad de las proteínas, la concentración total de NAD y la constante de Michaelis-Menten para la acumulación de NAD. Esto indica que el sistema es sensible ante variaciones en la mayoría de sus parámetros tanto en periodo como en amplitud, siendo esta última visiblemente la más afectada.

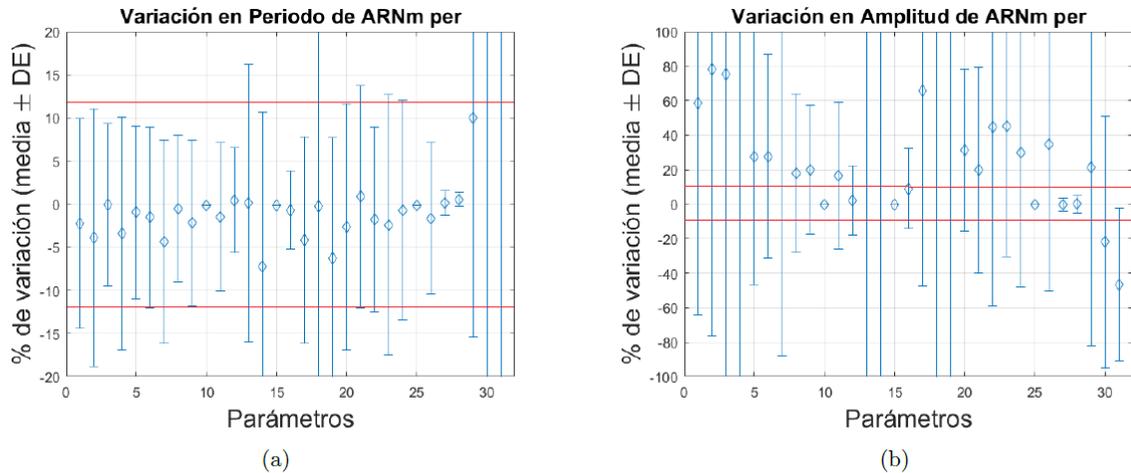


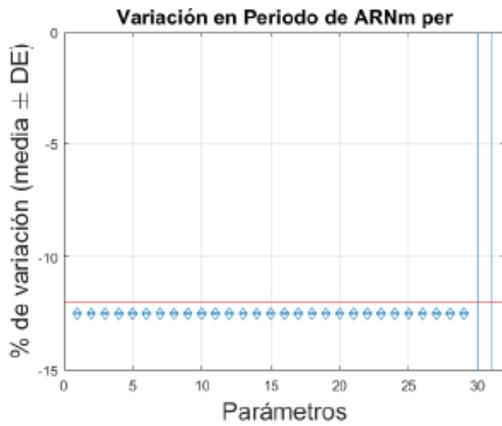
Figura 9. Graficas de la robustez con oscilaciones autosostenidas. (a) variación en el periodo de oscilación. (b) variación en la amplitud de oscilación. En (a), y (b) se observa el total de parámetros contra el porcentaje de variación en periodo respecto de 24 h y el porcentaje de variación en amplitud medido respecto a su amplitud normal respectivamente. Cada rombo representa la media y cada barra la desviación estándar de esa media para un total de 100 hepatocitos. Las líneas rojas representan el criterio de $\pm 12\%$ para el cual se define si un periodo es circadiano y una amplitud es normal.

4.2.2 Robustez del RCAM con dinámica energética normal

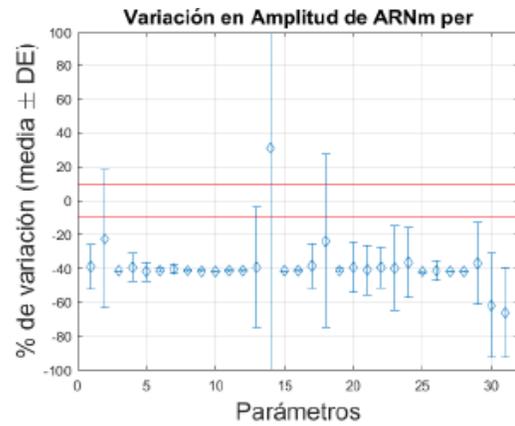
Para estudiar la robustez del modelo sujeto a la dinámica energética de AMPK en una condición control y observar los efectos de la variación paramétrica en presencia de esta señal, se usó la función $u(t)=A$ con tres distintos periodos (ver Tabla 3). La Figura 11 muestran los efectos sobre la robustez en la condición de una dinámica energética normal. Se puede notar como, cuando se utiliza un periodo de 21 h en la función $u(t)$ (Figura 11a), el sistema sigue completamente esta señal periódica sin problemas a pesar de las variaciones de los parámetros, aunque la amplitud se ve disminuida en consecuencia como se muestra en la Figura 11(b). La Figura 11(c) muestra los efectos sobre la robustez cuando el periodo del *zeitgeber* es de 24 h, el sistema sigue esta señal y se observa menos variación que en la condición autosostenida, aun así, cuatro parámetros hacen que se presente una sensibilidad mayor en el periodo del oscilador circadiano. Por su parte la amplitud, mostrada en la Figura 11(d) presenta una mayor variación marcada en los parámetros correspondientes al lazo metabólico. La Figura 11(e) muestra los efectos sobre la robustez cuando el periodo de entrenamiento es de 27 h, el sistema tiende a seguir esta condición excepto por seis

parámetros que representan una variación tendiente a disminuir el periodo del oscilador circadiano. La Figura 11(f) muestra como la amplitud en esta última condición tiende a aumentar para la mayoría de los parámetros, excepto para los mismos seis parámetros.

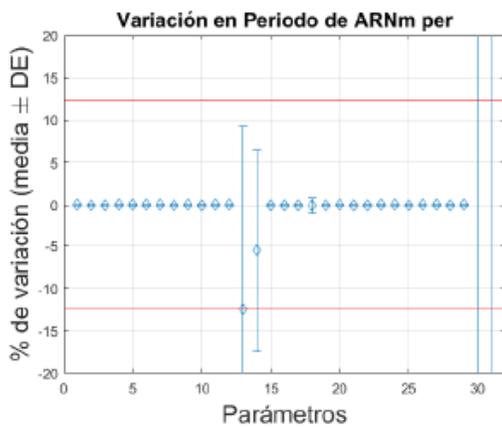
Se puede concluir que la condición control, con un entrenamiento con un periodo de 24 h es la que le otorga al sistema una mayor robustez. Adicionalmente, los parámetros topológicos 2,13,14 y 18 afectaron la dinámica del sistema en las tres condiciones, así como los parámetros cinéticos 30 y 31 que representan una completa pérdida de comportamiento circadiano cuando son afectados, tal y como en las oscilaciones autosostenidas.



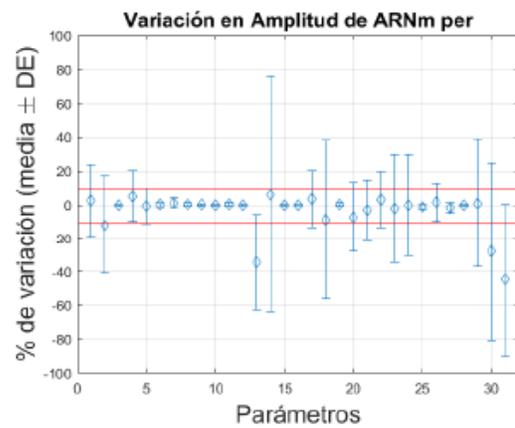
(a)



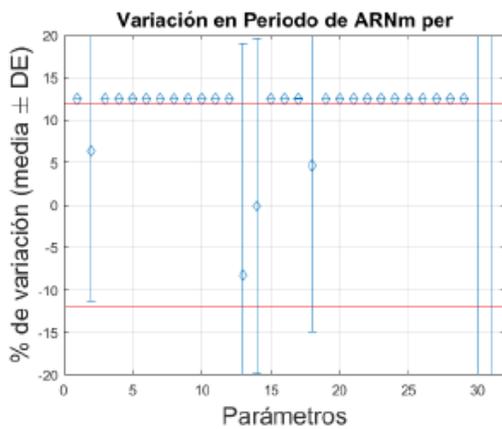
(b)



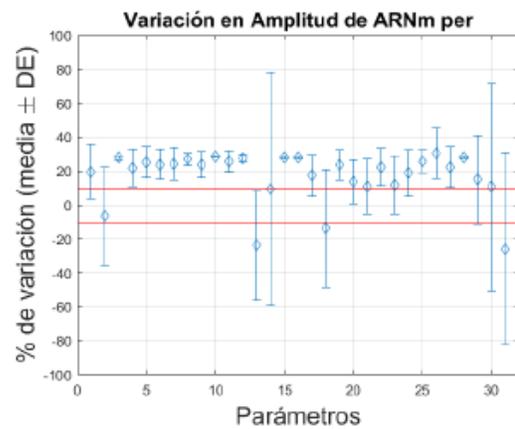
(c)



(d)



(e)



(f)

Figura 10. Graficas de la robustez con oscilaciones en presencia de la función $u(t)=A$ con tres distintos periodos. variación en periodo y amplitud de oscilación. (a)(b) para un periodo de 21 h. (c)(d) para un periodo de 24 h. (e)(f) para un periodo de 27 h. En (a, c, e), y (b, d, f,) se observa el total de parámetros contra el porcentaje de variación en periodo respecto de 24 h y el porcentaje de variación en amplitud medido respecto a su amplitud normal respectivamente. Cada rombo representa la media y cada barra la desviación estándar de esa media para un total de 100 hepatocitos. Las líneas rojas representan el criterio de $\pm 12\%$ para el cual se define si un periodo es circadiano y una amplitud es normal.

4.2.3 Robustez del RCAM con dinámica energética alta

En este experimento se estudia la robustez del sistema en presencia de una actividad de AMPK baja con tres diferentes periodos de oscilación, para lograr esto se usa la función $u(t)=B$. La Figura 12 muestra el efecto que tiene sobre la robustez una dinámica energética alta. La Figura 12(a) muestra como el sistema nuevamente sigue el periodo de 21 h del *zeitgeber* con algunas variaciones en los parámetros topológicos, la Figura 12(b) muestra la amplitud disminuida en alrededor de un 70% al variar cualquiera de los parámetros, a excepción del parámetro topológico 14 que produce una disminución de menor promedio, pero con una alta dispersión. La Figura 12(c) muestra como el sistema es capaz de seguir el periodo de 24 h, pero con alteraciones cuando se varían los parámetros topológicos. La Figura 12(d) muestra como la amplitud se mantiene reducida manteniendo el parámetro 14 un comportamiento similar con alta variación. La Figura 12(e) muestra que el sistema tiende a seguir también el periodo de 27 h, pero con una mayor dificultad, se puede notar por la variabilidad que presenta cuando se alteran ciertos parámetros en cuyo caso la media de las oscilaciones tiende a disminuir el periodo de oscilación a un régimen circadiano, pero con una desviación estándar (DE) más grande. La Figura 12(f) muestra la amplitud reducida aun un poco más que en las condiciones anteriores.

En estas condiciones con una dinámica energética alta, el sistema sigue a la señal de entrenamiento, aunque con un poco más de dificultad a medida que el periodo esta entre 24 y 27 h, la amplitud por su parte se mantiene disminuida incluso en el periodo de 27 h, que, en contraste con el caso de la señal de entrenamiento con un estado energético normal, donde esta tendió a aumentar. De igual manera los parámetros topológicos 13 y 14 hacen que el sistema sea más sensible a sus variaciones, así como los parámetros 30 y 31.

Se puede concluir que el sistema pierde robustez respecto de la condición anterior de dinámica energética normal, esto indica que el sistema se vuelve mas sensible ante la variación de los parámetros cuando la dinámica energética esta alta, sin importar su periodo de oscilación.

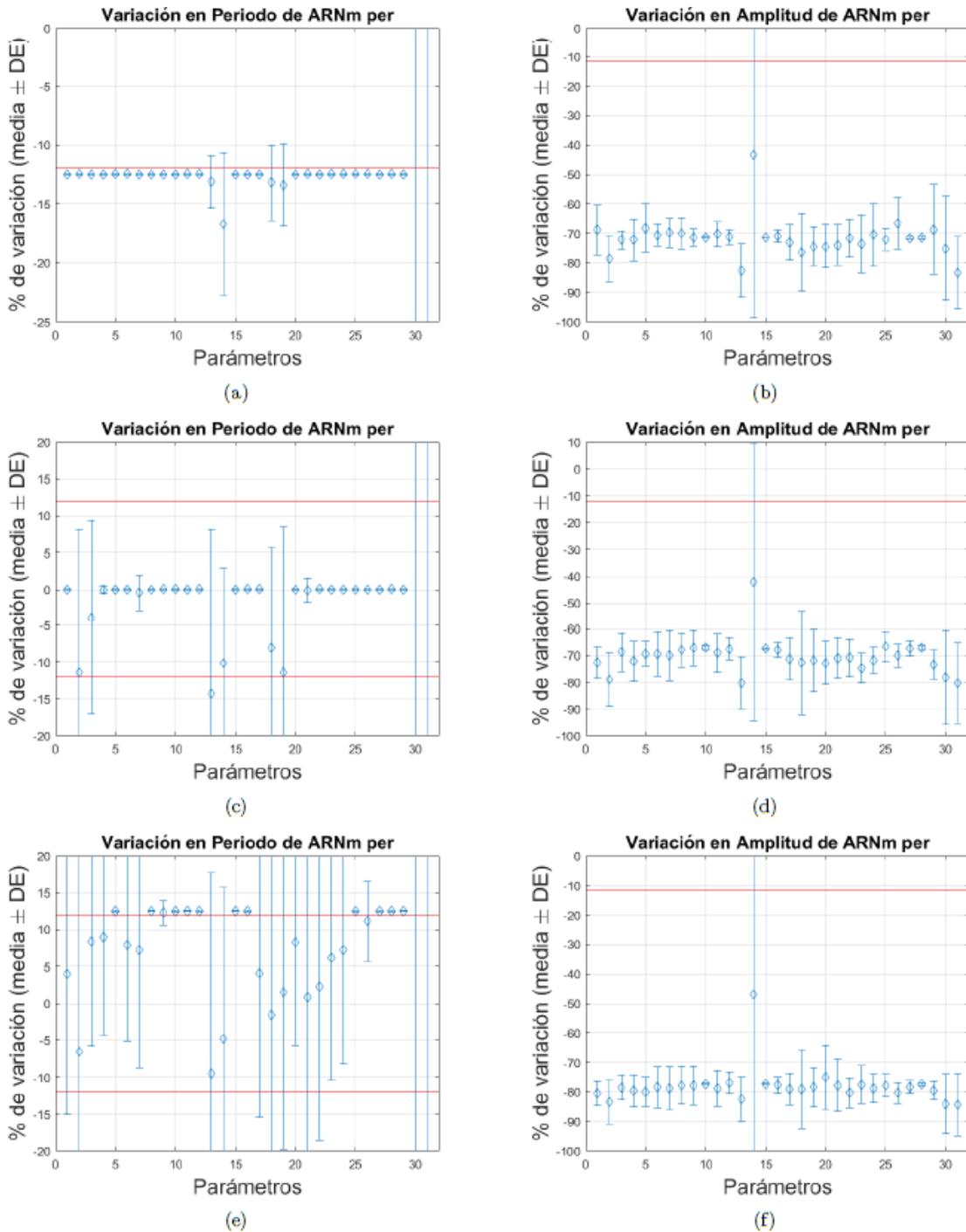


Figura 11. Graficas de la robustez con oscilaciones en presencia de la función $u(t)=B$ con tres distintos periodos. variación en periodo y amplitud de oscilación. (a)(b) para un periodo de 21 h. (c)(d) para un periodo de 24 h. (e)(f) para un periodo de 27 h. En (a, c, e), y (b, d, f,) se observa el total de parámetros contra el porcentaje de variación en periodo respecto de 24 h y el porcentaje de variación en amplitud medido respecto a su amplitud normal respectivamente. Cada rombo representa la media y cada barra la desviación estándar de esa media para un total de 100 hepatocitos. Las líneas rojas representan el criterio de $\pm 12\%$ para el cual se define si un periodo es circadiano y una amplitud es normal.

4.2.4 Robustez del RCAM con dinámica energética baja

En este experimento se estudia la robustez del sistema en presencia de una actividad de AMPK alta con tres diferentes periodos de oscilación. Para lograr esto se usó la función $u(t)=C$. La Figura 13 muestra cómo el sistema sigue por completo los tres periodos de la señal de entrenamiento sin presentar variaciones significativas entre los parámetros a excepción de los parámetros 30 y 31 que aparecen como los más sensibles en el modelo, y se observa una reducción en la amplitud cerca al 100%. Esto indica que este estado energético domina por completo al reloj circadiano y altera radicalmente su funcionamiento.

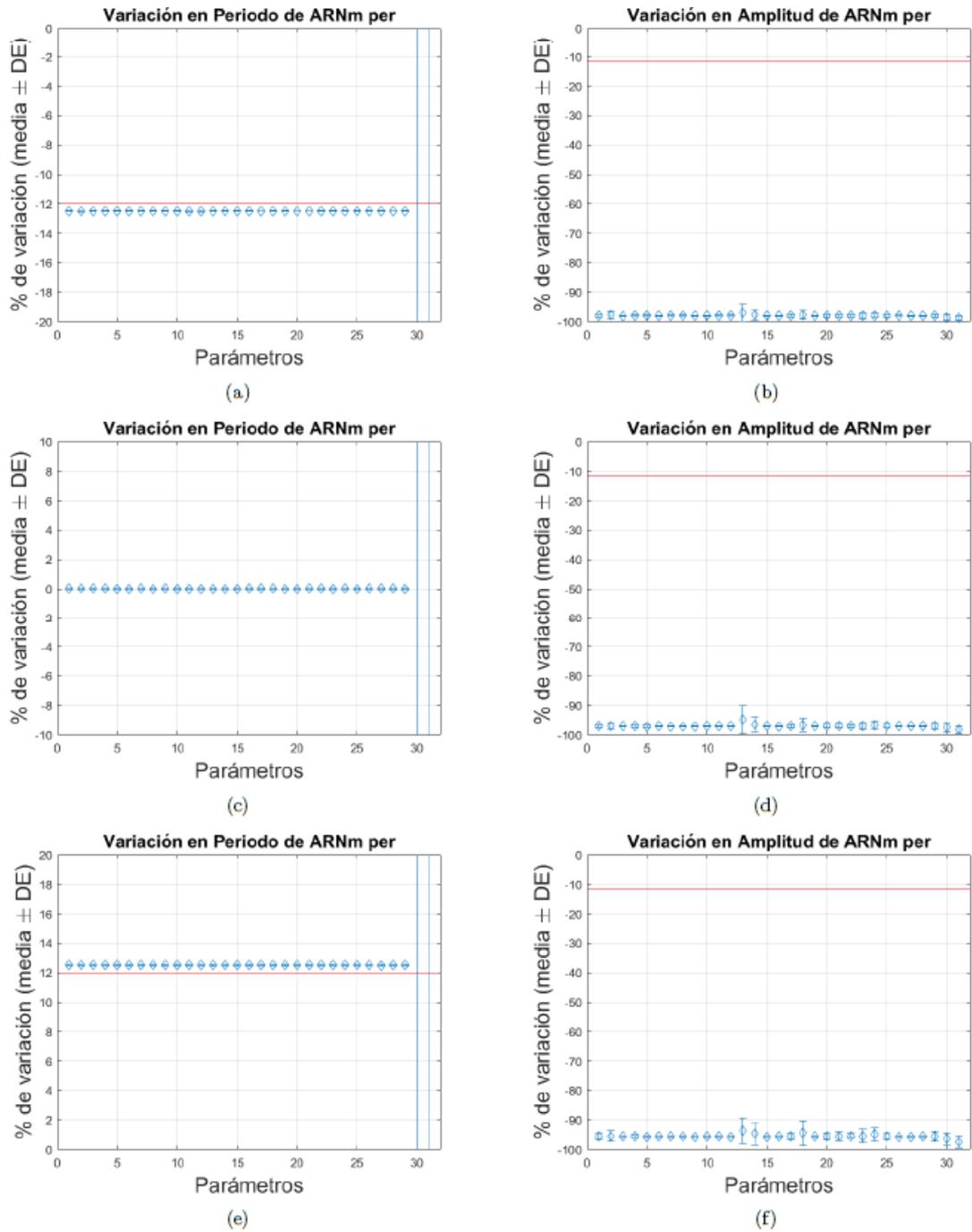


Figura 12. Graficas de la robustez con oscilaciones en presencia de la función $u(t)=C$ con tres distintos periodos. variación en periodo y amplitud de oscilación. (a)(b) para un periodo de 21 h. (c)(d) para un periodo de 24 h. (e)(f) para un periodo de 27 h. En (a, c, e), y (b, d, f,) se observa el total de parámetros contra el porcentaje de variación en periodo respecto de 24 h y el porcentaje de variación en amplitud medido respecto a su amplitud normal respectivamente. Cada rombo representa la media y cada barra la desviación estándar de esa media para un total de 100 hepatocitos. Las líneas rojas representan el criterio de $\pm 12\%$ para el cual se define si un periodo es circadiano y una amplitud es normal.

5 Discusión

En este trabajo se propuso un modelo matemático del reloj circadiano acoplado con metabolismo en hepatocito. Basados en la literatura los parámetros se toman de tal manera que reproducen la dinámica circadiana de trabajos reportados (Gonze et al. 2005), incluyendo la interacción con el metabolismo a través de la actividad periódica de la AMPK, la cual modifica la estabilidad de las proteínas del sistema de acuerdo a lo reportado por (Woller et al. 2016). En consecuencia, el modelo es consistente con los datos disponibles en la literatura y pudo ser utilizado para responder a las preguntas de este trabajo, inspirar experimentos y evaluar predicciones teóricas.

Los parámetros cinéticos asociados a las degradaciones tanto en mensajero como en proteínas del modelo alteraron el periodo de oscilación. Esto es consistente con (Gérard, Gonze, and Goldbeter 2009) encontrando la dependencia del periodo a los parámetros asociados a la degradación en modelos mínimos circadianos. Los parámetros topológicos afectaron la robustez del sistema en ambos lazos de retroalimentación. Esto se debe a que las funciones y sus parámetros le otorgan al sistema la suficiente no linealidad que necesita para mantener oscilaciones (Podkolodnaya, Tverdokhle, and Podkolodnyy 2017). Sin embargo, el sistema fue más sensible a parámetros asociados al lazo metabólico. Este lazo está compuesto principalmente por parámetros asociados a la enzima NAMPT la cual en modelos de *Neurospora* ha mostrado como su concentración está involucrada en procesos de fosforilación. Estos procesos determinan la compensación en temperatura en los relojes circadianos al igual que la estabilidad de la proteína PER (Narasimamurthy and Virshup 2017). A pesar de las pistas para entender este mecanismo, aún no se han probado en modelos de mamífero, pero se cree que podría estar conservado y cumplir una función similar. Adicionalmente, hubo una contribución importante por parte del complejo que forma la NAD con la Sirtuina al inhibir la expresión de los genes circadianos. Esto concuerda con (Cantó and Auwerx 2009) donde este complejo conecta directamente las perturbaciones metabólicas con resultados que afectan la transcripción de genes circadianos.

El sistema entrenado por una dinámica energética alta, muestra resultados similares a lo reportado por (Hatori et al. 2012) (Woller et al. 2016) en el que esta condición reducía la amplitud de expresión de ARNm *per*. Este resultado indica que el Zeitgeber energético en el modelo es una señal dominante en el sistema. Se pudo verificar esto, cambiando a una dinámica energética baja. Se encontró una disminución significativa en la amplitud, más que en el estado energético alto, esto se puede deber a que el estado energético depende de la actividad de la AMPK, la cual está interviniendo en los términos de degradación de las proteínas más constantemente (Lee and Kim 2013).

En este estudio se encontró como la concentración basal de NAD y la constante de Michaelis para degradación de SIRT:NAD, afectan la robustez circadiana, esto es importante debido a que la coenzima NAD provee poder oxidativo reductor para la generación de ATP en la mitocondria, el gasto energético perturba estos niveles como se ha mostrado previamente en estudios en músculo esquelético (White and Schenk 2012), el cual también posee un reloj circadiano molecular en sus células. Estas vías de señalización metabólica entonces pueden afectar la dinámica de estos relojes de manera significativa.

Una predicción importante de este estudio indica que la energía celular afecta la dinámica del ciclo circadiano fuertemente en su amplitud, pero no en su periodo. Trabajos experimentales recientes apuntan a que, en fibroblastos de mamíferos, el periodo y no la amplitud son robustos ante perturbaciones del metabolismo a través del catabolismo de la glucosa y las reacciones de reducción-oxidación (Putker et al. 2017). Estos procesos están involucrados en la respiración celular que comprende una serie de reacciones bioquímicas, que resultan en la generación de energía aprovechable por la célula principalmente en forma de ATP. Como consecuencia se ve alterada la dinámica de la actividad de la AMPK. Por lo tanto, este resultado concuerda con el trabajo mencionado.

Se necesitará una extensión del modelo matemático aquí propuesto para incorporar modificaciones como reacciones de reducción-oxidación, para poder responder preguntas asociadas a la actividad de vías metabólicas más específicas (Wulund and Reddy 2015), y que se podrían abordar en futuros trabajos.

6 Conclusión

A partir de los experimentos numéricos realizados con la ayuda de un modelo matemático reducido de reloj circadiano acoplado con el metabolismo en hepatocitos, se puede concluir que:

- El metabolismo contribuye a la robustez del reloj circadiano en su periodo. Siendo la dinámica energética a través de una alimentación normal un factor importante para lograrlo.
- La amplitud de las oscilaciones circadianas es una propiedad sensible ante alteraciones metabólicas.

7 Perspectivas

Este trabajo presenta un estudio de la robustez en periodo y amplitud del reloj circadiano acoplado con el metabolismo en hepatocitos, y de acuerdo con esto se plantea ampliar el estudio a analizar los posibles cambios de fase que se presenten por alteraciones metabólicas.

Con el modelo presentado se pueden realizar estudios de sincronización en poblaciones de hepatocitos y estudiar su robustez ante alteraciones en el metabolismo.

El modelo solo contempló las moléculas claves sin tener en cuenta otros lazos complementarios de retroalimentación positiva en la propia maquinaria molecular y que han sido reportados que se involucran en el metabolismo, a través de receptores mitocondriales, y en el control de las oscilaciones circadianas (Cantó and Auwerx 2009) (Relógio et al. 2011) y que valdría la pena incorporar y ver que efecto presentan estos lazos y sus moléculas en la interacción.

Debido a que el modelo en principio solo considera dos lazos de retroalimentación, para los ciclos de la maquinaria del reloj de transcripción traducción, y de las enzimas metabólicas con el ciclo de biosíntesis de NAD, interactuando con los ciclos de la cinasa AMPK, se podría incluir otro ciclo importante, el de la actividad de enzimas antioxidantes en las reacciones de reducción-oxidación como plantea (Bass 2012).

Referencias

- Adams, R R, N Tsorman, K Stratford, O E Akman, S Gilmore, N Juty, N Le Novère, and A J Millar. 2012. “The Input Signal Step Function (ISSF), a Standard Method to Encode Input Signals in SBML Models with Software Support , Applied to Circadian Clock Models.” *Journal of Biological Rhythms* 27 (4): 328–32. doi:10.1177/0748730412451077.
- Alberts, Bruce, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. 2014. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science. Vol. 6. doi:10.1002/1521-3773(20010316)40:6<9823::AID-ANIE9823>3.3.CO;2-C.
- Alderson, David L., and John C. Doyle. 2010. “Contrasting Views of Complexity and Their Implications for Network-Centric Infrastructures.” *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics Part A: Systems and Humans* 40 (4): 839–52. doi:10.1109/TSMCA.2010.2048027.
- Aronson, B., K. Johnson, J. Loros, and J. Dunlap. 1994. “Negative Feedback Defining a Circadian Clock: Autoregulation of the Clock Gene Frequency.” *Science* 263 (5153): 1578–84. doi:10.1126/science.8128244.
- Arthur C. Guyton. John E. Hall. 2011. *Textbook of Medical Physiology. XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Saunders. doi:10.1016/B978-008055232-3.60298-3.
- Bass, Joseph. 2012. “Circadian Topology of Metabolism.” *Nature* 491 (7424): 348–56. doi:10.1038/nature11704.
- Brown, Steven A., Elzbieta Kowalska, and Robert Dallmann. 2012. “(Re)Inventing the Circadian Feedback Loop.” *Developmental Cell* 22 (3). Elsevier Inc.: 477–87. doi:10.1016/j.devcel.2012.02.007.
- Buhr, Ethan D, and Joseph S Takahashi. 2013. “Molecular Components of the Mammalian Circadian Clock.” In , 217:3–27. doi:10.1007/978-3-642-25950-0.
- Bunger, Maureen K., Lisa D. Wilsbacher, Susan M. Moran, Cynthia Clendenin, Laurel A. Radcliffe, John B. Hogenesch, M. Celeste Simon, Joseph S. Takahashi, and Christopher A. Bradfield. 2000. “Mop3 Is an Essential Component of the Master Circadian Pacemaker in Mammals.” *Cell* 103 (7): 1009–17. doi:10.1016/S0092-8674(00)00205-1.
- Cantó, Carles, and Johan Auwerx. 2009. “PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an Energy Sensing Network That Controls Energy Expenditure.” *Current Opinion in Lipidology* 20 (2): 98–105. doi:10.1097/MOL.0b013e328328d0a4.
- Damiola, F., N. Le Minli, N. Preitner, B. Kornmann, F. Fleury-Olela, and U. Schibler. 2000. “Restricted Feeding Uncouples Circadian Oscillators in Peripheral Tissues from the Central Pacemaker in the Suprachiasmatic Nucleus.” *Genes and Development* 14 (23): 2950–61. doi:10.1101/gad.183500.
- Deborah Bell-Pedersen, Vincent M. Cassone, David J. Earnest, and Terry L. Thomas and Mark J. Zoran , Susan S. Golden, Paul E. Hardin. 2005. “Circadian Rhythms From Multiple Oscillators: Lessons From Diverse Organisms.” *Nature Reviews Drug Discovery* 4 (2): 121–30. doi:10.1038/nrd1633.
- Forger, D. B., and C. S. Peskin. 2003. “A Detailed Predictive Model of the Mammalian Circadian Clock.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (25): 14806–11.

doi:10.1073/pnas.2036281100.

- Forger, Daniel B, Dennis A Dean Ii, Katherine Gurdziel, Jean-christophe Leloup, Choogon Lee, Charlotte V O N Gall, Jean-pierre Etchegaray, et al. 2003. "Development and Validation of Computational Models for Mammalian Circadian Oscillators." *Integrative Biology* 7 (4): 387–400.
- Froy, O. 2011. "Circadian Rhythms, Aging, and Life Span in Mammals." *Physiology* 26 (4): 225–35. doi:10.1152/physiol.00012.2011.
- Gérard, Claude, Didier Gonze, and Albert Goldbeter. 2009. "Dependence of the Period on the Rate of Protein Degradation in Minimal Models for Circadian Oscillations." *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 367 (1908): 4665–83. doi:10.1098/rsta.2009.0133.
- Glass, L. 2001. "Synchronization and Rhythmic Processes in Physiology." *Nature* 410 (6825): 277–84. doi:10.1038/35065745.
- Gonze, Didier, Samuel Bernard, Christian Waltermann, Achim Kramer, and Hanspeter Herzel. 2005. "Spontaneous Synchronization of Coupled Circadian Oscillators." *Biophysical Journal* 89 (1). Elsevier: 120–29. doi:10.1529/biophysj.104.058388.
- Gonze, Didier, José Halloy, and Albert Goldbeter. 2002. "Robustness of Circadian Rhythms with Respect to Molecular Noise." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (2): 673–78. doi:10.1073/pnas.022628299.
- Goodwin, B C. 1965. "Oscillatory Behavior in Enzymatic Control Processes." *Advances in Enzyme Regulation* 3: 425–38. doi:10.1016/0065-2571(65)90067-1.
- Gowans, Graeme J., Simon A. Hawley, Fiona A. Ross, and D. Grahame Hardie. 2013. "AMP Is a True Physiological Regulator of Amp-Activated Protein Kinase by Both Allosteric Activation and Enhancing Net Phosphorylation." *Cell Metabolism* 18 (4). The Authors: 556–66. doi:10.1016/j.cmet.2013.08.019.
- Green, Carla B., Joseph S. Takahashi, and Joseph Bass. 2008. "The Meter of Metabolism." *Cell* 134 (5): 728–42. doi:10.1016/j.cell.2008.08.022.
- Hatori, Megumi, Christopher Vollmers, Amir Zarrinpar, Luciano DiTacchio, Eric A. Bushong, Shubhroz Gill, Mathias Leblanc, et al. 2012. "Time-Restricted Feeding without Reducing Caloric Intake Prevents Metabolic Diseases in Mice Fed a High-Fat Diet." *Cell Metabolism* 15 (6). Elsevier Inc.: 848–60. doi:10.1016/j.cmet.2012.04.019.
- Honma, Sato, Wataru Nakamura, Tetsuo Shirakawa, and Ken Ichi Honma. 2004. "Diversity in the Circadian Periods of Single Neurons of the Rat Suprachiasmatic Nucleus Depends on Nuclear Structure and Intrinsic Period." *Neuroscience Letters* 358 (3): 173–76. doi:10.1016/j.neulet.2004.01.022.
- Imai, Shin ichiro. 2010. "'Clocks' in the NAD World: NAD as a Metabolic Oscillator for the Regulation of Metabolism and Aging." *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1804 (8). Elsevier B.V.: 1584–90. doi:10.1016/j.bbapap.2009.10.024.
- Lee, Yongjin, and Eun Kyoung Kim. 2013. "AMP-Activated Protein Kinase as a Key Molecular Link between Metabolism and Clockwork." *Experimental and Molecular Medicine* 45 (7). Nature Publishing Group: e33-7. doi:10.1038/emm.2013.65.
- Leloup, Jean-Christophe, and Albert Goldbeter. 2003. "Toward a Detailed Computational Model

- for the Mammalian Circadian Clock.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (12): 7051–56. doi:10.1073/pnas.1132112100.
- Narasimamurthy, Rajesh, and David M. Virshup. 2017. “Molecular Mechanisms Regulating Temperature Compensation of the Circadian Clock.” *Frontiers in Neurology* 8 (APR): 1–5. doi:10.3389/fneur.2017.00161.
- Panda, Satchidananda, Marina P. Antoch, Brooke H. Miller, Andrew I. Su, Andrew B. Schook, Marty Straume, Peter G. Schultz, Steve A. Kay, Joseph S. Takahashi, and John B. Hogenesch. 2002. “Coordinated Transcription of Key Pathways in the Mouse by the Circadian Clock.” *Cell* 109 (3): 307–20. doi:10.1016/S0092-8674(02)00722-5.
- Panda, Satchidananda, John B. Hogenesch, and Steve A. Kay. 2002. “Circadian Rhythms from Flies to Human.” *Nature* 417 (6886): 329–35. doi:10.1038/417329a.
- Partch, Carrie L., Carla B. Green, and Joseph S. Takahashi. 2014. “Molecular Architecture of the Mammalian Circadian Clock.” *Trends in Cell Biology* 24 (2). Elsevier Ltd: 90–99. doi:10.1016/j.tcb.2013.07.002.
- Pocai, Alessandro, Silvana Obici, Gary J. Schwartz, and Luciano Rossetti. 2005. “A Brain-Liver Circuit Regulates Glucose Homeostasis.” *Cell Metabolism* 1 (1): 53–61. doi:10.1016/j.cmet.2004.11.001.
- Podkolodnaya, Olga A., Natalya N. Tverdokhle, and Nikolay L. Podkolodnyy. 2017. “Computational Modeling of the Cell-Autonomous Mammalian Circadian Oscillator.” *BMC Systems Biology* 11 (S1). BMC Systems Biology: 27–42. doi:10.1186/s12918-016-0379-8.
- Putker, Marrit, Priya Crosby, Kevin A. Feeney, Nathaniel P. Hoyle, Ana S.H. Costa, Edoardo Gaude, Christian Frezza, and John S. O’Neill. 2017. “Mammalian Circadian Period, But Not Phase and Amplitude, Is Robust Against Redox and Metabolic Perturbations.” *Antioxidants & Redox Signaling* 28: ars.2016.6911. doi:10.1089/ars.2016.6911.
- Relógio, Angela, Pal O. Westermark, Thomas Wallach, Katja Schellenberg, Achim Kramer, and Hanspeter Herzog. 2011. “Tuning the Mammalian Circadian Clock: Robust Synergy of Two Loops.” *PLoS Computational Biology* 7 (12): 1–18. doi:10.1371/journal.pcbi.1002309.
- Roenneberg, Till, and Martha Merrow. 2003. “The Network of Time: Understanding the Molecular Circadian System.” *Current Biology* 13 (5): 198–207. doi:10.1016/S0960-9822(03)00124-6.
- Stephan, F K, and I Zucker. 1972. “Circadian Rhythms in Drinking Behavior and Locomotor Activity of Rats Are Eliminated by Hypothalamic Lesions.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69 (6): 1583–86. doi:10.1073/pnas.69.6.1583.
- Welsh, David K., Diomedes E. Logothetis, Markus Meister, and Steven M. Reppert. 1995. “Individual Neurons Dissociated from Rat Suprachiasmatic Nucleus Express Independently Phased Circadian Firing Rhythms.” *Neuron* 14 (4): 697–706. doi:10.1016/0896-6273(95)90214-7.
- Whitacre, James Michael. 2012. “Biological Robustness: Paradigms, Mechanisms, Systems Principles.” *Frontiers in Genetics* 3 (MAY): 1–15. doi:10.3389/fgene.2012.00067.
- White, A. T., and S. Schenk. 2012. “NAD⁺/NADH and Skeletal Muscle Mitochondrial Adaptations to Exercise.” *AJP: Endocrinology and Metabolism* 303 (3): E308–21. doi:10.1152/ajpendo.00054.2012.

- Woller, Aurore. 2016. "Metabolism in the Liver : A Quantitative Mathematical Model Entrainment of the Mammalian Circadian Clock by Metabolism in the Liver : A Quantitative Mathematical Model." *Human Health and Pathology*.
- Woller, Aurore, H el ene Duez, Bart Staels, and Marc Lefranc. 2016. "A Mathematical Model of the Liver Circadian Clock Linking Feeding and Fasting Cycles to Clock Function." *Cell Reports* 17 (4): 1087–97. doi:10.1016/j.celrep.2016.09.060.
- Wulund, Lisa, and Akhilesh B. Reddy. 2015. "A Brief History of Circadian Time: The Emergence of Redox Oscillations as a Novel Component of Biological Rhythms." *Perspectives in Science* 6. Elsevier GmbH: 27–37. doi:10.1016/j.pisc.2015.08.002.
- Zelinski, Erin L., Scott H. Deibel, and Robert J. McDonald. 2014. "The Trouble with Circadian Clock Dysfunction: Multiple Deleterious Effects on the Brain and Body." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 40. Elsevier Ltd: 80–101. doi:10.1016/j.neubiorev.2014.01.007.
- Zheng, Binhai, Urs Albrecht, Krista Kaasik, Marijke Sage, Weiqin Lu, Sukeshi Vaishnav, Qiu Li, et al. 2001. "Nonredundant Roles of the MPer1 and MPer2 Genes in the Mammalian Circadian Clock." *Cell* 105 (5): 683–94. doi:10.1016/S0092-8674(01)00380-4.