



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI



Grup de Recerca
NUTRIGENÒMICA URV

**LAS PROANTOCIANIDINAS MODULAN DE MANERA
DIFERENTE LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL TEJIDO ADIPOSO
BLANCO EN RATAS OBESAS EN FUNCIÓN DEL
FOTOPERIODO**

Pasqual Selma Ros

TRABAJO FINAL DE GRADO BIOTECNOLOGÍA

Tutor académico y supervisor: Gerard Aragonès Bargalló, Departamento de
Bioquímica y Biotecnología, gerard.aragones@urv.cat

Tarragona, 1 de Septiembre de 2020

Yo, Pasqual Selma Ros, con DNI 20958218C, soy conocedor de la guía de prevención de plagio en la URV *Prevención, detección y tratamiento del plagio en la docencia: guía para estudiantes (aprobada en julio de 2017)* (<http://www.urv.cat/ca/vida-campus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) y afirmo que este TFG no constituye ninguna de las conductas consideradas como plagio para la URV.

Tarragona, 1 de Septiembre de 2020

Pasqual Selma

(Firma)

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer al grupo de Nutrigenómica por darme la oportunidad de formar parte de su equipo y poder realizar en su grupo las prácticas extracurriculares.

Por un lado, me gustaría agradecer a mi tutor académico y supervisor, el Doctor Gerard Aragonès Bargalló y a la estudiante de doctorado Marina Colom Pellicer por la confianza depositada en mí, por aconsejarme y resolver cualquier problema que haya tenido. Además, fue un placer formar parte del grupo, ya que ha sido una experiencia muy positiva para mí tanto a nivel profesional como personal. Es más, me ha ayudado a ampliar mis conocimientos en el ámbito académico y científico. Es por ello que gracias a este trabajo, he aprendido más sobre el campo de la nutrición y tengo una idea clara de mi futuro profesional.

Por último, quiero agradecer a mi familia y amigos por apoyarme.

INFORMACIÓN DEL CENTRO

Los resultados presentados en este Trabajo de Final de Grado (TFG) han sido obtenidos durante mi estancia de prácticas extracurriculares en uno de los proyectos de investigación del grupo de Nutrigenómica del Departamento de Bioquímica y Biotecnología de la Universidad Rovira i Virgili (URV).

El grupo de Nutrigenómica se encuentra dirigido por María Begoña Mugerza Marquínez y está formado por doctores, investigadores postdoctorales y estudiantes de doctorado del Departamento de Bioquímica y Biotecnología de la URV.

El objetivo principal del grupo es el estudio del diseño de alimentos funcionales para prevenir y paliar enfermedades metabólicas, como la obesidad y la hipertensión, entre otras. En la actualidad, el grupo tiene varias líneas de investigación activas y en una de ellas fue donde pude realizar mi TFG. En concreto, me centré en la evaluación de los efectos de compuestos fenólicos, proantocianidinas, sobre la obesidad. Las proantocianidinas son compuestos bioactivos que se encuentran presentes en varios alimentos, donde mi proyecto se centró en la evaluación de un extracto de proantocianidinas de semillas de uva (GSPE) contra la obesidad, ya que el grupo de Nutrigenómica destaca por tener una gran experiencia investigando los efectos biológicos de las proantocianidinas.

CONTEXTUALIZACIÓN DEL TFG

La realización de las prácticas extracurriculares se vio afectada por la crisis del COVID-19, originando cambios en el desarrollo de los ensayos previstos. Al no poder ir al laboratorio por cuestiones de seguridad, la metodología de la retrotranscripción y de la PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) fueron realizadas por la estudiante de doctorado Marina Colom Pellicer.

RESUMEN

La obesidad es una enfermedad causada por una acumulación excesiva o anormal de grasa corporal. Se produce una expansión del tejido adiposo blanco (TAB) que origina alteraciones metabólicas que suponen un gran riesgo para la salud y contribuyen al desarrollo de enfermedades metabólicas como la diabetes tipo II. Las proantocianidinas, flavonoides más abundantes en la dieta humana, mejoran estas alteraciones metabólicas relacionadas con la obesidad. El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos beneficiosos de un extracto de proantocianidinas de semillas de uva (GSPE) sobre la fisiología y el metabolismo lipídico del tejido adiposo blanco inguinal (TABi) dependiendo del fotoperiodo en el que el GSPE fue administrado (18, 12 o 6 h de luz/día). Nueve grupos de ratas Fischer 344 expuestos a los correspondientes fotoperiodos fueron alimentadas con dieta estándar (STD) o de cafetería (CAF) durante 5 semanas. Durante las siguientes 4 semanas, las ratas CAF fueron suplementadas con GSPE o vehículo (VH) y los animales con dieta STD con VH. Se realizó un análisis histológico del TABi para determinar el efecto del GSPE sobre la morfología de los adipocitos. Además, se evaluó el efecto del GSPE sobre la expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico del TABi mediante RT-qPCR. Los resultados histológicos no mostraron un efecto significativo del GSPE sobre la morfología del TABi asociada a la obesidad inducida por la dieta en ningún fotoperiodo analizado. No obstante, el GSPE moduló de manera diferente la expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico del TABi dependiendo del fotoperiodo. En conclusión, las proantocianidinas y otros polifenoles podría modular la funcionalidad del tejido adiposo de manera diferente dependiendo del fotoperiodo en el que se consumen.

Palabras clave: obesidad, TABi, GSPE, fotoperiodo, metabolismo lipídico, dieta de cafetería

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| AGRADECIMIENTOS | 3 |
| INFORMACIÓN DEL CENTRO | 4 |
| CONTEXTUALIZACIÓN DEL TFG | 4 |
| RESUMEN | 5 |
| ÍNDICE | 6 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 8 |
| 1.1 OBESIDAD..... | 8 |
| 1.1.1 FACTORES CLAVE EN EL AUMENTO DE LA OBESIDAD | 8 |
| 1.1.2 ENFERMEDADES RELACIONADAS CON LA OBESIDAD | 8 |
| 1.2 TEJIDO ADIPOSO | 9 |
| 1.2.1 ADIPOGÉNESIS..... | 10 |
| 1.2.2 TIPOS DE TEJIDO ADIPOSO | 10 |
| 1.2.2.1 TEJIDO ADIPOSO BLANCO (TAB) | 11 |
| 1.2.2.2 TEJIDO ADIPOSO MARRÓN (TAM) | 12 |
| 1.2.2.3 TEJIDO ADIPOSO BEIGE O <i>BRITE</i> | 13 |
| 1.2.3 TEJIDO ADIPOSO Y OBESIDAD | 14 |
| 1.3 RITMOS CIRCANUALES..... | 15 |
| 1.3.1 MECANISMOS MOLECULARES ESTACIONALES..... | 16 |
| 1.3.2 RITMOS ESTACIONALES EN EL TEJIDO ADIPOSO | 17 |
| 1.4 POLIFENOLES | 18 |
| 1.4.1 EXTRACTO DE PROANTOCIANIDINAS DE SEMILLAS DE UVA (GSPE) | 19 |
| 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 21 |
| 2.1 HIPÓTESIS..... | 21 |
| 2.2 OBJETIVO PRINCIPAL..... | 21 |
| 2.3 OBJETIVOS SECUNDARIOS | 21 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 22 |
| 3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL | 22 |
| 3.2 GSPE | 23 |
| 3.3 ANÁLISIS HISTOLÓGICO..... | 23 |
| 3.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA..... | 24 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.4.1 | EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL | 24 |
| 3.4.2 | RETROTRANSCRIPCIÓN..... | 25 |
| 3.4.3 | PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (RT-qPCR) | 26 |
| 3.5 | ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 26 |
| 4. | RESULTADOS | 28 |
| 4.1 | ANÁLISIS HISTOLÓGICO..... | 28 |
| 4.2 | ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA..... | 30 |
| 5. | DISCUSIÓN | 36 |
| 6. | CONCLUSIONES | 41 |
| 7. | BIBLIOGRAFÍA..... | 42 |
| 8. | AUTOAVALUACIÓN..... | 47 |
| 9. | ANEXOS..... | 48 |
| | ANEXO 1: PERSPECTIVAS DE FUTURO | 48 |
| | ANEXO 2: COMPOSICIÓN FENÓLICA DEL GSPE | 48 |
| | ANEXO 3: REACTIVOS EMPLEADOS DE LA <i>MASTERMIX</i> DE LA RETROTRANSCRIPCIÓN | 49 |
| | ANEXO 4: REACTIVOS EMPLEADOS DE LA <i>MASTERMIX</i> DE LA RT-qPCR..... | 49 |
| | ANEXO 5: ANÁLISIS HISTOLÓGICO | 50 |
| | ANEXO 6: EFICIENCIA DE LOS <i>PRIMERS</i> | 50 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1 OBESIDAD

La obesidad es una enfermedad crónica causada por una acumulación excesiva o anormal de grasa corporal, siendo un gran riesgo para la salud humana. Esta enfermedad se caracteriza por un desequilibrio energético entre la ingesta de alimentos y el gasto de energía corporal [1][2].

Actualmente, la obesidad se ha convertido en la principal epidemia del siglo XXI según la Organización Mundial de la Salud (OMS) [3][4][5]. Es más, en 2008 la obesidad y el sobrepeso afectaban aproximadamente a 1,500 millones de personas en el mundo, dato que ha ido incrementando lo largo de los años. En la actualidad, se estima que casi 2,000 millones de personas padecen obesidad o sobrepeso. Asimismo, se estima que en 2030 aproximadamente 2,1600 millones de personas padezcan sobrepeso y 1,120 millones sean obesas en todo el mundo [6]. Por tanto, la obesidad se ha convertido en un grave problema de salud pública, ya que las personas que padecen dicha enfermedad presentan un elevado riesgo a desarrollar una amplia variedad de enfermedades metabólicas [2][7].

1.1.1 FACTORES CLAVE EN EL AUMENTO DE LA OBESIDAD

Entre los principales factores responsables del aumento de la obesidad destacan los cambios tecnológicos, ya que cada vez se requiere menor gasto energético, realizando una vida sedentaria tanto en actividades profesionales como personales diariamente. Otro factor a tener en cuenta, son los cambios producidos en el sistema alimentario durante las últimas décadas que han propiciado una mayor prevalencia de obesidad y sobrepeso en la población mundial. En este contexto, se destaca un aumento de la ingesta de alimentos de origen animal vinculado con una ingesta excesiva de grasas saturadas y una reducción de la ingesta de alimentos de origen vegetal en la dieta, alimentos de importante fuente nutricional [6].

1.1.2 ENFERMEDADES RELACIONADAS CON LA OBESIDAD

La obesidad es uno de los principales trastornos metabólicos del síndrome metabólico (MetS). El MetS se caracteriza por un conjunto de factores interrelacionados como obesidad, hipertensión, resistencia a la insulina y dislipidemia, entre otras enfermedades. Es por ello, que con la aparición de estos factores se incrementa el riesgo de padecer diabetes mellitus tipo II (T2DM), artritis, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), enfermedades cardiovasculares (CVD) y varios tipos de cáncer como cáncer de páncreas o de esófago [2][4][8].

A medida que se aumenta la obesidad, se incrementa el riesgo a padecer varias enfermedades. Por ello, la obesidad juega un papel primordial en el desarrollo de factores de riesgo de distintas enfermedades (Figura 1) [2][7].

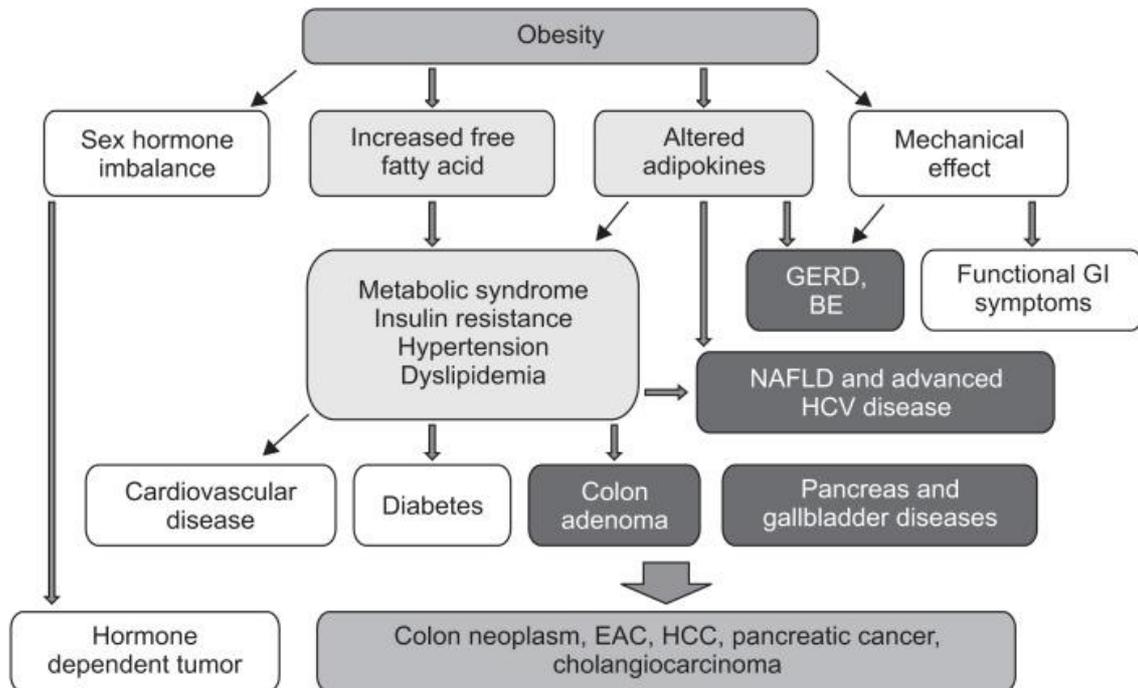


Figura 1. Efecto de la obesidad en varias enfermedades metabólicas. Esta alteración metabólica induce el síndrome metabólico (MetS) y puede contribuir al desarrollo de enfermedades digestivas y de cáncer. Abreviaturas: GI, gastrointestinal; NAFLD, enfermedad no alcohólica del hígado graso; GERD, enfermedad por reflujo gastroesofágico; BE, esófago de Barrett; VHC, virus de la hepatitis C; EAC, adenocarcinoma esofágico; HCC, carcinoma hepatocelular [9].

Entre las estrategias recomendadas para la prevención de la obesidad destacan las intervenciones en el estilo de vida, en concreto sobre la dieta y la actividad física con el fin de controlar el equilibrio energético. No obstante, los avances más novedosos destacan la modulación de la ingesta de alimentos y gasto energético en el ámbito de la nutrición a través del diseño de nuevos alimentos funcionales [10].

1.2 TEJIDO ADIPOSO

El tejido adiposo es un tejido conectivo compuesto por diferentes tipos de células, principalmente por adipocitos, cuya principal función es el almacenamiento lipídico y el resto son macrófagos, células endoteliales, fibroblastos, preadipocitos, células estromales y otras células inmunes, coordinadas para la secreción de citoquinas y varias hormonas [11][12][13][14].

Los adipocitos se caracterizan por almacenar el exceso de energía en el organismo procedente de la dieta en forma de lípidos y en condiciones de déficit de nutrientes, a través de la lipólisis suministran nutrientes a otros tejidos [15]. Además, estas células tienen un papel fundamental en la regulación de numerosas funciones biológicas, como la reproducción, el equilibrio energético y la inflamación. Este tejido es uno de los principales órganos endocrinos, ya que secreta una gran variedad de hormonas denominadas adipocinas, como la leptina y la adiponectina, que juegan un papel fundamental en el metabolismo energético de los mamíferos [13][16].

En los seres humanos, el tejido adiposo representa entre un 10-30 % del peso corporal en condiciones sanas mientras que en situaciones de obesidad puede representar hasta el 70 % de masa corporal [2]. Asimismo, el exceso de adiposidad asociado a la obesidad provoca alteraciones en el equilibrio energético y en varios procesos fisiológicos, pudiendo llegar a desarrollar enfermedades metabólicas, como T2DM, dislipidemia y CVD [2][13][17].

1.2.1 ADIPOGÉNESIS

La adipogénesis es el proceso de diferenciación de los adipocitos maduros a partir de las células precursoras, donde participan una amplia variedad de factores de transcripción como el *peroxisome proliferator activated receptor* γ (PPAR γ), un factor crítico proadipogénico. Otros factores de transcripción que intervienen en la maduración adipocitaria son varios miembros de las familias C/EBP, IRF, STAT y SREBP. Además, es necesario un control endocrino de la adipogénesis, como las hormonas tiroideas. Por ejemplo, la triyodotironina (T3) que produce la inducción de la diferenciación de los adipocitos marrones mientras que las hormonas esteroideas regulan el desarrollo y distribución de las reservas energéticas. Por otro lado, se destaca la participación en la adipogénesis de otras hormonas como las citoquinas y las hormonas peptídicas y también el papel que tienen los microARN (miRNA). Es por ello, que la adipogénesis es una maquinaria biológica muy compleja en la que participan diversos factores de transcripción y señales bioquímicas para la formación y modificación de los adipocitos del tejido adiposo [2][14][18]. Respecto al origen de cada uno de los diferentes tipos de adipocitos se detalla a continuación dependiendo del tejido adiposo en cuestión.

1.2.2 TIPOS DE TEJIDO ADIPOSO

Principalmente el tejido adiposo se clasifica en tres tipos: blanco (TAB), marrón (TAM) y beige o *brite* según sus diferentes estructuras y funciones biológicas. Los adipocitos regulan una amplia

variedad de funciones biológicas que pueden verse alteradas en diferentes situaciones, como la obesidad o exposición de bajas temperaturas [11][13].

Estructuralmente, los adipocitos blancos destacan por ser uniloculares con un núcleo descentralizado, grandes reservas de lípidos. Por el contrario, los adipocitos marrones son multiloculares con un núcleo centrado, pequeñas gotas lipídicas y con mayor cantidad de mitocondrias que los adipocitos blancos, que le proporcionan su color marrón característico mientras que los adipocitos beige son parecidos a los adipocitos blancos, ya que se encuentran en él, pero con ciertos estímulos adquieren un fenotipo similar a los adipocitos marrones (Figura 2) [11][13][19].

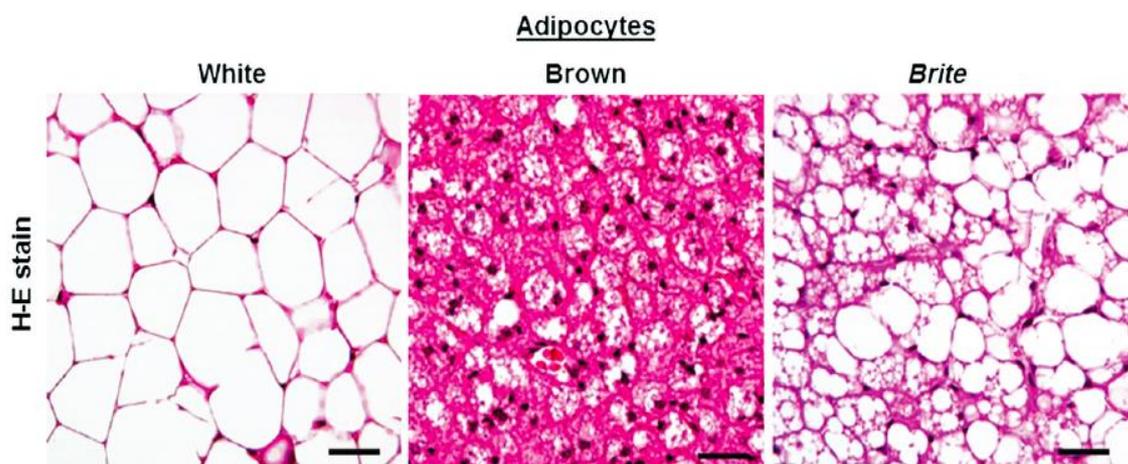


Figura 2. Adipocitos de los tejidos adiposos blanco, marrón y beige o brite (microscopía de luz con tinción de hematoxilina-eosina (H-E stain)) [11].

1.2.2.1 TEJIDO ADIPOSITO BLANCO (TAB)

La principal función del TAB es almacenamiento y distribución de energía en el organismo [19]. La energía almacenada dentro de los adipocitos blancos se encuentra en forma de triacilglicéridos (TAG) en las gotas lipídicas, estas gotas ocupan aproximadamente el 90 % del espacio citoplasmático desplazando el núcleo del centro de la célula [2].

En situaciones de exceso de nutrientes, los adipocitos blancos sufren una hipertrofia con el fin de aumentar el tamaño de los adipocitos y una hiperplasia para aumentar su número, expandiendo así el tejido adiposo, llegando a aumentar su diámetro de 30 μm a 230 μm . Mientras que en situaciones de ejercicio o ayuno se produce la movilización de dichas reservas energéticas hacia otras partes del cuerpo para el desarrollo de las funciones biológicas correspondientes [19].

El origen de estos adipocitos se produce a partir de la diferenciación de las células madre mesenquimales (CMM), dando lugar a células del factor regulador miogénico 5 - (Myf5 -) que a su vez estas originan los preadipocitos que dan lugar a adipocitos maduros en el proceso de adipogénesis. Durante estas vías de señalización, se destaca la participación de reguladores transcripcionales de la adipogénesis como el PPAR γ , y miembros de la familia de las proteínas CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) como C/EBP α y C/EBP β [2][12].

El TAB se clasifica en dos tipos principales de depósitos, el TAB visceral (TABv) y el TAB subcutáneo (TABs), destacando el tejido adiposo blanco inguinal (TABi) un tipo de TABs (Figura 3). Ambos tejidos se encuentran correlacionados con los desordenes metabólicos como la T2DM o la resistencia a la insulina, pero difieren en diversas funciones. Por ejemplo, el TABv presenta una lipólisis más activa que en TABs en respuesta a la represión de la lipólisis por la insulina y las catecolaminas [8].

1.2.2.2 TEJIDO ADIPOSO MARRÓN (TAM)

El TAM al igual que el TAB se origina a partir de las CMM, mayoritariamente a partir de las células Myf5 + a diferencia del TAB que es a partir de Myf5 - . Las Myf5 + dan lugar a preadipocitos marrones que a su vez origina adipocitos marrones maduros. Sin embargo, se han descubierto adipocitos marrones en varias zonas del organismo como el músculo esquelético donde estos adipocitos marrones provienen de células Myf5 - [11].

Como se ha comentado anteriormente, los adipocitos marrones son más pequeños que los adipocitos blancos, pero presentan una gran cantidad de mitocondrias con una elevada tasa de respiración que junto con los pequeños depósitos de lípidos facilitan la producción de calor a partir de los ácidos grasos, proceso bioquímico denominado como termogénesis no adaptativa. El TAM es un tejido muy activo metabólicamente que está muy vascularizado e innervado por el sistema nervioso simpático y su función principal en TAM es la termogénesis. En situaciones de frío, se estimula la producción de calor a través de la termogénesis no adaptativa con la finalidad de mantener la temperatura normal del cuerpo [2][13][14].

En la termogénesis no adaptativa participan una amplia variedad de factores como el monofosfato de adenosina cíclica (cAMP) o de la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1). No obstante, cabe destacar el papel fundamental de la proteína de desacoplamiento 1 (UCP1), proteína transmembrana que disipa la energía en forma de calor a través del desacoplamiento

de protones de la cadena respiratoria [11][12][20]. Por ello, la termogénesis en TAM se ha asociado con un aumento de gasto energético y la reducción de adiposidad y lípidos plasmáticos [18].

Por otro lado, el TAM es abundante en seres humanos recién nacidos, niños y en los roedores, pero se puede encontrar activado por señales específicas en humanos adultos. En general, el TAM se encuentra repartido en el cuerpo en zonas como alrededor de vasos, corazón, hombros, ingles, entre otros con la finalidad de disipar fácilmente la energía en forma de calor y mantener la temperatura corporal normal (Figura 3) [13][15].

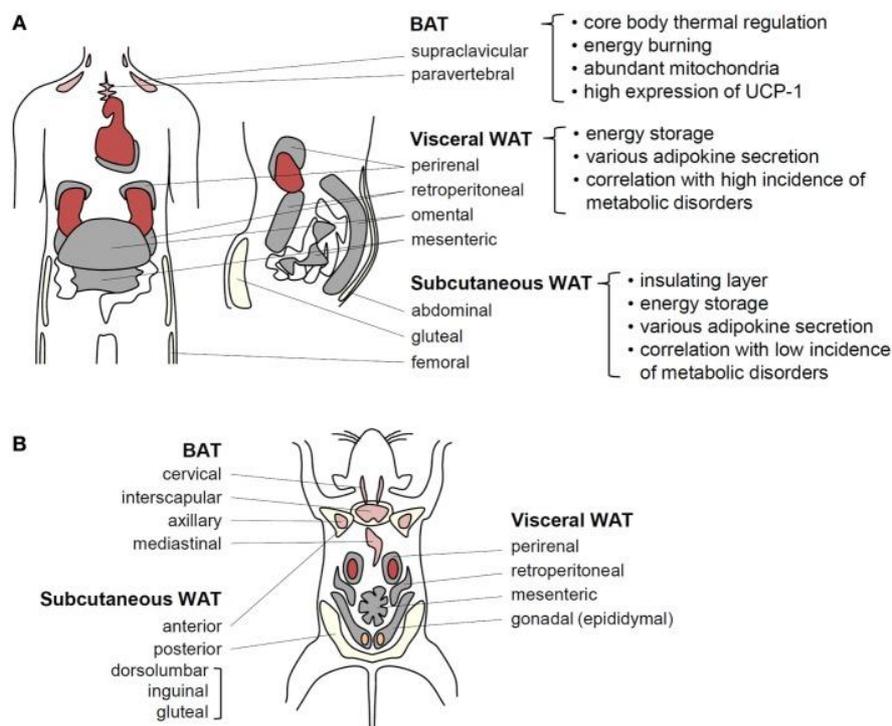


Figura 3. Localización y funciones de diferentes tipos de tejido adiposo en humanos y roedores [15].

1.2.2.3 TEJIDO ADIPOSITO BEIGE O BRITE

En los últimos años, los adipocitos beige o *brite* (marrón en blanco) fueron descubiertos como adipocitos similares fenotípicamente a los adipocitos marrones pero localizados en TAB. Los adipocitos beige se comportan como adipocitos blancos, pero adquieren características de los adipocitos marrones en respuesta del estímulo específico apropiado mediante el procedimiento de oscurecimiento o pardeamiento. Además, se ha demostrado que el proceso de oscurecimiento es reversible, ya que el adipocito de beige puede transformarse en un adipocito blanco de nuevo mediante una baja expresión de PRDM16 y UCP1 [11][13].

Respecto al linaje celular de estos adipocitos, ha estado en discusión durante los últimos años. La teoría más aceptada es la de la transferenciación, que postula que por acción de estímulos fríos o farmacológicos para aumentar la temperatura corporal se produce la transformación de TAB a tejido adiposo beige que provienen de las células Myf5 - al igual que los adipocitos del TAB [20].

El tejido adiposo beige presenta una gran cantidad de mitocondrias, gotas lipídicas pequeñas en su interior celular y son capaces de expresar la UPC1. Además, comparten funciones metabólicas y morfológicas comunes en los humanos y todos los roedores. En este caso, al producirse una inducibilidad diferencial de los adipocitos se denomina como termogénesis adaptativa, anteriormente comentada, comparable a la del TAM. Los adipocitos beige se encuentran repartidos ampliamente por el organismo. Por ello, varios estudios han centrado su interés en estudiar el papel que pueden tener el TAM y el tejido adiposo beige como terapia potencial contra enfermedades metabólicas como la obesidad y la T2DM [12][13][19].

1.2.3 TEJIDO ADIPOSO Y OBESIDAD

En la obesidad, debido a un desequilibrio energético crónico positivo se produce una expansión del tejido blanco por dos mecanismos diferentes en respuesta al exceso energético [8][21].

Esta expansión puede ser “saludable” reclutando y diferenciando nuevas células precursoras de adipocitos, en vez de producirse infiltraciones de grasa en los adipocitos maduros. Esta expansión se produce a través del aumento del número de adipocitos (hiperplasia), anteriormente comentada, que protege a los adipocitos de las alteraciones metabólicas de la obesidad. En los adipocitos hiperplásicos se produce una reducción de la liberación de los ácidos grasos, liberación de citoquinas proinflamatorias, hipoxia, un aumento de la adiponectina y una mejora de la sensibilidad a la insulina.

Por el contrario, se puede producir una expansión “no saludable” a través de la hipertrofia de los adipocitos, promoviendo alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad, anteriormente comentadas como NAFLD, CVD, T2DM o resistencia a la insulina. Esta excesiva acumulación calórica “no saludable” se produce en los depósitos viscerales y tejidos ectópicos (corazón, músculo esquelético e hígado). En los adipocitos hipertróficos se produce una disminución de la adiponectina y empeoramiento de la sensibilidad a la insulina.

Además, se produce una inflamación del TAB con un aumento de la liberación de citoquinas proinflamatorias, un aumento de hipoxia, y una lipotoxicidad local (Figura 4) [8][15][21][22][23]. Asimismo, estos adipocitos hipertróficos a diferencia de los hiperplásicos contienen células productoras del factor de necrosis tumoral α (TNF α) y del interferón γ (IFN γ) que producen inhibición del desarrollo de los adipocitos.

Por tanto, la inflamación en el tejido adiposo es un factor clave en la disfunción del tejido adiposo que empeora las consecuencias asociadas de padecer obesidad [2][14]. Sin embargo, cabe destacar que no todos los pacientes obesos tienen el mismo riesgo a padecer enfermedades relacionadas con la obesidad. Por ejemplo, en respuesta a un exceso energético en el TABs, este tejido no se puede expandir de manera “saludable” y conduce a alteraciones metabólicas en el TABv causando enfermedades relacionadas con la obesidad [2].

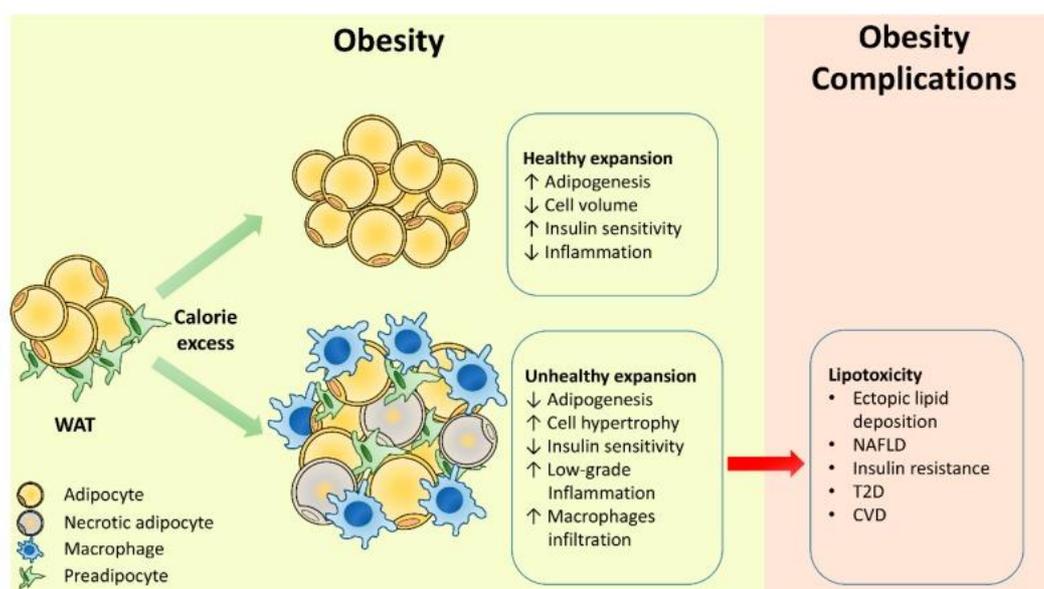


Figura 4. Expansión del tejido adiposo blanco (TAB) en situación de obesidad. En condiciones de expansión “saludable” y “no saludable” con sus correspondientes características celulares y sus complicaciones asociadas [21].

1.3 RITMOS CIRCANUALES

Los ritmos biológicos se encuentran en todos los organismos, tanto los circadianos como los estacionales, los cuales están relacionados con la nutrición y el metabolismo. Además, es importante destacar el papel de la luz, ya que participa en varias vías de señalización, tanto metabólicas como fisiológicas [24][25].

Por otro lado, cabe destacar la influencia de los nutrientes de la dieta, ya que pueden alterar los ritmos biológicos. Por ejemplo, compuestos bioactivos como los polifenoles pueden interactuar con los ritmos biológicos. Además, ha sido demostrado que el consumo de alimentos

funcionales mediante la modulación de los ritmos biológicos presentan efectos positivos contra varias enfermedades anteriormente comentadas como el MetS o la obesidad [24].

Respecto a los ritmos estacionales, las distintas variaciones medioambientales como la temperatura y la duración del día (fotoperiodo) conocidos como relojes circanuales, provocaron a las diversas especies originar mecanismos específicos para su supervivencia a lo largo del año [26][27]. Los ritmos estacionales varían en función de la luz, dependiendo de la duración del día estacional y de las variaciones del fotoperiodo. Además, cabe destacar que en respuesta a los cambios estacionales se produce una alta regulación hormonal que actúa de manera coordinada, dando lugar a los mecanismo moleculares estacionales [26].

1.3.1 MECANISMOS MOLECULARES ESTACIONALES

Los mecanismos moleculares que dan lugar a los ritmos biológicos se dan principalmente en relación a dos bucles de retroalimentación transcripcional-traduccionales, *brain and muscle ARNT-like 1* (BMAL1) y *circadian locomotor output cycles kaput* (CLOCK). Donde el reloj central común de todas las células es el heterodímero CLOCK/BMAL1 que estimula la transcripción del gen *Period circadian regulator* (*Per*) y del gen *Cryptochrome circadian regulator* (*Cry*) y activa la expresión génica de *Bmal1*. Asimismo, el heterodímero PER/CRY funciona como bucle negativo de la transcripción CLOCK/BMAL1. Además, hay dos bucles de retroalimentación, *Nuclear receptor RAR-related orphan receptor alpha* (*Rora*) y *Reverse-erythroblastosis virus* (*Rev-erba*), cuyas expresiones están reguladas por CLOCK/BMAL1. Mientras que REV-ERB α actúa como inhibidor de *Bmal1* y ROR α actúa de activador de *Bmal1* (Figura 5) [24].

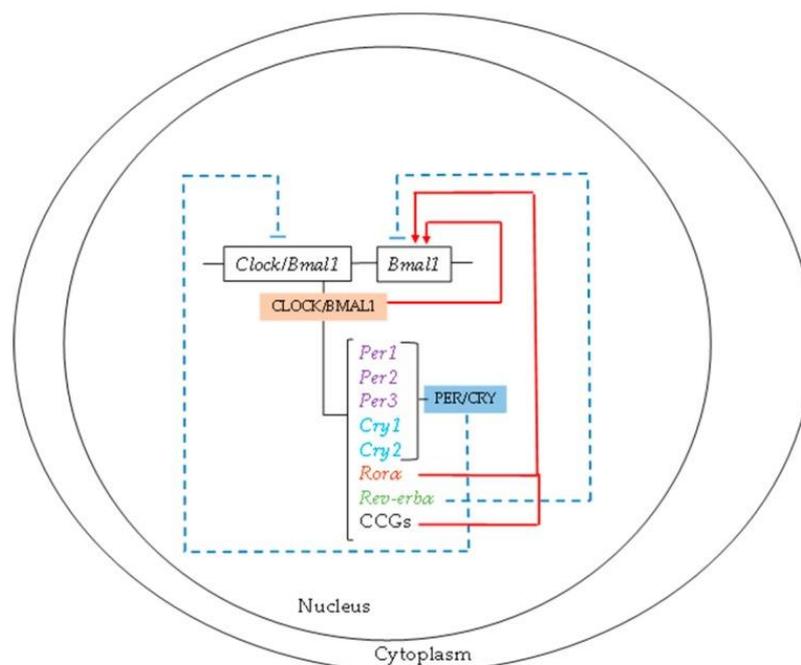


Figura 5. Mecanismos moleculares de los ritmos biológicos [24].

Sin embargo, cabe destacar que alteraciones en CLOCK y BMAL1 producen perfiles metabólicos anormales en el MetS y la obesidad, caracterizados por una secreción anormal de ácidos grasos poliinsaturados en los adipocitos. Además, CLOCK controla el coactivador transcripcional *eyes absent 3* (EYA3), producto genético que es importante en la regulación de las respuestas de los fotoperiodos. Por ejemplo, en estaciones de días largos, EYA3 tiene su máximo en presencia de luz mientras que en estaciones de días cortos aumenta en condiciones de oscuridad [24].

Asimismo, el consumo estacional de alimentos ricos en polifenoles puede modular la regulación del metabolismo y la fisiología según el momento de consumición del alimento. Es por ello, que aunque no hay mucha información al respecto, los ritmos tanto circadianos como circanuales modulan los efectos de compuestos bioactivos como polifenoles (Figura 6) [24][28].

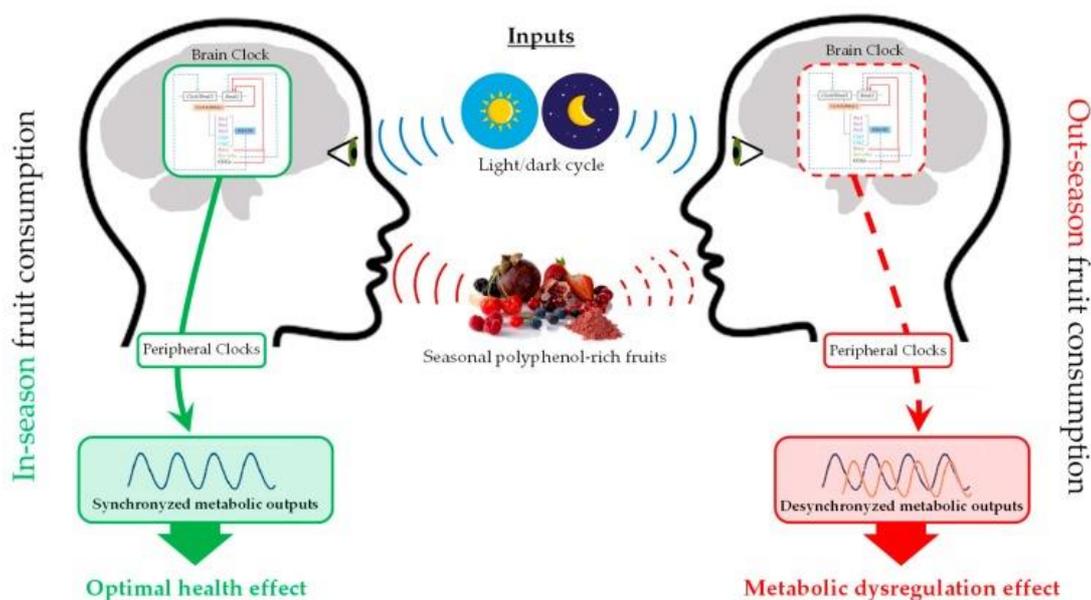


Figura 6. Relación entre la variación estacional de la composición de polifenoles vegetales, regulación genética de los ritmos biológicos y los efectos estacionales sobre la salud [24].

1.3.2 RITMOS ESTACIONALES EN EL TEJIDO ADIPOSO

Entre las respuestas a la adaptación estacional, el fotoperiodo tiene una significativa influencia en el tejido adiposo, ya que por ejemplo se observan cambios en la adiposidad según la duración del fotoperiodo [29]. Estos cambios alteran la actividad hormonal y la masa corporal. Además, se ha demostrado que la expresión génica del reloj biológico se encuentra en coordinación con el TAB durante el día y que los niveles de expresión varían dependiendo del fotoperiodo. Cabe destacar que las dietas ricas en grasas y dependiendo de la hora de ingesta de alimentos aumentan el riesgo a padecer obesidad y otras enfermedades metabólicas como CVD, alterando los relojes moleculares [25][30].

Por otra parte, estas variaciones en los ritmos estacionales influyen en la funcionalidad del tejido adiposo, ya que la cantidad de grasa corporal puede variar según las estaciones del año. Por ejemplo, en estaciones frías como invierno se aumentan los depósitos de grasa corporal [28][31]. Asimismo, otro ejemplo es la activación de la melatonina en las neuronas eferentes del sistema nervioso simpático central que produce lipólisis en el TAB en animales obesos durante fotoperiodos de larga duración [29].

Tanto en humanos como en roedores la expresión génica en el tejido adiposo se encuentra alterada en situaciones de obesidad. Es más, se detectó que la expresión de genes del reloj biológico se encontraba alterada, modificando la funcionalidad del TAB en ratones genéticamente obesos, produciendo secreciones anormales de leptina y adiponectina. Además, alteraciones en la expresión génica de *Bmal1* implican variaciones en la diferenciación del tejido adiposo y la lipogénesis [28][31].

En este contexto, los polifenoles son capaces de modular estos relojes en ratas obesas, por lo que son una posible estrategia para revertir o paliar estas enfermedades. Por ejemplo, un estudio que se hizo en concreto en el grupo de Nutrigenómica determinó que el consumo de alimentos, en este caso la cereza producía alteraciones en el metabolismo y fisiología del tejido adiposo según el fotoperiodo en el que se consumía. Es por ello, que aun es necesario más investigación en este campo científico, ya que la estacionalidad y los distintos alimentos podrían ser estrategias efectivas para prevenir y paliar enfermedades como la obesidad [25].

1.4 POLIFENOLES

Los polifenoles o compuestos fenólicos son metabolitos secundarios vegetales presentes en una amplia variedad de alimentos vegetales como bayas, cacao, granadas, nueces, destacando las uvas, ya que presentan uno de los contenidos más elevados de polifenoles, por lo que tienen un gran interés en ciertas investigaciones además de sus diversas aplicaciones industriales [24][32][33].

Los polifenoles se clasifican según diversos criterios, refiriéndose a su estructura química, se caracterizan por tener como mínimo anillo aromático que presenta uno o varios grupos hidroxilo (-OH). Estructuralmente, representan un grupo bien diferenciado. Las principales clases de polifenoles son los flavonoides, estilbenos, lignanos, ácidos fenólicos y cumarinas, siendo los flavonoides los compuestos fenólicos más abundantes en plantas. Entre los principales tipos de

flavonoides destacan las antocianidinas, flavanoles, flavonas y isoflavonas, entre otros. Los flavanoles son los únicos que no aparecen en forma glicosilada en los alimentos y se encuentran en forma monomérica como (+)-catequina y (-)-epicatequina, hasta estructuras más complejas destacando los taninos condensados, denominados proantocianidinas (PACs) [24][34].

En los últimos años, compuestos fenólicos como epigallocatequina, resveratol y PACs entre otros, son de gran interés por sus efectos para la salud contra CVD, cánceres, MetS y enfermedades asociadas a la obesidad como T2DM. Esto es debido a la amplia variedad de actividades biológicas que presentan como antioxidante, antidiabética, antiinflamatoria y antihipertensiva entre otras actividades [33][35].

Respecto a la biodisponibilidad de los polifenoles, aunque no son esenciales para el ser humano su ingesta diaria podría llegar a ser entre 100 a 150 mg. Muchos de los polifenoles más abundantes no tienen porque ser los más activos en el organismo, ya que depende de la actividad, absorción, metabolización y excreción de cada uno de ellos. Además de factores ambientales, genéticos incluso culinarios [34]. Durante la digestión, los polifenoles se encuentran sometidos a modificaciones metabólicas y químicas. Sin embargo, aquellos compuestos fenólicos que no han sido absorbidos en el tracto gastrointestinal al llegar al intestino grueso pueden ser absorbidos a través de su degradación por acción de la microbiota del colón. Es por ello que la microbiota puede modular la eficiencia de los polifenoles [24][34].

1.4.1 EXTRACTO DE PROANTOCIANIDINAS DE SEMILLAS DE UVA (GSPE)

Las PACs son flavanoles que definen el carácter astringente de las frutas como las uvas y bebidas como sidras y vinos (Figura 7). Se encuentran en alimentos vegetales como uvas, cacao, manzanas, peras y bebidas como té verde y vinos. Estos compuestos bioactivos son eficaces debido a sus procesos celulares y fisiológicos. Entre sus efectos beneficiosos para la salud se destaca su papel contra el estrés oxidativo, la obesidad, la inflamación, la resistencia a la insulina, las CVD y las alteraciones lipídicas [36][37].

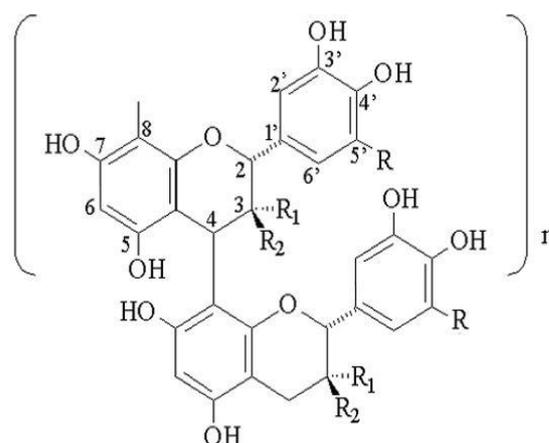


Figura 7. Estructura química de las proantocianidinas (PACs) [38].

A nivel industrial, tanto en las industrias del zumo de uva como las vinícolas, se producen elevadas cantidades de subproductos orgánicos como el orujo de uva, partes sólidas de las uvas que no son utilizados en la elaboración del vino y el zumo, donde las semillas de uva pueden alcanzar el 52 % (p/p) del orujo de uva, siendo una importante fuente de compuestos fenólicos como las PACs [37]. En concreto el GSPE, uno de los subproductos de estas industrias, ha mostrado ser beneficioso contra estas enfermedades anteriormente comentadas, ya que son ricos en PACs de bajo peso molecular. Además, varios estudios han asociado los efectos beneficiosos de las PACs a limitar la adipogénesis, reducir la inflamación y mejorar el metabolismo lipídico en un modelo experimental de ratas obesas alimentadas con dieta de cafetería (CAF). Además, extractos de PACs reducen los depósitos de grasa y el peso corporal, modulando el tejido adiposo [35][37].

El consumo de GSPE produce una reducción significativa del TAB en ratas obesas con dieta una CAF. Además, estudios del grupo de Nutrigenómica han demostrado que el GSPE disminuye la lipogénesis, reprimiendo el miR-122. También, el GSPE modula la expresión de genes del tejido adiposo como el gen *glucose transporter member 4 (Glut4)*. No obstante, hay cierta controversia respecto a la cantidad efectiva de GSPE, por lo que se deben de normalizar las dosis, ya que cantidades superiores de GSPE a 1 g/kg de peso corporal produce efectos indeseables para el organismo [2][37][39].

Por otra parte, el GSPE en dietas ricas en grasa, produce un aumento de la adiponectina modulando el desequilibrio energético asociado a la obesidad. Mediante este aumento de adiponectina en los adipocitos blancos también se reduce la hiperinsulinemia [36]. Además, se ha demostrado que la suplementación de GSPE en animales con dieta CAF redujo la adiposidad y los niveles de ácidos grasos libres significativamente [40]. Sin embargo, hay controversia con la reducción de peso corporal debido a los efectos producidos por el GSPE, ya que en algunos experimentos si que disminuye el peso corporal pero en otros no [36]. No obstante, dietas que presenten concentraciones ricas en GSPE pueden ser un tratamiento nutricional beneficioso para los pacientes con obesidad.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

Los ritmos circanales, y más específicamente, los diferentes fotoperiodos en el que los mamíferos están sometidos a lo largo de un año, podrían modular el efecto beneficioso del consumo de GSPE sobre la expansión y funcionalidad del TAB en un contexto metabólico de obesidad.

2.2 OBJETIVO PRINCIPAL

El objetivo general de este trabajo es evaluar si los efectos beneficioso del GSPE sobre la fisiología y el metabolismo lipídico del TABi dependen del fotoperiodo en el que el extracto polifenólico es administrado (fotoperiodo largo, 18 h de luz y 6 h de oscuridad; estándar, 12 h de luz y 12 h de oscuridad; y corto, 6 h de luz y 18 h de oscuridad).

2.3 OBJETIVOS SECUNDARIOS

En este estudio, los objetivos específicos son los siguientes:

- Determinar si el efecto del consumo de GSPE sobre el proceso de expansión del TABi (hiperplasia/hipertrofia) depende de los distintos fotoperiodos (L6, L12 y L18) en los que los animales se encuentran sometidos.
- Evaluar si el efecto del consumo de GSPE sobre la expresión de los genes más importantes implicados en el metabolismo lipídico del TABi depende de los distintos fotoperiodos (L6, L12 y L18) en los que los animales se encuentran sometidos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

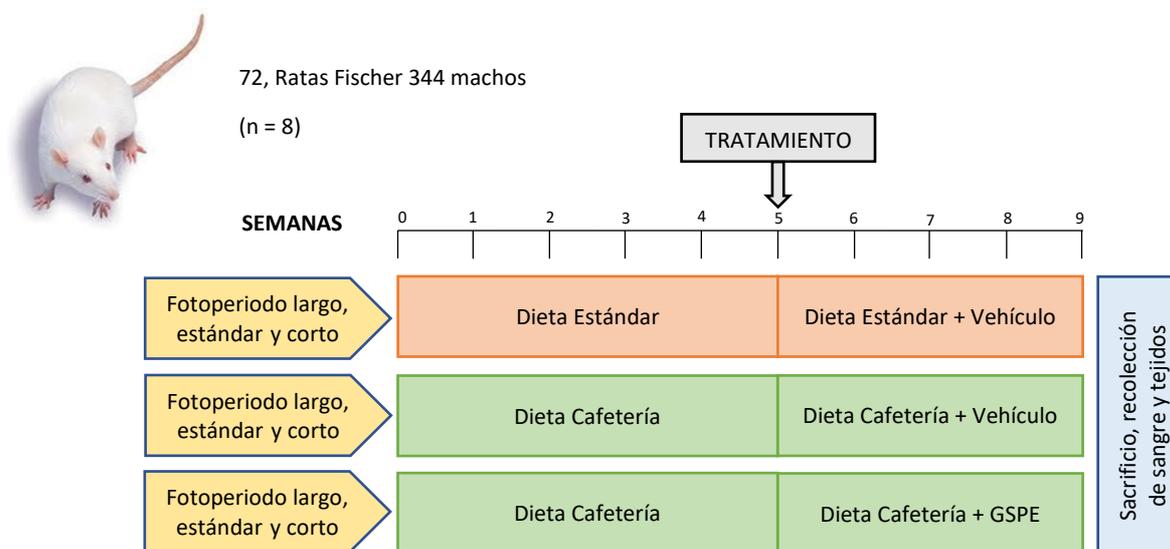


Figura 8. Diseño experimental con el modelo animal de ratas Fischer 344 machos para el estudio de la obesidad. Para el experimento un total de 72 ratas fueron distribuidas al azar en 9 grupos (n = 8) y se aclimataron a un fotoperiodo largo, estándar o corto (18 h de luz y 6 h de oscuridad; 12 h de luz y 12 h de oscuridad; 6 h de luz y 18 h de oscuridad, respectivamente). Durante las primeras cinco semanas del ensayo, un total de tres grupos, uno de los fotoperiodo (largo, estándar y corto) fueron alimentados con dieta estándar (STD) (color naranja), mientras que los seis grupos restantes fueron alimentados con dieta cafetería (CAF) (color verde). A partir de la semana 5, las ratas fueron alimentadas con sus respectivas dietas todos los días con el tratamiento correspondiente (vehículo (VH) o extracto de proantocianidinas de uva (GSPE)) hasta fueron sacrificados en la semana 9 y se recolectó la sangre y los tejidos.

Tal y como se muestra en la Figura 8, para este experimento se utilizaron un total de 72 ratas Fischer 344 macho de 12 semanas de edad (Charles River, Barcelona, España), alimentadas *ad libitum* con una dieta STD (2,90 kcal/g) y agua. Los animales fueron distribuidos por parejas en las jaulas a 22 °C, 55 % de humedad y con acceso libre de agua y comida.

Una vez concluida la semana de aclimatación, las ratas se dividieron al azar en tres fotoperiodos distintos (n = 24, cada uno), L18, L12 y L6, simulando las estaciones de verano, primavera y otoño, e invierno respectivamente durante 9 semanas. A su vez, estos 3 grupos se dividieron en tres grupos diferentes (n = 8, cada uno), con un total de 9 grupos en el experimento, de los cuales 3 grupos uno de cada fotoperiodo (L18, L12 y L6, uno de cada) fueron alimentados con dieta STD mientras que los 6 grupos restantes fueron alimentados con dieta CAF hasta la quinta semana. La dieta STD estaba compuesta por agua y pienso y la dieta CAF estaba formada por la dieta STD más beicon, galletas con queso y paté, zanahorias, ensaimada y leche (22 % sacarosa). Además, en ambas dietas las ratas tenían acceso libre de agua y comida.

Una vez finalizadas las cinco semanas, los tres grupos que habían sido alimentados con la dieta STD se les adicionó a la dieta leche condensada con agua como vehículo (VH). Por otro lado, los 6 grupos de animales que habían sido alimentados con dieta CAF, tres de ellos (L18, L12 y L6, uno de cada) se les complementó la dieta CAF con leche condensada (VH) mientras que a los tres grupos restantes (L18, L12 y L6, uno de cada) se les adicionó a la dieta CAF una dosis de GSPE (25 mg/Kg). Tanto el tratamiento de VH como de GSPE fueron administrados a diario mediante vía oral con ayuda de una jeringa. Durante las 9 semanas del experimento se anotaron los valores correspondientes a la ingesta de alimentos y peso corporal de cada animal semanalmente.

Al finalizar las 9 semanas, se llevó a cabo el sacrificio de todos los animales por decapitación. Se realizó la recolección de la sangre y los tejidos, en este caso de TABi, se pesaron y congelaron (-80 °C) para análisis posteriores. Además, destacar que el procedimiento experimental con animales de este estudio fue aprobado por el Comité de Ética Animal de la Universidad Rovira i Virgili (Tarragona, España).

3.2 GSPE

El GSPE fue proporcionado por Les Dérivés Résiniques et Terpéniques (Dax, Francia). La composición fenólica del GSPE utilizada en este estudio fue caracterizada previamente por *Margalef et al.* [41] se detalla en el Anexo 2.

3.3 ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Para los análisis histológicos, pequeños trozos de TABi congelados (-80 °C) fueron enviados a ELDINE Patología (Tarragona, España). Las muestras fueron descongeladas y fijadas en formaldehído diluido al 4 %. Tras 24 h de fijación, se realizaron deshidrataciones sucesivas (Alcohol/Etanol 70 %, 96 % y 100 % más xilol/dimetil benceno) de las muestras de TABi y fueron infiltradas en parafina (Citadel 2000, HistoStar, Thermo Scientific, Madrid, España). Posteriormente, se obtuvieron secciones de 2 µm de espesor con un micrótopo (Microm HM 355S, Thermo Scientific) a partir de los bloques de parafina. Seguidamente, se empleó la tinción de hematoxilina-eosina (Varistain Gemini, Shandom, Thermo) en las secciones de TABi.

Una vez obtenidas las secciones de TABi, mediante microscopía óptica (x10) y el software *AxioVision Zeiss Imaging* (Carl Zeiss Iberia, S.L., Madrid, España) se obtuvieron las imágenes de las distintas muestras de TABi. A continuación, se usó el software *Adiposoft* (CIMA, Universidad

de Navarra, España) con la finalidad de determinar el área y el tamaño de los adipocitos. Se midieron cuatro campos por muestra. El número total de los adipocitos de TABi se determinó a partir del volumen de los adipocitos y el área total se obtuvo a partir del valor medio del área de tejido adiposo de los campos estudiados. Para obtener el volumen de los adipocitos de cada campo medido, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{\pi}{6} \times [3\sigma^2 \times d + d^3]$$

Donde:

d = diámetro del adipocito (μm)

σ = desviación estándar del diámetro

A continuación, se utilizó la densidad de adipocitos (0,92 g/mL) para obtener el peso de los adipocitos y se dividió el peso total del depósito de TABi por la media de peso de los adipocitos para determinar el número total de adipocitos de TABi. Por último, para calcular las frecuencias de los adipocitos se agruparon las células grasas en dos grupos dependiendo de sus áreas (<3000 μm^2 o >3000 μm^2) y se calculó como porcentaje total de adipocitos en ambos grupos.

3.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

3.4.1 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL

Para la extracción del ARN total de los tejidos de TABi, se pesaron 150 mg de TABi en la balanza analítica, las muestras se mantuvieron en hielo para evitar la degradación del ARN y se añadió una bola metálica en cada una de las muestras. Seguidamente, se añadió 1 mL de TRIzol™ (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, España) a cada muestra siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez refrigerada la pieza del *Tissue lyser* (Qiagen, España) se realizó la homogeneización de las muestras durante 50 segundos aproximadamente a potencia 50 V (máxima) hasta una homogeneización completa.

A continuación, se mantuvieron las muestras durante 5 min en hielo y se centrifugaron a 12,000 g durante 5 min a 4 °C. Una vez concluida la centrifugación, se observaron dos fases diferenciadas y se recuperó la fase inferior (color rosa), evitando coger la fase superior (grasa) y se repitió de nuevo la misma centrifugación, sin coger nada de grasa, únicamente la fase inferior. Posteriormente, se adicionaron 250 μL de cloroformo (Prolabo®, VWR, España) y se agitaron con el vórtex al máximo durante 15 segundos, se incubaron las muestras en hielo durante 10 min hasta observarse dos fases claramente diferenciadas. Seguidamente, se centrifugaron las muestras a 12,000 g durante 15 min a 4 °C, observándose 3 fases diferenciadas, se recuperó la

fase acuosa superior y se añadieron 500 μL de isopropanol (Prolabo[®], VWR, España). Después, se agitaron las muestras manualmente durante 15 segundos y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min.

Una vez concluida la incubación, se centrifugaron las muestras durante 10 min a 12,000 g a 4 °C, precipitando así el RNA total. Seguidamente, se procedió a la retirada del sobrenadante y se añadieron 500 μL de etanol 80 %, desenganchándose el pellet con ayuda del vórtex a potencia media y se centrifugaron las muestras a 8,000 g durante 5 min a 4 °C. A continuación, se volvieron a repetir los últimos tres pasos con el fin de eliminar el sobrenadante y obtener el pellet purificado. Una vez descartado el sobrenadante de la última centrifugación, se secó el pellet durante 10 min (sin secarse completamente) y se disolvió el pellet con 20 μL de agua *ARNasa free* (Thermo Fisher Scientific). Finalmente, la cantidad y la pureza del RNA de TABi fue medida con el *NanoDrop*[®] IND-1000 (Thermo Fisher Scientific, España) a 260 nm. Además, la integridad del ARN fue medida en las instalaciones del Centre for Omic Sciences (COS) mediante electroforesis con el *Agilent Bioanalyzer*, dando por válido un *RNA integrity number* (RIN) mayor de 6.

3.4.2 RETROTRANSCRIPCIÓN

Una vez obtenido el ARN total de TABi, se llevó a cabo la retrotranscripción a ADN complementario (cADN) para poder realizar posteriormente la PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).

En primer lugar, se realizaron las diluciones pertinentes de cada una de las muestras de RNA con agua *ARNasa free* para obtener una concentración de RNA de 100 ng/ μL . Después, se utilizó el kit *Taqman* de transcripción inversa de cADN (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, España) y se cogieron 10 μL del RNA diluido y se añadieron 10 μL del *MasterMix* de retrotranscripción (Anexo 3). A continuación, se incubaron las muestras a 25 °C durante 10 min, después a 37 °C durante 120 min y por último a 4 °C durante 24 h en el *Multigene Thermal Cycler* (Labnet, España). Finalmente, se añadieron 80 μL de agua *ARNasa free*, obteniendo una concentración final de cADN de 10 ng/ μL en cada una de las muestras para la realización de la RT-qPCR.

3.4.3 PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (RT-qPCR)

Para amplificar y detectar el ADN de interés se utilizó la RT-qPCR, con *primers* específicos y un reportero fluorescente, en este estudio se empleó la sonda SYBR[®] Green. Los genes estudiados fueron: *Ppar γ* , *CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/ebp α)*, *Acetyl-CoA carboxylase alpha (Acac α)*, *Fatty acid synthase (Fasn)*, *Glycerol-3-phosphate acyltransferase (Gpat)*, *Adipose triglyceride lipase (Atgl)*, *Hormone-sensitive lipase (Hsl)*, *Carnitine palmitoyltransferase 1B (Cpt1b)*, *Leptin (Lep)* y *Adiponectin, C1Q And Collagen Domain Containing (Adipoq)* con el fin de estudiar la expresión de estos genes en TABi en condiciones de obesidad utilizando *cyclophilin (Ppia)* como control endógeno (Tabla 1).

Una vez obtenidas las muestras de cADN, se añadieron 1 μ L de cADN de cada muestra y 4 μ L de *MasterMix* para RT-qPCR (previamente preparada) (Anexo 4) en cada pocillo de la placa de PCR (Applied biosystems[®], ThermoFisher Scientific, EEUU) siguiendo el diseño previo de distribución de las muestras. A continuación, se llevó a cabo la amplificación cuantitativa de la PCR durante 2 h en el *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Applied biosystems[®], ThermoFisher Scientific, EEUU). Finalmente, una vez acabada la amplificación, se analizaron los valores de C_T y las curvas de *melting* de cada gen de interés.

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (S.E.M). Los *outliers* del análisis de expresión génica fueron detectados mediante *QuickCalcs* de GraphPad. Las diferencias significativas fueron analizadas usando la prueba T de Student. Los P-valores que fueron estadísticamente significativos se expresaron como: *P < 0,001; *P < 0,05.

Tabla 1. Funciones de los genes estudiados, secuencias de los primers usados para el análisis de la PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) y el proveedor.

| Gen | Función | | Secuencia primer (5'... 3') | Proveedor |
|---------------------------------|--------------------------|----------------|------------------------------|-------------------|
| Ppia | <i>Housekeeping gene</i> | <i>Reverse</i> | AAGTCACCACCCTGGCACATG | Biomers, Alemania |
| | | <i>Forward</i> | CTTCGAGCTGTTTGCAGACAA | |
| Pparγ | Adipogénesis | <i>Reverse</i> | TCTGTTTAGCGTGGGGATGT | Biomers, Alemania |
| | | <i>Forward</i> | GCGGCTCTGGAGGTATATGT | |
| C/ebpα | Adipogénesis | <i>Reverse</i> | TGGTTTAGCATAGACGCGCA | Biomers, Alemania |
| | | <i>Forward</i> | TGTACTGTATGTCGCCAGCC | |
| Acaca | Lipogénesis | <i>Reverse</i> | TCTGTTTAGCGTGGGGATGT | Biomers, Alemania |
| | | <i>Forward</i> | GCGGCTCTGGAGGTATATGT | |
| Fasn | Lipogénesis | <i>Reverse</i> | CACCAGTGTGTTGTTCCCTCGG | Biomers, Alemania |
| | | <i>Forward</i> | TAAGCGGTCTGGAAAGCTGA | |
| Gpat | Lipogénesis | <i>Reverse</i> | GAGGCGTGCATGAATAGCAA | Biomers, Alemania |
| | | <i>Forward</i> | GAATACAGCCTTGGCCGATG | |
| Atgl | Lipólisis | <i>Reverse</i> | CACATAGCGCACCCCTTGAA | Biomers, Alemania |
| | | <i>Forward</i> | GAAGACCCTGCCTGCTGATT | |
| Hsl | Lipólisis | <i>Reverse</i> | GCTTGGGGTCAGAGGTTAGT | Biomers, Alemania |
| | | <i>Forward</i> | AGTTCCTCTTTACGGGTGG | |
| Cpt1b | Lipólisis | <i>Reverse</i> | CCTTGAAGAAGCGACCTTTG | Biomers, Alemania |
| | | <i>Forward</i> | GCAAACCTGGACCGAGAAGAG | |
| Lep | Leptina | <i>Reverse</i> | CCCGGAATGAAGTCCAAA | Biomers, Alemania |
| | | <i>Forward</i> | ATTCACACACGCAGTCGGTAT | |
| Adipoq | Adiponectina | <i>Reverse</i> | CGTCTCCCTTCTCTCCCTTC | Biomers, Alemania |
| | | <i>Forward</i> | GTTCCAGGACTCAGGATGCT | |

Abreviaciones: Ppia: peptidylpropyl isomerase A (Cyclophilin A); Ppar γ : peroxisome proliferator-activated receptor gamma; C/ebp α : CCAAT/enhancer binding protein alpha; Acaca: Acetyl-CoA carboxylase alpha; Fasn: Fatty acid synthase; Gpat: Glycerol-3-phosphate acyltransferase; Atgl: Adipose triglyceride lipase; Hsl: Hormone-sensitive lipase; Cpt1b: Carnitine palmitoyltransferase 1B; Lep: Leptin; Adipoq: Adiponectin, C1Q And Collagen Domain Containing.

4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISIS HISTOLÓGICO

En el estudio histológico realizado, se observó un aumento significativo del área de los adipocitos del grupo CAF-VH en comparación con el del grupo STD-VH en las ratas expuestas al L6. No obstante, no hubo diferencias significativas del área de los adipocitos del grupo CAF-GSPE comparados con el del grupo CAF-VH. Asimismo, a pesar de haber un aumento del número de adipocitos del grupo CAF-VH respecto al grupo STD-VH, no se mostraron diferencias significativas en el volumen de adipocitos ni en el número de adipocitos ni en los depósitos de TABi en ninguna de los grupos estudiados. Por el contrario, se observó un aumento significativo de la frecuencia de adipocitos con superficies superiores a $3000 \mu\text{m}^2$ del grupo CAF-VH en comparación con el del grupo STD-VH. Sin embargo, no se vieron diferencias significativas en las ratas con dieta CAF-GSPE respecto a las CAF-VH. Por tanto, hubo un efecto significativo de la dieta en el área y frecuencia de área de los adipocitos de TABi en el L6, pero no se observó ningún efecto significativo del GSPE (Figura 9A).

En referencia a las ratas expuestas al L12, los animales alimentados con una dieta CAF-VH mostraron un aumento significativo del área y volumen de los adipocitos en comparación a los animales con una dieta STD-VH. No obstante, aunque hubo una disminución del área y volumen del grupo CAF-GSPE respecto el grupo CAF-VH, no fueron diferencias significativas entre estos dos grupos. Además, no se obtuvieron diferencias significativas en el número de adipocitos en los depósitos de TABi en ninguno de los grupos estudiados.

Por el contrario, se observó un aumento significativo de la frecuencia de adipocitos con superficies superiores a $3000 \mu\text{m}^2$ del grupo CAF-VH en comparación con la del grupo STD-VH al igual que pasaba en estos grupos en el L6. No obstante, no hubieron diferencias significativas en la frecuencia de área del grupo CAF-GSPE respecto a la del grupo CAF-VH. De este modo, hubo efecto de la dieta en el área, volumen y frecuencia de área de los adipocitos de TABi, pero ningún efecto significativo del GSPE en el L12 (Figura 9B).

En cuanto a las ratas expuestas al L18, a diferencia de los fotoperiodos anteriores no se observaron diferencias significativas del área, volumen, número y frecuencia de área de los adipocitos de TABi entre las ratas alimentadas con dieta CAF-VH respecto a las alimentadas con dieta STD-VH ni tampoco entre las ratas alimentadas con dieta CAF-GSPE y las ratas alimentadas con CAF-VH (Figura 9C). En el Anexo 5 se encuentran las imágenes representativas de cada uno de los grupos de estudio.

Histología TABi

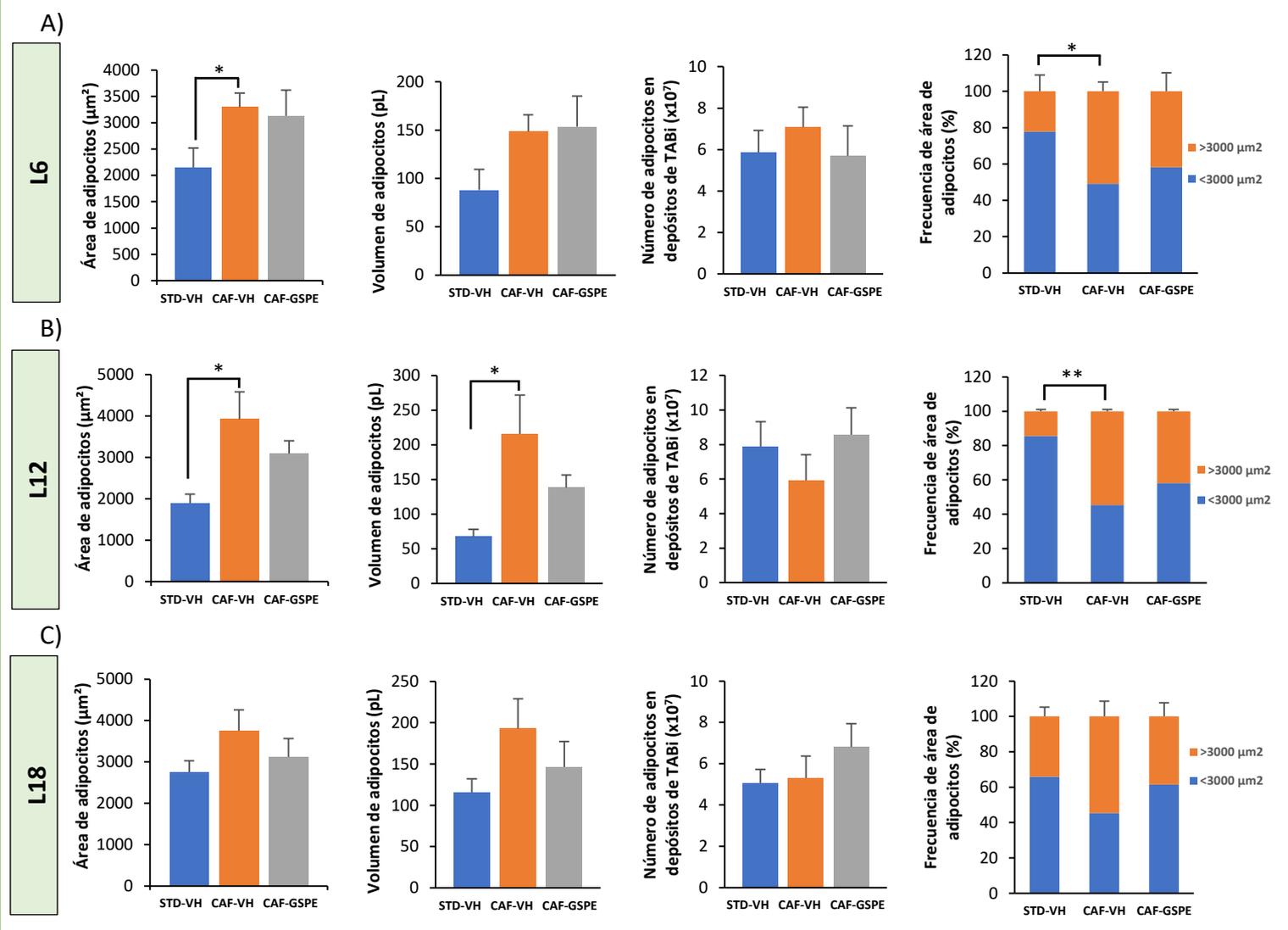


Figura 9. Efecto de la administración del extracto de proantocianidinas de uva (GSPE) con una dieta obesogénica sobre el número y tamaño de los adipocitos de tejido adiposo blanco inguinal (TABi). Área de adipocitos, volumen de adipocitos, número de adipocitos y frecuencias del área de adipocitos TABi de ratas Fisher 344 tratadas con GSPE en tres fotoperiodos distintos: L18 (18 h de luz y 6 h de oscuridad), L12 (12 h de luz y 12 h de oscuridad) y L6 (6 h de luz y 18 h de oscuridad). Estudio histológico de la morfología del TABi, las ratas Fisher 344 fueron alimentadas con una dieta estándar (STD) o de cafetería (CAF) durante 9 semanas y tratadas durante las últimas 4 semanas con vehículo (VH) o GSPE (25 mg/kg de peso corporal) en L6 (A), L12 (B) y L18 (C). Para la frecuencia del área de los adipocitos, los adipocitos se distribuyeron en dos grupos dependiendo sus áreas (<3000 >3000 µm²). Los resultados se presentan como la media ± S.E.M. Para el análisis de las diferencias significativas se utilizó el test T de Student (**P<0,001; *P<0,05).

4.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Se llevó a cabo un análisis de la expresión génica en el TABi con la finalidad de evaluar cómo el GSPE regulaba los genes más importantes implicados en el metabolismo lipídico del TABi dependiendo de la dieta administrada y del fotoperiodo al que se encontraban expuestos bajo condiciones de obesidad. Además, destacar que se utilizaron los resultados del grupo STD-VH como grupo de referencia (control) y fue con el que se hizo la normalización con los grupos CAF-VH y CAF-GSPE. Asimismo, se analizó la eficiencia de los *primers* empleados para este estudio (Anexo 6).

En cuanto a los genes implicados en la adipogénesis, se estudiaron *Ppar γ* y *C/ebp α* . Por un lado, el gen *Ppar γ* del grupo CAF-VH mostró un aumento significativo en su expresión génica comparada con la del grupo STD-VH. En cambio, *Ppar γ* estaba reprimido significativamente en el grupo CAF-GSPE en comparación con el grupo CAF-VH en el L6. Es decir, hubo efecto de la dieta y del GSPE en la expresión del gen *Ppar γ* en el L6. En referencia a las ratas expuestas al L12, el gen *Ppar γ* no presentó una expresión génica significativa entre el grupo CAF-VH con el grupo STD-VH ni tampoco entre el grupo CAF-GSPE con el grupo CAF-VH. Por tanto, en el L12 no hubo ni efecto de la dieta ni del GSPE en la expresión de *Ppar γ* . Mientras que en el L18, los niveles de ARN de *Ppar γ* del grupo CAF-VH no estuvieron alterados significativamente respecto a los del grupo STD-VH. Sin embargo, el gen *Ppar γ* del grupo CAF-GSPE estuvo sobreexpresado significativamente en comparación con el del grupo CAF-VH. Es decir, no hubo efecto de la dieta pero si efecto del GSPE en la expresión de ARN de *Ppar γ* (Figura 10.A1).

Por otro lado, bajo el L6, el gen *C/ebp α* del grupo CAF-VH no mostró diferencias significativas en la expresión génica comparada con la del grupo STD-VH. En cambio, *C/ebp α* disminuyó significativamente su expresión del grupo CAF-GSPE en comparación con la del grupo CAF-VH en el L6. En cuanto a los animales expuestos al L12, los niveles de ARN del gen *C/ebp α* no estuvieron alterados significativamente entre el grupo CAF-VH con los del grupo STD-VH ni tampoco entre el grupo CAF-GSPE con el grupo CAF-VH. Asimismo, durante la exposición al L18, el gen *C/ebp α* del grupo CAF-VH no tuvo una expresión significativa respecto al grupo STD-VH. No obstante, la expresión del gen *C/ebp α* del grupo CAF-GSPE estuvo elevada significativamente en comparación con la del grupo CAF-VH. Finalmente, destacar que no hubo efecto de la dieta en la expresión del *C/ebp α* en ninguno de los fotoperiodos estudiados, pero si hubo efecto del GSPE en el L6 y el L18 (Figura 10.A2).

En referencia a los genes implicados en la lipogénesis, se evaluaron los genes *Acaca*, *Fasn* y *Gpat*. Los niveles de expresión de ARN del gen *Acaca* en el L6 no estuvieron alterados significativamente entre el grupo CAF-VH con el grupo STD-VH ni tampoco entre el grupo CAF-GSPE con el grupo CAF-VH. Durante el L12, *Acaca* del grupo CAF-VH estaba reprimido significativamente en comparación con el del grupo STD-VH, mientras que *Acaca* del grupo CAF-GSPE tuvo una disminución de su expresión génica comparada con la del grupo CAF-VH, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. En cuanto al L18, hubo una represión significativa del gen *Acaca* del grupo CAF-VH comparada con la del grupo STD-VH. Sin embargo, no hubo alteraciones en los niveles de expresión de ARN del gen *Acaca* del grupo CAF-GSPE en comparación los niveles del grupo CAF-VH. Por tanto, destacar que hubo efecto de la dieta en la expresión del gen *Acaca* en el L12 y el L18 a diferencia del L6. Asimismo, tampoco hubo efecto del GSPE en ninguno de los fotoperiodos estudiados (Figura 10.B1).

Respecto al gen *Fasn* no se observaron diferencias significativas en la expresión del ARN entre el grupo CAF-VH y el grupo STD-VH ni tampoco entre el grupo CAF-GSPE y el grupo CAF-VH en ninguno de los fotoperiodos estudiados (L6, L12 y L18). Mientras que en el gen *Gpat* únicamente se obtuvieron diferencias significativas en los niveles de ARN de *Gpat* del grupo CAF-VH respecto a los niveles del grupo STD-VH en el L6. Por tanto, no hubo efecto de la dieta en la expresión del *Fasn* y solamente se detectó efecto de la dieta en la expresión de *Gpat* en el L6. Además, no hubo efecto significativo de la administración del GSPE ni en la expresión del *Fasn* ni en la del *Gpat* en ninguno de los fotoperiodos estudiados (Figuras 10.B2 y 10.B3).

En cuanto a los genes implicados en la lipólisis, se estudiaron los genes *Atgl*, *Hsl* y *Cpt1b1*. Respecto al gen *Atgl*, no hubo diferencias significativas en la expresión del ARN entre el grupo CAF-VH y el grupo STD-VH ni tampoco entre el grupo CAF-GSPE y el grupo CAF-VH en el L6 y el L12. En cambio, aunque en el L18 la expresión de ARN del grupo CAF-VH no se vio alterada en comparación con la del grupo STD-VH, el gen *Atgl* del grupo CAF-GSPE estuvo sobreexpresado significativamente en comparación con el del grupo CAF-VH. Por tanto, solamente se detectó efecto del GSPE en la expresión del gen *Atgl* en el L18.(Figura 10.C1).

Respecto al gen *Hsl*, bajo el L6, el gen *Hsl* del grupo CAF-VH tuvo una expresión significativa más elevada que la del grupo STD-VH. Además, el gen *Hsl* del grupo CAF-GSPE mostró una disminución significativa en su expresión en comparación con la del grupo CAF-VH. En referencia a las ratas expuestas al L12, no hubo diferencias significativas de expresión entre el grupo CAF-

VH con la del grupo STD-VH ni tampoco entre el grupo CAF-GSPE con el grupo CAF-VH. Por otro lado, en la exposición al L18, el gen *Hsl* disminuyó su expresión aunque no fue significativa. En cambio, el gen *Hsl* mostró una expresión significativamente más elevada en el grupo CAF-GSPE que en el grupo CAF-VH. Es por ello, que solo hubo efecto de la dieta en la expresión del gen *Hsl* en el L6, mientras que el efecto del GSPE se detectó en el L6 y el L18 (Figura 10.C2).

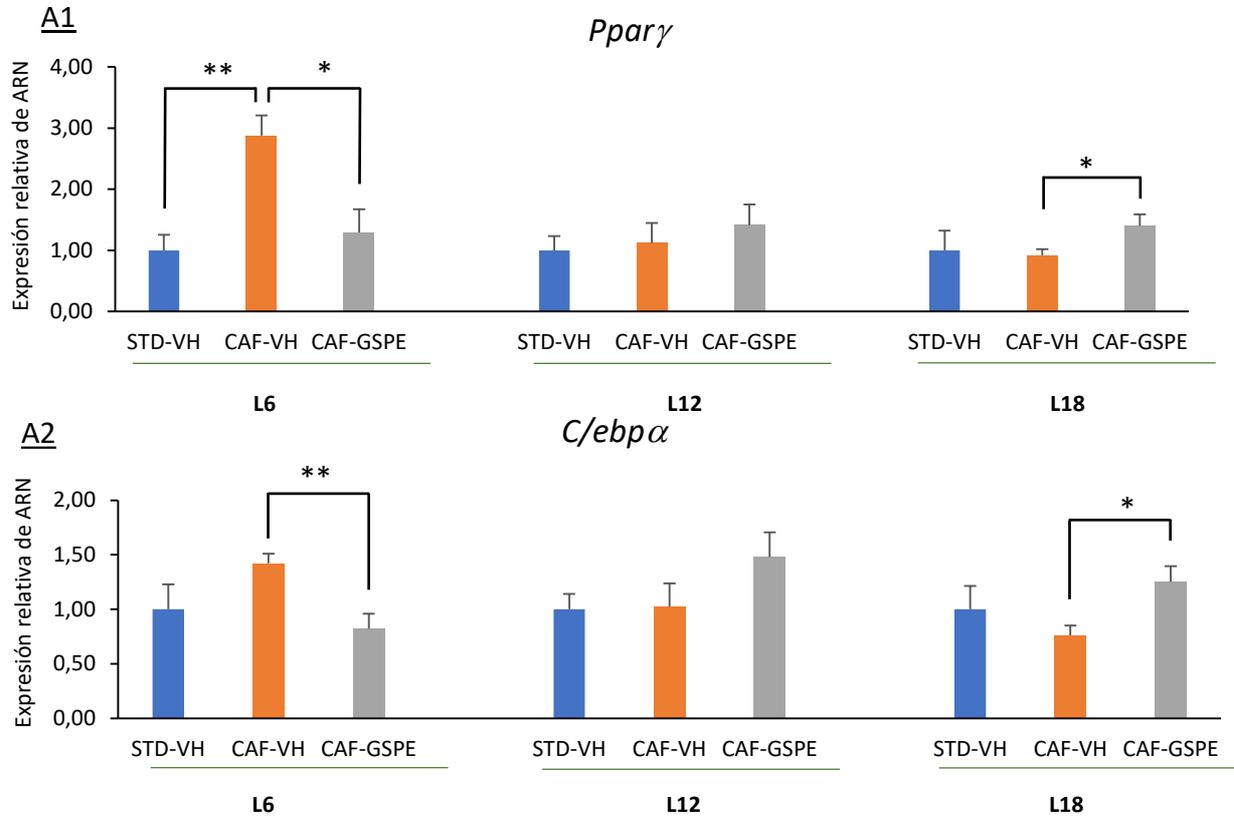
En cuanto a la expresión del gen *Cpt1b*, en el L6 y el L12 el gen *Cpt1b* tuvo una expresión de ARN similar a la del gen *Hsl* en estos dos fotoperiodos. En cambio en la exposición al L18, a diferencia del gen *Hsl*, no se observaron diferencias significativas en la expresión de ARN del gen *Cpt1b* entre la del grupo CAF-VH con la del grupo STD-VH ni tampoco entre la del grupo CAF-GSPE con la del grupo CAF-VH. Por tanto, solamente hubo efecto de la dieta y del GSPE en la expresión del *Cpt1b* en el L6 (Figura 10.C3).

En referencia a la señalización de la leptina, se estudió el gen *Lep*. Bajo el L6, la expresión de ARN del gen *Lep* aumentó significativamente en el grupo CAF-VH comparada con la del grupo STD-VH. Asimismo, el gen *Lep* tuvo una disminución significativa de su expresión en el grupo CAF-GSPE en comparación con la del grupo CAF-VH. Tanto en la exposición de las ratas al L12 como al L18, no se observaron diferencias significativas en la expresión de ARN del gen *Lep* entre el grupo CAF-VH con la del grupo STD-VH ni tampoco entre el grupo CAF-GSPE con el grupo CAF-VH. Es por ello, que únicamente se detectó efecto de la dieta y del GSPE en la expresión del *Cpt1b* en el L6 (Figura 10.D1).

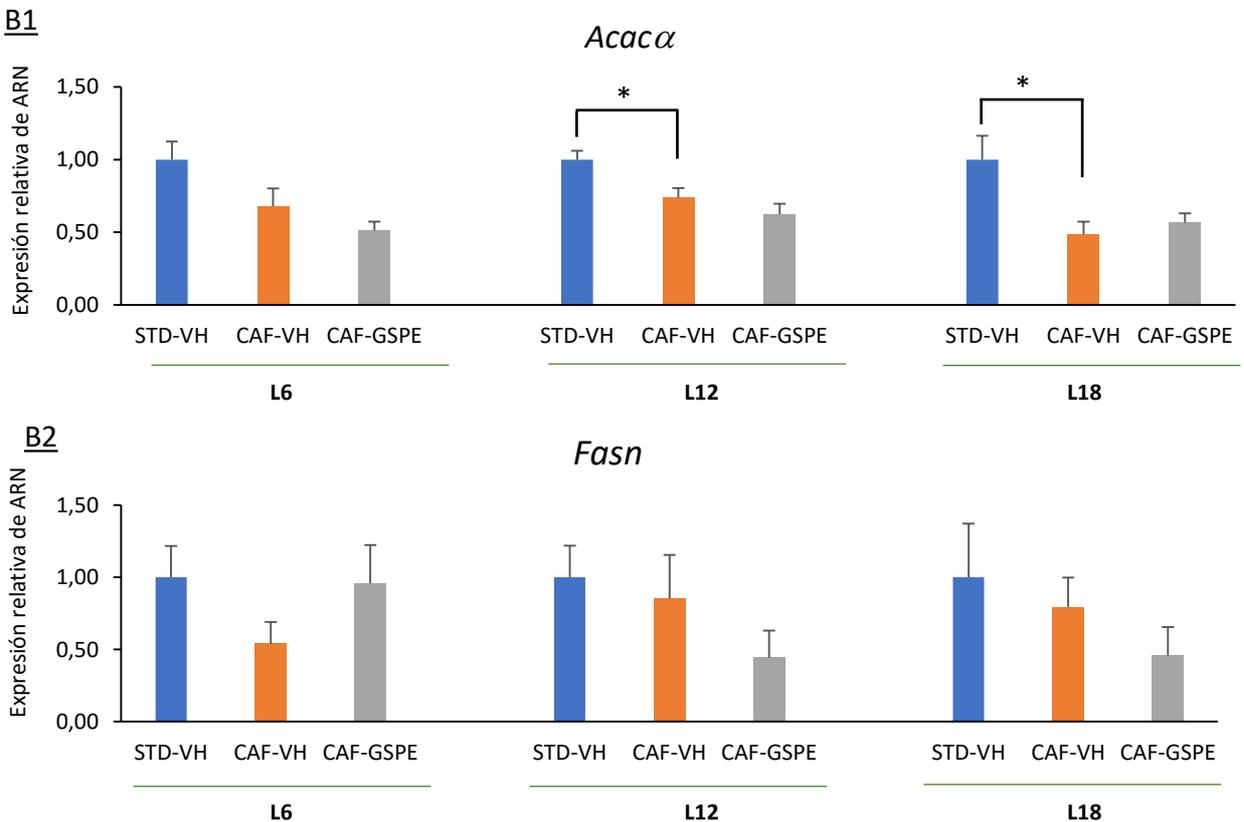
Finalmente, en cuanto a la adiponectina en TABi, se evaluó el gen *Adipoq*. Los niveles de expresión de ARN del gen *Adipoq* del grupo CAF-VH en el L6 estuvieron elevados en comparación con la del grupo STD-VH, pero no significativamente. En cambio el gen *Adipoq* del grupo CAF-GSPE estuvo reprimido significativamente comparado con el del grupo CAF-VH. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la expresión del ARN del gen *Adipoq* entre el grupo CAF-VH y el grupo STD-VH ni tampoco entre el grupo CAF-GSPE y el grupo CAF-VH en el L12 y el L18. Además, cabe destacar que sólo hubo efecto del GSPE en la expresión del gen *Adipoq* en el L6 y ningún efecto de la dieta sobre la expresión de *Adipoq* en los fotoperiodos estudiados (Figura 10.E1).

Expresión génica en TABi

A) Adipogénesis



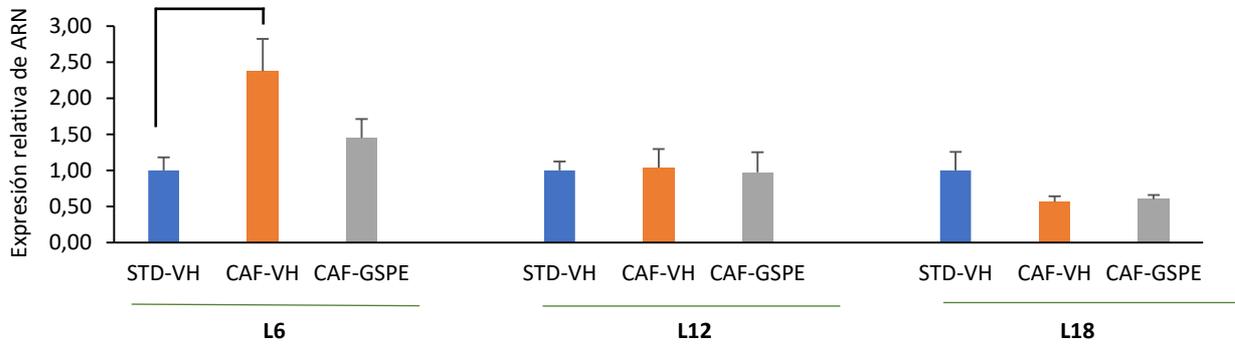
B) Lipogénesis



Expresión génica en TABi

B3

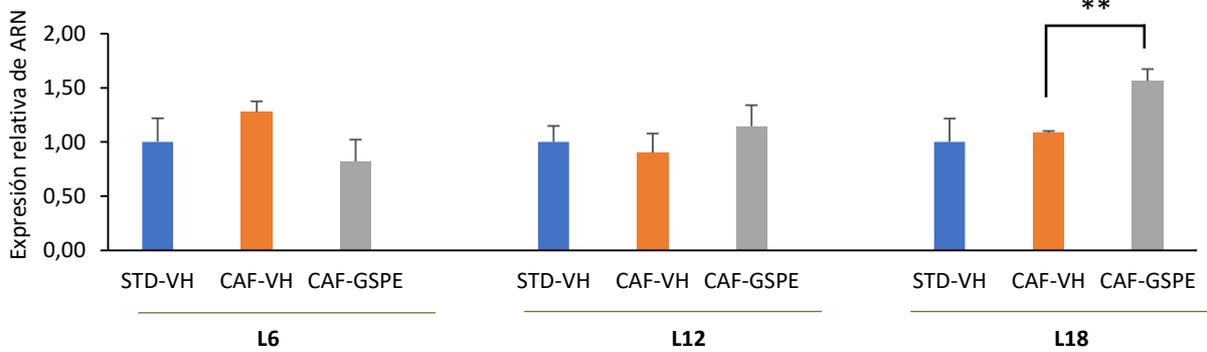
Gpat



C) Lipólisis

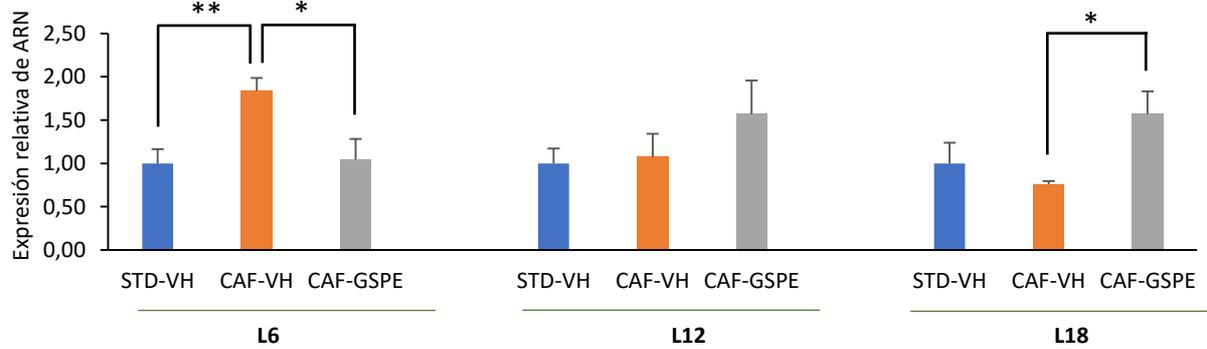
C1

Atgl



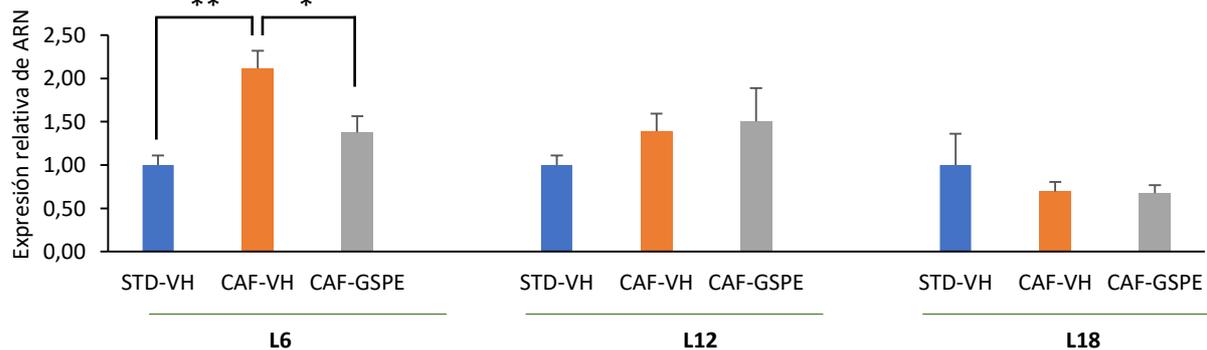
C2

Hsl



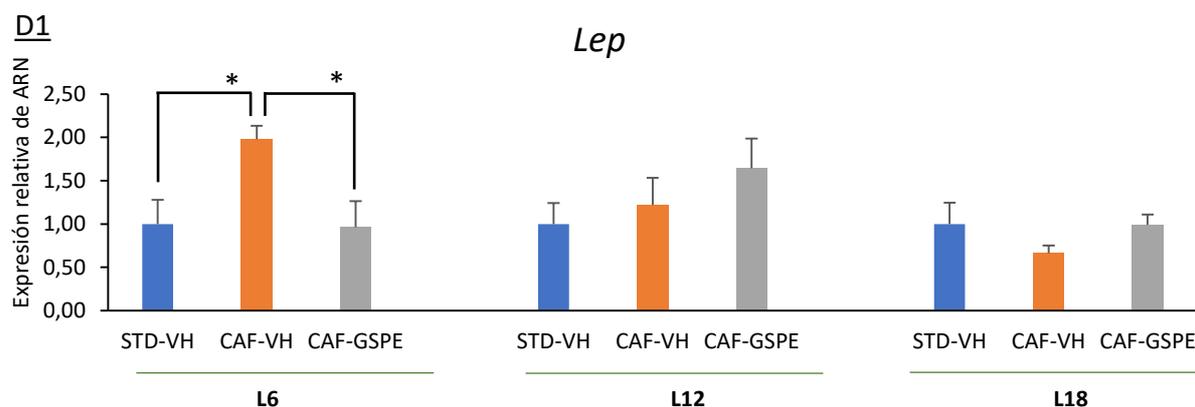
C3

Cpt1b



Expresión génica en TABi

D) Señalización de la leptina



E) Adiponectina

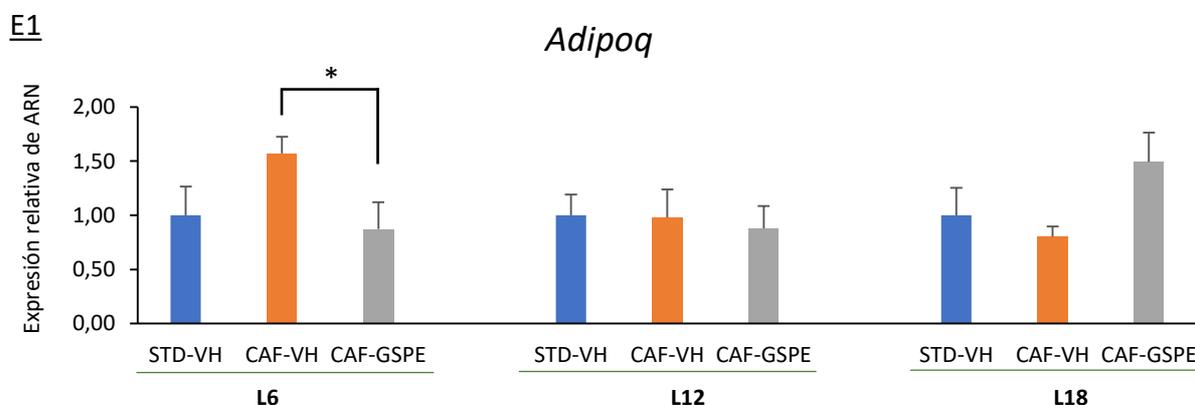


Figura 10. Efecto de la suplementación del extracto de proantocianidinas de semilla de uva (GSPE) en la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico en el tejido adiposo blanco inguinal (TABi). Las ratas Fisher 344 fueron alimentadas con una dieta estándar (STD) o de cafetería (CAF) durante 9 semanas y tratadas durante las últimas 4 semanas con vehículo (VH) o GSPE (25 mg/kg de peso corporal) en tres fotoperiodos distintos: L18 (18 h de luz y 6 h de oscuridad), L12 (12 h de luz y 12 h de oscuridad) y L6 (6 h de luz y 18 h de oscuridad). Expresión relativa de ARN de adipogénesis (*Ppar* γ , *C/ebpa*)(A), lipogénesis (*Acaca*, *Fasn*, *Gpat*)(B), lipólisis (*Atgl*, *Hsl*, *Cpt1b*)(C), señalización de la leptina (*Lep*) y adiponectina (*Adipoq*). Los niveles de ARN se normalizaron con el gen endógeno *Ppia* y luego al grupo de control STD-VH. Los resultados se presentan como la media \pm S.E.M. Para el análisis de las diferencias significativas se utilizó el test T de Student (** $P < 0,001$; * $P < 0,05$). *Ppar* γ : peroxisome proliferator-activated receptor gamma; *C/ebpa*: CCAAT/enhancer binding protein alpha; *Acaca*: Acetyl-CoA carboxylase alpha; *Fasn*: Fatty acid synthase; *Gpat*: Glycerol-3-phosphate acyltransferase; *Atgl*: Adipose triglyceride lipase; *Hsl*: Hormone-sensitive lipase; *Cpt1b*: Carnitine palmitoyltransferase 1B; *Lep*: Leptin; *Adipoq*: Adiponectin, C1Q And Collagen Domain Containing; *Ppia*: peptidylpropyl isomerase A (Cyclophilin A).

5. DISCUSIÓN

La suplementación del GSPE a través la dieta puede ser un tratamiento beneficioso para los pacientes con obesidad. Es más, estos polifenoles se utilizan para la prevención y reversión de enfermedades metabólicas, como la obesidad, la inflamación, la resistencia a la insulina y las alteraciones lipídicas [36][37]. Asimismo, estudios como el de *Pascual-serrano et al.* [42] han descrito que el GSPE presenta efectos antihipertróficos que modulan positivamente la homeostasis de lípidos y glucosa, evitando trastornos metabólicos, ya que los adipocitos hipertróficos están relacionados con el MetS y la resistencia a la insulina. De este modo, en estudios anteriores, se ha descrito que la suplementación de GSPE en una ingesta elevada en grasas afecta al metabolismo lipídico del tejido adiposo, ya que el GSPE limita la acumulación de lípidos y disminuye significativamente el peso de los depósitos de TAB [17][40].

Por un lado, cada vez se descubren nuevos factores que tienen una evidente influencia en el riesgo a desarrollar obesidad. De este modo, un factor destacable serían los distintos fotoperiodos, ya que por ejemplo fotoperiodos cortos de luz como en invierno se han asociado con una mayor predisposición a padecer obesidad [4][43]. Asimismo, varios estudios han demostrado que las ratas Fischer 344, utilizadas en este estudio, se adaptan a los cambios de los fotoperiodos y presentan fuertes respuestas fisiológicas a los cambios estacionales [4][26][42][43]. Estos animales estacionales son sensibles a las variaciones del fotoperiodo, ya que los ciclos de luz y oscuridad afectan a su desarrollo. En este sentido, es importante destacar que las ratas consumen la mayor parte de los alimentos diarios durante la fase oscura, por lo que durante fotoperiodos cortos de luz los animales tenderían a comer más. Este motivo puede ser una de las razones por las que no se observó ninguna diferencia significativa del efecto de la dieta durante el L18, ya que sólo tenían 6 h de oscuridad. Sin embargo, cabe destacar que no hay muchos estudios centrados en los cambios de los fotoperiodos en el TAB, por lo que se requiere más investigación al respecto [4].

Por otro lado, la hipertrofia y la hiperplasia de los adipocitos contribuyen a la expansión del TAB en la obesidad [21][42]. En el presente estudio, las ratas que fueron alimentadas con dieta CAF, se pudo observar que la expansión del TABi se produjo por hipertrofia debido a que hubo un aumento del área, volumen y frecuencia de área de los adipocitos de TABi en el L6 y el L12. Asimismo, se produjo hipertrofia del TABi en el L18 inducida por la dieta CAF aunque no fue significativa. No obstante, cabe destacar que no se originó una hiperplasia de los adipocitos, ya que no se alteró significativamente el número de adipocitos del depósito de TABi en ninguno de

los fotoperiodos analizados. Por tanto, la obesidad originada en los animales de este estudio se caracterizó por una expansión “no saludable” del TABi a través de la hipertrofia de los adipocitos, produciéndose infiltraciones de grasa en los adipocitos maduros. Este tipo de expansión, como se ha mencionado anteriormente, promueve alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad, como CVD, T2DM y resistencia a la insulina [21][42]. Sin embargo, estudios anteriores habían reportado que durante la expansión subcutánea del TAB, como el TABi, es relevante la hiperplasia, dato que difiere de los resultados obtenidos en el presente estudio, pero otros estudios sólo han descrito que la expansión es significativa a través de la hiperplasia en el TABv [16][21][44].

En nuestro estudio histológico del TABi, no se obtuvo un efecto significativo de la suplementación de GSPE en ratas obesas inducidas por la dieta CAF en ninguno de los fotoperiodos estudiados. Una razón al respecto podría ser la propia concentración de GSPE administrada (25 mg/Kg peso corporal), ya que aunque se observó cierta actividad beneficiosa del GSPE en la fisiología del TABi, esta no fue significativa. Es por ello que con un aumento de la dosis de GSPE administrada como en estudios de *Pascual-Serrano et al.* [5] y *Pons et al.* [45], se podrían obtener mayores efectos significativos y beneficiosos del GSPE en el TABi. Además, se ha demostrado que la reducción de la hipertrofia de los adipocitos es dependiente de la dosis de GSPE administrada. Este hecho sugiere que dietas ricas en polifenoles pueden ser una efectiva estrategia para mejorar sus alteraciones metabólicas en humanos con obesidad [42]. Por tanto, con una dosis dietética mayor de GSPE se podría observar un efecto notable del GSPE sobre la morfología de los adipocitos en condiciones de obesidad [5]. No obstante, es necesario más estudios al respecto para conseguir una dosis óptima. Otro aspecto a tener en cuenta es el tiempo de administración, ya que con un tiempo de administración del GSPE más largo de las 4 semanas de tratamiento, se podría observar un efecto más significativo del consumo del GSPE.

Aunque no se obtuvieron cambios significativos en la morfología de los adipocitos con la suplementación de GSPE, la eficacia del GSPE en la obesidad podría variar dependiendo de la estación de administración, ya que en el L12 se obtuvo la mayor reducción del volumen de adipocitos y mayor aumento del número de adipocitos en los depósitos de TABi con la administración de GSPE a diferencia de los otros dos fotoperiodos estudiados. En este contexto, se ha demostrado que el consumo de frutas ricas en polifenoles como la cereza y la naranja afectan a la morfología y al metabolismo del tejido adiposo de manera diferente dependiendo del fotoperiodo de consumo. Por lo que la temporada de consumo y la estación en la que se cosechan las frutas pueden tener cierta influencia en la funcionalidad del TAB. Asimismo, cabe

destacar que el L12 que simula el otoño, es la estación de la temporada de la uva. No obstante, es necesario más investigación al respecto con el fin de desarrollar dietas de prevención de la obesidad [25][26][43].

Respecto al estudio de la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico, hay varios procesos implicados que son necesarios para la correcta funcionalidad del tejido adiposo como la adipogénesis, la lipogénesis y la lipólisis. La aparición de alteraciones en estos procesos aumenta el riesgo a desarrollar trastornos metabólicos como la obesidad [46].

En cuanto a la adipogénesis, el GSPE moduló de diferente manera la expresión de los genes implicados en la adipogénesis, *Ppar γ* y *C/ebp α* , dependiendo del fotoperiodo. Ambos genes tienen un papel clave en la adipogénesis, ya que participan en la activación de vías metabólicas implicadas con la acumulación de lípidos en el tejido adiposo, que activa el metabolismo lipídico de los adipocitos y la diferenciación de los preadipocitos con el fin de originar adipocitos maduros [21][25][43]. Además, *Ppar γ* reduce la expresión de genes de la lipólisis y de la movilización de ácidos grasos, por lo que desregulaciones en estos dos genes producen importantes complicaciones en la obesidad [46]. Por otro lado, igual que en estudios como el de *Gibert-Ramos et al.* [4] hubo un aumento de la expresión de los genes de la adipogénesis (*Ppar γ* y *C/ebp α*) en animales con dieta CAF durante un fotoperiodo corto. No obstante, no hubo diferencias en la expresión en los fotoperiodos de duración de luz más larga. Asimismo, se ha demostrado que el GSPE reduce los niveles de ARN de *Ppar γ* , inhibiendo la adipogénesis [42]. Resultado que concuerda con los obtenidos en el presente estudio tanto para *Ppar γ* y *C/ebp α* durante un fotoperiodo corto, L6. Sin embargo, la expresión de estos genes en el L12 no se vio afectada por la administración del GSPE. Por el contrario, hay estudios como el de *Pascual-Serrano et al.* [42] que contradicen el efecto antiadipogénico del GSPE, ya que este compuesto bioactivo puede presentar actividades adipogénicas como se observó en el L18 significativamente y ligeramente en el L12, habiendo una sobreexpresión de *Ppar γ* . Por tanto, dependiendo del fotoperiodo, el GSPE tendría un efecto antiadipogénico o adipogénico en los adipocitos de TABi.

Respecto a la lipogénesis del TABi, se evaluaron los genes *Acac α* , *Fasn* y *Gpat*. Únicamente hubo efecto significativo de la dieta debido a una disminución expresión del gen *Acac α* en el L12 y el L18 y un aumento en la expresión del gen *Gpat* en el L6. La administración de GSPE produjo pequeños cambios en la expresión de estos genes, pero no hubo diferencias significativas en

ningún fotoperiodo analizado. Por tanto, el GSPE reduce ligeramente la síntesis de novo de lípidos, produciendo una menor actividad lipogénica que afecta ligeramente a una disminución de la acumulación de TAG en los adipocitos de TABi [5][41]. Es más, se ha reportado que los polifenoles como el resveratrol reducen el aumento de la expresión de *Fasn* causada por dieta rica en grasa en el TAB [5]. Resultado que concuerda con el efecto del GSPE sobre estos genes en el L12 y el L18, provocando una ligera disminución de la actividad lipogénica [25]. No obstante, cabe destacar que la eficiencia de los *primers* del gen *Gpat* no fue óptima, por lo que se debería de volver a comprobar el efecto del GSPE y de la dieta en este gen.

En cuanto a la lipólisis, dependiendo del fotoperiodo expuesto hubo sobreexpresión o represión de los genes analizados (*Atgl*, *Hsl* y *Cpt1b*). Durante el L6, se observó una sobreexpresión significativa de los genes *Hsl* y *Cpt1b* inducido por la dieta CAF, pero una ligera expresión de *Atgl*, al igual que en estudio de *Gibert-Ramos et al.* [4]. El GSPE presenta propiedades lipolíticas y moduló la expresión génica de manera diferente según el fotoperiodo, produciendo una disminución de la expresión de *Atgl*, *Hsl* y *Cpt1b* en las ratas obesas, siendo significativa en los dos últimos genes durante el L6, provocando una disminución en la movilización de lípidos y la oxidación de ácidos grasos beta en los adipocitos de TABi. No obstante, no se observó efecto alguno del GSPE en el L12 al igual que en el estudio de *Pascual-Serrano et al.* [5]. Por el contrario, durante la exposición a fotoperiodos más largos, el GSPE provocó una sobreexpresión de los genes *Atgl* y *Hsl* causando una mayor lipólisis en estas condiciones a diferencia del resto de fotoperiodos analizados [40].

Estudios como el de *Gibert-Ramos et al.* [25] han demostrado que el tamaño de los adipocitos está relacionado directamente con la funcionalidad de los adipocitos en pacientes obesos. En concreto, los adipocitos hipertróficos de TAB sufren alteraciones en el almacenamiento y la movilización de lípidos, disminuyendo la expresión de genes implicados en la lipólisis y la lipogénesis como se observó en el presente estudio en genes como *Acaca*, *Fasn* y *Hsl* dependiendo del fotoperiodo expuesto.

Respecto a la señalización de la leptina, la administración del GSPE disminuyó significativamente la expresión del gen *Lep* inducida por la dieta alta en grasas en el L6. Mientras la suplementación de GSPE en el L12 y el L18 produjo una ligera sobreexpresión de *Lep*. No obstante, en varios estudios se ha demostrado que el GSPE mejora la señalización de la leptina que ha sido alterada por el consumo de dietas altas en grasas [3][40][42]. Por ello, la administración de

proantocianidinas en la dieta es una buena estrategia para mejorar la sensibilidad de la leptina periférica y central de individuos obesos [47].

En cuanto a la adiponectina en TABi, la suplementación de GSPE produjo una represión significativa del gen *Adipoq* en el L6, restaurando la expresión de la adiponectina que había sido aumentada con la dieta CAF [42]. Sin embargo, a medida que aumentaba la duración de luz en los fotoperiodos, el efecto del GSPE sobre esta expresión génica fue aumentando, aunque no fue significativa ni en el L18 ni en el L12. Es más, se ha sugerido una relación entre la secreción de adipoquinas proinflamatorias en los depósitos de TABs y el tamaño de los adipocitos [43]. No obstante, aunque disminuyó significativamente la expresión del gen *Adipoq* en L6, no se obtuvo una reducción significativa del tamaño de los adipocitos de TABi [47].

6. CONCLUSIONES

- El consumo de la dieta CAF provocó cambios morfológicos significativos en TABi, sobre todo en el L6.
- Aunque se ha descrito que el GSPE presenta propiedades antihipertróficas, en este estudio, el tratamiento con GSPE no produjo cambios significativos en la morfología del TABi en un modelo de rata obesa inducida por la dieta CAF en ninguno de los fotoperiodos estudiados.
- El GSPE moduló de manera diferente la expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico del TABi dependiendo del fotoperiodo.
- Los resultados obtenidos en este estudio podrían ser útiles para futuras investigaciones relacionadas con los compuestos bioactivos sobre los ritmos estacionales en la obesidad.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Ardid-Ruiz, A., Ibars, M., Mena, P., Del Rio, D., Muguerza, B., Bladé, C., ... Suárez, M. (2018). Potential involvement of peripheral leptin/STAT3 signaling in the effects of resveratrol and its metabolites on reducing body fat accumulation. *Nutrients*, *10*(11), 1757. <https://doi.org/10.3390/nu10111757>
2. Pascual Serrano, A. Thesis, D. (2017). Adipose tissue remodelling by polyphenols in obese rats.
3. Ibars, M., Ardid-Ruiz, A., Suárez, M., Muguerza, B., Bladé, C., & Aragonès, G. (2017). Proanthocyanidins potentiate hypothalamic leptin/STAT3 signalling and Pomc gene expression in rats with diet-induced obesity. *International Journal of Obesity*, *41*(1), 129–136. <https://doi.org/10.1038/ijo.2016.169>
4. Gibert-Ramos, A., Ibars, M., Salvadó, M. J., & Crescenti, A. (2019). Response to the photoperiod in the white and brown adipose tissues of Fischer 344 rats fed a standard or cafeteria diet. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *70*, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.04.005>
5. Pascual-Serrano, A., Bladé, C., Suárez, M., & Arola-Arnal, A. (2018). Grape seed proanthocyanidins improve white adipose tissue expansion during diet-induced obesity development in rats. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(9), 2632. <https://doi.org/10.3390/ijms19092632>
6. Popkin, B. M., Adair, L. S., & Ng, S. W. (2012). Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. *Nutrition Reviews*, *70*(1), 3–21. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2011.00456.x>
7. Casanova, E., Salvadó, J., Crescenti, A., & Gibert-Ramos, A. (2019). Epigallocatechin gallate modulates muscle homeostasis in type 2 diabetes and obesity by targeting energetic and redox pathways: A narrative review. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(3), 532. <https://doi.org/10.3390/ijms20030532>
8. Burhans, M. S., Hagman, D. K., Kuzma, J. N., Schmidt, K. A., & Kratz, M. (2019). Contribution of adipose tissue inflammation to the development of type 2 diabetes mellitus. *Comprehensive Physiology*, *9*(1), 1–58. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170040>
9. Nam, S. Y. (2017). Obesity-related digestive diseases and their pathophysiology. *Gut and Liver*, *11*(3), 323–334. <https://doi.org/10.5009/gnl15557>
10. Ginés, I., Gil-Cardoso, K., Serrano, J., Casanova-Martí, À., Blay, Mt., Pinent, M., ... Terra, X. (2018). Effects of an intermittent grape-seed proanthocyanidin (GSPE) treatment on

- a cafeteria diet obesogenic challenge in rats. *Nutrients*, *10*(3), 315. <https://doi.org/10.3390/nu10030315>
11. Bargut, T. C. L., Souza-Mello, V., Aguila, M. B., & Mandarim-De-Lacerda, C. A. (2017). Browning of white adipose tissue: Lessons from experimental models. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, *31*(1). <https://doi.org/10.1515/hmbci-2016-0051>
 12. Rui, L. (2017). Brown and beige adipose tissues in health and disease. *Comprehensive Physiology*, *7*(4), 1281–1306. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170001>
 13. Thyagarajan, B., & Foster, M. T. (2017). Beiging of white adipose tissue as a therapeutic strategy for weight loss in humans. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, *31*(2), 1–13. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2017-0016>
 14. Sarjeant, K., & Stephens, J. M. (2012). Adipogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(9), a008417. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008417>
 15. Choe, S. S., Huh, J. Y., Hwang, I. J., Kim, J. I., & Kim, J. B. (2016). Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders. *Frontiers in Endocrinology*, *7*, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00030>
 16. Palou, A., Picó, C., & Luisa Bonet, M. (2013). Nutritional potential of metabolic remodelling of white adipose tissue. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, *16*(6), 650–656. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e328328365980f>
 17. Ginés, I., Gil-Cardoso, K., Serrano, J., Casanova-Martí, À., Lobato, M., Terra, X., ... Pinent, M. (2019). Proanthocyanidins limit adipose accrual induced by a cafeteria diet, several weeks after the end of the treatment. *Genes*, *10*(8), 598. <https://doi.org/10.3390/genes10080598>
 18. Neyrinck, A. M., Bindels, L. B., Geurts, L., Van Hul, M., Cani, P. D., & Delzenne, N. M. (2017). A polyphenolic extract from green tea leaves activates fat browning in high-fat-diet-induced obese mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *49*, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.07.008>
 19. Chait, A., & den Hartigh, L. J. (2020). Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, *7*, 22. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00022>
 20. Giralt, M., & Villarroya, F. (2013). White, brown, beige/brite: Different adipose cells for different functions? *Endocrinology*, *154*(9), 2992–3000. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1403>
 21. Longo, M., Zatterale, F., Naderi, J., Parrillo, L., Formisano, P., Raciti, G. A., ... Miele, C. (2019). Adipose tissue dysfunction as determinant of obesity-associated metabolic

- complications. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2358. <https://doi.org/10.3390/ijms20092358>
22. White, U., & Ravussin, E. (2019). Dynamics of adipose tissue turnover in human metabolic health and disease. *Diabetologia*, 62(1), 17–23. <https://doi.org/10.1007/s00125-018-4732-x>
23. Trim, W., Turner, J. E., & Thompson, D. (2018). Parallels in immunometabolic adipose tissue dysfunction with ageing and obesity. *Frontiers in Immunology*, 9, 169. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00169>
24. Arola-Arnal, A., Cruz-Carrión, Á., Torres-Fuentes, C., Ávila-Román, J., Aragonès, G., Mulero, M., ... Suárez, M. (2019). Chrononutrition and Polyphenols: Roles and Diseases. *Nutrients*, 11(11), 2602. <https://doi.org/10.3390/nu11112602>
25. Gibert-Ramos, A., Crescenti, A., & Salvadó, M. J. (2018). Consumption of cherry out of season changes white adipose tissue gene expression and morphology to a phenotype prone to fat accumulation. *Nutrients*, 10(8), 1102. <https://doi.org/10.3390/nu10081102>
26. Mariné, R. Thesis, D. (2018). Physiological and metabolic adaptations to different photoperiods: effects of obesity and seasonal fruit consumption.
27. Mariné-Casadó, R., Domenech-Coca, C., del Bas, J. M., Bladé, C., Arola, L., & Caimari, A. (2018). The exposure to different photoperiods strongly modulates the glucose and lipid metabolisms of normoweight fischer 344 rats. *Frontiers in Physiology*, 9, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00416>
28. Zvonic, S., Ptitsyn, A. A., Conrad, S. A., Scott, L. K., Floyd, Z. E., Kilroy, G., ... Gimble, J. M. (2006). Characterization of peripheral circadian clocks in adipose tissues. *Diabetes*, 55(4), 962–970. <https://doi.org/10.2337/diabetes.55.04.06.db05-0873>
29. Ryu, V., Zarebidaki, E., Albers, H. E., Xue, B., & Bartness, T. J. (2018). Short photoperiod reverses obesity in Siberian hamsters via sympathetically induced lipolysis and Browning in adipose tissue. *Physiology and Behavior*, 190, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.07.011>
30. Golombek, D. A., Bussi, I. L., & Agostino, P. V. (2014). Minutes, days and years: Molecular interactions among different scales of biological timing. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1637). <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0465>
31. Kanikowska, D., Sato, M., & Witowski, J. (2015). Contribution of daily and seasonal biorhythms to obesity in humans. *International Journal of Biometeorology*, 59(4), 377–384. <https://doi.org/10.1007/s00484-014-0871-z>

32. Iglesias-Carres, L., Mas-Capdevila, A., Sancho-Pardo, L., Bravo, F. I., Mulero, M., Muguerza, B., & Arola-Arnal, A. (2018). Optimized extraction by response surface methodology used for the characterization and quantification of phenolic compounds in whole red grapes (*Vitis vinifera*). *Nutrients*, *10*(12), 1931. <https://doi.org/10.3390/nu10121931>
33. Del Bas, J. M., Crescenti, A., Arola-Arnal, A., Oms-Oliu, G., Arola, L., & Caimari, A. (2015). Intake of grape procyanidins during gestation and lactation impairs reverse cholesterol transport and increases atherogenic risk indexes in adult offspring. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *26*(12), 1670–1677. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.08.015>
34. Figueira, I., Menezes, R., Macedo, D., Costa, I., & Dos Santos, C. N. (2017). Polyphenols Beyond Barriers: A Glimpse into the Brain. *Current Neuropharmacology*, *15*(4), 562–594. <https://doi.org/10.2174/1570159X14666161026151545>
35. Bladé, C., Aragonès, G., Arola-Arnal, A., Muguerza, B., Bravo, F. I., Salvadó, M. J., ... Suárez, M. (2016). Proanthocyanidins in health and disease. *BioFactors*, *42*(1), 5–12. <https://doi.org/10.1002/biof.1249>
36. Salvadó, M. J., Casanova, E., Fernández-Iglesias, A., Arola, L., & Bladé, C. (2015). Roles of proanthocyanidin rich extracts in obesity. *Food and Function*, *6*(4), 1053–1071. <https://doi.org/10.1039/c4fo01035c>
37. Rodríguez-Pérez, C., García-Villanova, B., Guerra-Hernández, E., & Verardo, V. (2019). Grape Seeds Proanthocyanidins: An Overview of In Vivo Bioactivity in Animal Models. *Nutrients*, *11*(10), 2435. <https://doi.org/10.3390/nu11102435>
38. Garbacki, N., Tits, M., Angenot, L., & Damas, J. (2004). Inhibitory effects of proanthocyanidins from *Ribes nigrum* leaves on carrageenin acute inflammatory reactions induced in rats. *BMC Pharmacology*, *4*, 25. <https://doi.org/10.1186/1471-2210-4-25>
39. Montagut, G., Bladé, C., Blay, M., Fernández-Larrea, J., Pujadas, G., Salvadó, M. J., ... Ardévol, A. (2010). Effects of a grapeseed procyanidin extract (GSPE) on insulin resistance. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *21*(10), 961–967. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.08.001>
40. Caimari, A., Del Bas, J. M., Crescenti, A., & Arola, L. (2013). Low doses of grape seed procyanidins reduce adiposity and improve the plasma lipid profile in hamsters. *International Journal of Obesity*, *37*(4), 576–583. <https://doi.org/10.1038/ijo.2012.75>
41. Margalef, M., Pons, Z., Iglesias-Carres, L., Bravo, F. I., Muguerza, B., & Arola-Arnal, A. (2015). Lack of Tissue Accumulation of Grape Seed Flavanols after Daily Long-Term

- Administration in Healthy and Cafeteria-Diet Obese Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(45), 9996–10003. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03856>
42. Pascual-Serrano, A., Arola-Arnal, A., Suárez-García, S., Bravo, F. I., Suárez, M., Arola, L., & Bladé, C. (2017). Grape seed proanthocyanidin supplementation reduces adipocyte size and increases adipocyte number in obese rats. *International Journal of Obesity*, 41(8), 1246–1255. <https://doi.org/10.1038/ijo.2017.90>
43. Gibert-Ramos, A., Palacios-Jordan, H., Salvadó, M. J., & Crescenti, A. (2020). Consumption of out-of-season orange modulates fat accumulation, morphology and gene expression in the adipose tissue of Fischer 344 rats. *European Journal of Nutrition*, 59(2), 621–631. <https://doi.org/10.1007/s00394-019-01930-9>
44. Joe, A. W. B., Lin, Y., Even, Y., Vogl, A. W., & Rossi, F. M. V. (2009). Depot-specific differences in adipogenic progenitor abundance and proliferative response to high-fat diet. *Stem Cells*, 27(10), 2563–2570. <https://doi.org/10.1002/stem.190>
45. Pons, Z., Margalef, M., Bravo, F. I., Arola-Arnal, A., & Muguerza, B. (2017). Chronic administration of grape-seed polyphenols attenuates the development of hypertension and improves other cardiometabolic risk factors associated with the metabolic syndrome in cafeteria diet-fed rats. *British Journal of Nutrition*, 117(2), 200–208. <https://doi.org/10.1017/S0007114516004426>
46. Moreno-Indias, I., & Tinahones, F. J. (2015). Impaired adipose tissue expandability and lipogenic capacities as ones of the main causes of metabolic disorders. *Journal of Diabetes Research*, 2015, 970375. <https://doi.org/10.1155/2015/970375>
47. Ibars, M., Aragonès, G., Ardid-Ruiz, A., Gibert-Ramos, A., Arola-Arnal, A., Suárez, M., & Bladé, C. (2018). Seasonal consumption of polyphenol-rich fruits affects the hypothalamic leptin signaling system in a photoperiod-dependent mode. *Scientific Reports*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31855-y>

8. AUTOAVALUACIÓN

La realización del TFG en el grupo de Nutrigenómica de la URV ha sido una experiencia muy gratificante y positiva para mí tanto a nivel profesional como personal. Además, he podido aprender más conocimientos del ámbito de la nutrición.

Por un lado, esta estancia me ha servido de base para poder familiarizarme con nuevas técnicas como la extracción del ARN, siguiendo unas correctas pautas para la realización de la correspondiente metodología. Además, he adquirido nuevos puntos de vista a la hora de analizar adecuadamente los datos y ser más crítico a la hora de discutir los resultados experimentales con información bibliográfica y he podido aplicar los conocimientos adquiridos durante la carrera. Asimismo, he ampliado conocimientos sobre el tejido adiposo, las PACs, la obesidad y los ritmos estacionales.

Por otro lado, destaco el trabajo que he realizado de forma autónoma con responsabilidad y con iniciativa propia en el laboratorio, ya que han sido claves para reforzar la confianza conmigo mismo. Además, con la situación de crisis vivida por culpa del COVID-19, me ha ayudado a tener una visión diferente de la ciencia y adaptarme a las circunstancias para poder realizar el trabajo y hacer los objetivos que me había propuesto en un principio.

Finalmente, formar parte de una de las líneas de investigación en el grupo de Nutrigenómica me ha ayudado para mejorar mi formación como científico y tener claro la orientación de mi futuro profesional.

9. ANEXOS

ANEXO 1: PERSPECTIVAS DE FUTURO

En primer lugar, los estudios de histología y de expresión génica en el tejido adiposo deben seguir estudiándose. Entre los experimentos pendientes de este estudio destaca el análisis de la expresión de genes implicados en el metabolismo de la glucosa (*G6pd*, *Glut4* y *Irs2*) y en el reloj biológico (*Bmal1*, *Cry1*, *Per2*, *Nampt* y *Nr1d1*). De este modo, al igual que se ha evaluado el efecto del GSPE, falta por estudiar el efecto de otros compuestos bioactivos. Asimismo, es necesario realizar una cuantificación de las proteínas implicadas en la funcionalidad del TABi dependiendo del fotoperiodo y del tratamiento administrado. Finalmente, este estudio se centró en el TABi, por lo que se deben analizar otros tipos de tejido adiposo, como por ejemplo el tejido adiposo blanco mesentérico (TABm) o el TAM, siendo interesante en este último tejido evaluar la dinámica mitocondrial dependiendo del tratamiento administrado y de los distintos fotoperiodos.

ANEXO 2: COMPOSICIÓN FENÓLICA DEL GSPE

Tabla 2. Composición fenólica del extracto de proantocianidinas de uva (GSPE), empleado en este ensayo, analizada mediante HPLC-ESI-MS/MS [41].

| Compound | Concentration (mg/g) |
|-------------------------------|----------------------|
| Gallic acid | 31.07 ± 0.08 |
| Protocatechuic acid | 1.34 ± 0.02 |
| Vanillic acid | 0.77 ± 0.04 |
| PA dimer B2 | 33.24 ± 1.39 |
| PA dimer B1 ^a | 88.80 ± 3.46 |
| PA dimer B3 ^a | 46.09 ± 2.07 |
| Catechin | 121.32 ± 3.41 |
| Epicatechin | 93.44 ± 4.27 |
| Dimer gallate ^a | 8.86 ± 0.14 |
| Epicatechin gallate | 21.24 ± 1.08 |
| Epigallocatechin gallate | 0.03 ± 0.00 |
| Epigallocatechin ^b | 0.27 ± 0.03 |
| PA trimer ^a | 4.90 ± 0.47 |
| PA tetramer ^a | 0.05 ± 0.01 |

Abreviaturas: PA (proantocianidina) Los resultados son expresados con la media ± SD (n = 3). Los resultados de concentración se expresan en mg de compuesto fenólico/g de GSPE. ^a Cuantificado usando la curva de calibración de la proantocianidina B2. ^b Cuantificado utilizando la curva de calibración del galato de epigallocatequina.

ANEXO 3: REACTIVOS EMPLEADOS DE LA MASTERMIX DE LA RETROTRANSCRIPCIÓN

Tabla 3. Reactivos empleados de la Mastermix de la retrotranscripción para cada muestra.

| RETROTRANSCRIPCIÓN | |
|--|--|
| Reactivos (<i>TaqMan RT PreMix</i>) | Volumen ($\mu\text{L}/\text{pocillo}$) |
| Agua <i>ARNasa free</i> | 4,2 |
| 10x RT buffer | 2,0 |
| 25x dNTPs Mix | 0,8 |
| 10x RT <i>Random Primers</i> | 2,0 |
| <i>MultiScribe Reverse Transcriptase</i> (50U/ μL) | 1,0 |
| Volumen total <i>TaqMan PreMix</i> | 10,0 |

ANEXO 4: REACTIVOS EMPLEADOS DE LA MASTERMIX DE LA RT-qPCR.

Tabla 4. Reactivos empleados de la MasterMix de la PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) para cada muestra.

| RT-qPCR | |
|-------------------------------------|--|
| Reactivos <i>MasterMix</i> | Volumen ($\mu\text{L}/\text{pocillo}$) |
| Agua <i>ARNasa free</i> | 1,00 |
| iTaq™ Universal SYBR Green Supermix | 2,50 |
| <i>Reverse primer</i> | 0,25 |
| <i>Forward primer</i> | 0,25 |
| Volumen total <i>Mastermix</i> | 4,00 |

ANEXO 5: ANÁLISIS HISTOLÓGICO

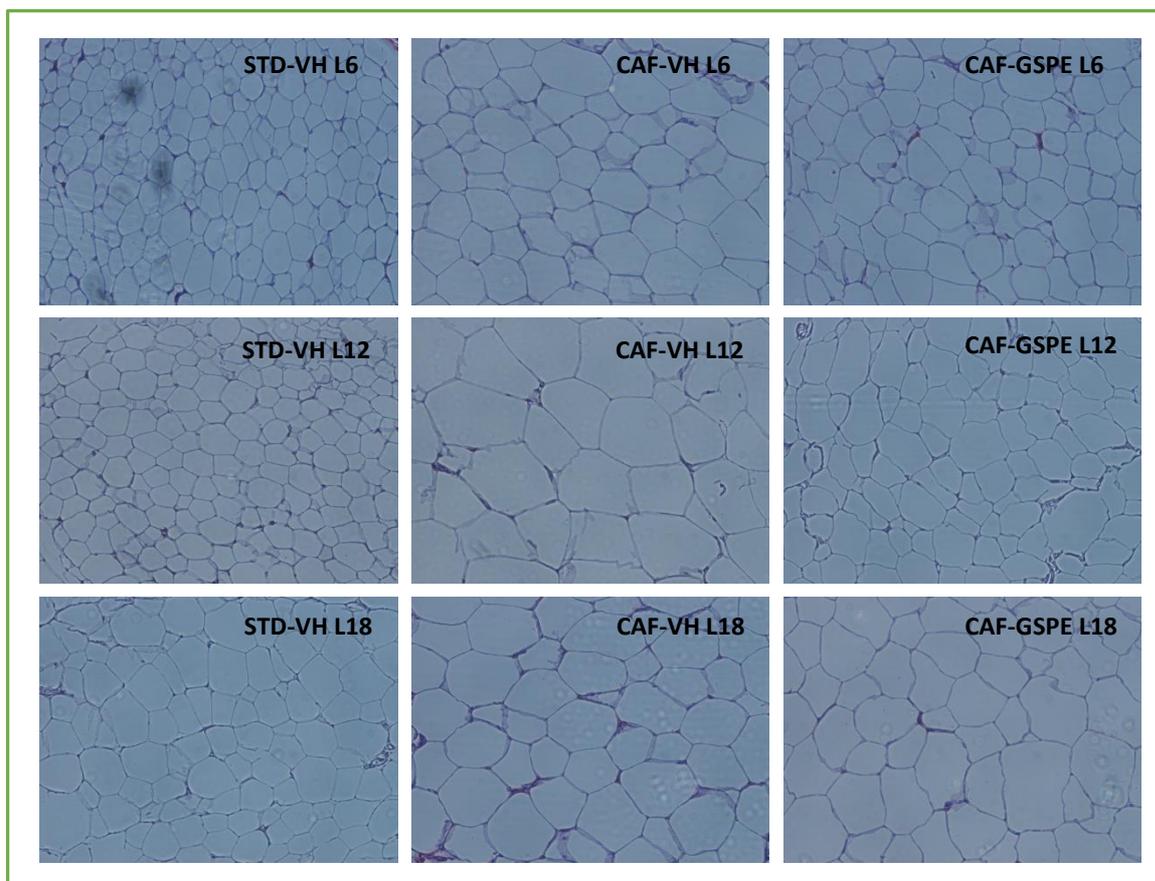


Figura 11. Imágenes representativas de TABi cada grupo de estudio (microscopía de luz teñido con hematoxilina y eosina).

ANEXO 6: EFICIENCIA DE LOS PRIMERS

Tabla 5. Eficiencia de los primers utilizados para cada gen en el análisis de expresión génica en TABi.

| Gen | Eficiencia primers |
|---------------------------------|--------------------|
| <i>Ppia</i> | 2,066 |
| <i>Pparγ</i> | 1,992 |
| <i>C/ebpα</i> | 1,780 |
| <i>Acacα</i> | 1,947 |
| <i>Fasn</i> | 1,875 |
| <i>Gpat</i> | 2,855 |
| <i>Atgl</i> | 1,945 |
| <i>Hsl</i> | 2,021 |
| <i>Cpt1b</i> | 1,924 |
| <i>Lep</i> | 1,918 |
| <i>Adipoq</i> | 1,939 |