



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI



Grup de Recerca
NUTRIGENÒMICA URV

ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LOS RITMOS CIRCADIANOS MUSCULARES CON EL EFECTO TERAPÉUTICO DE UN EXTRACTO DE PROANTOCIANIDINAS DE SEMILLA DE UVA EN RATAS CON SÍNDROME METABÓLICO

Alba Royo García

TRABAJO FINAL DE GRADO BIOTECNOLOGÍA

Tutor académico y supervisor: Miquel Mulero Abellán, Departamento de
Bioquímica y Biotecnología, miquel.mulero@urv.cat

Tarragona, 8 de Junio de 2020



Yo, **Alba Royo García**, con DNI **73088046-A**, soy conocedora de la guía de prevención del 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/vidacampus/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, 8 de Junio de 2020

(Firma)



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría dar las gracias al grupo de Nutrigenómica por dejarme formar parte de una de sus líneas de investigación para realizar prácticas extracurriculares.

Por un lado, me gustaría agradecer al profesor investigador Miquel Mulero Abellán por ser mi supervisor durante la estancia de prácticas y mi tutor del presente trabajo. Gracias por la confianza depositada en mí y por transmitirme parte de tus conocimientos. Además, me gustaría agradecer todo su apoyo y ayuda en el desarrollo de este trabajo final de grado. Por otro lado, quiero agradecer a la estudiante de PhD Romina Mariel Rodríguez por ser mi supervisora en las prácticas, gracias por resolver todas mis dudas, darme consejos y ayudarme siempre que lo necesitaba. Gracias por todas las horas que hemos pasado juntas trabajando en el laboratorio.

Por último, quiero agradecer a mi familia, amigos y pareja por su constante apoyo para conseguir mis objetivos.



DATOS DEL CENTRO

Este proyecto se ha centrado en una de las líneas de investigación del grupo de Nutrigenómica (NG) de la Universidad Rovira i Virgili (URV).

El grupo está dirigido por María Begoña Muguerza Marquínez y lo forman profesores, investigadores postdoctorales y estudiantes de doctorado del Departamento de Bioquímica y Biotecnología de la URV.

El grupo de NG tiene varias líneas de investigación subvencionadas por entidades públicas y privadas tanto en el ámbito nacional como en el internacional. Actualmente, el grupo tiene diferentes líneas de investigación activas. Entre ellas se encuentra la línea en la cual he sido participe para realizar este Trabajo Final de Grado. Dicha línea se basa en la evaluación de los efectos beneficiosos de compuestos fenólicos sobre patologías relacionadas con el síndrome metabólico, con especial atención a las proantocianidinas. Estos compuestos se pueden obtener de diferentes alimentos, donde destaca el extracto de proantocianidinas procedente de las semillas de la uva (GSPE), compuesto bioactivo en el cual se centra este proyecto.

CONTEXTUALIZACIÓN DEL TFG

Debido a la crisis del COVID-19 no se pudo acceder al laboratorio, por lo que no se han podido llevar a cabo parte de los experimentos que se tenían previstos. Por ello, la estructura que se ha seguido para realizar este trabajo es la siguiente: Una introducción pura, un apartado de resultados dividido en una primera parte experimental realizada y una segunda parte experimental no realizada basada en bibliografía, y por último, una discusión global de los resultados experimentales obtenidos.



RESUMEN

El síndrome metabólico (MetS) es una agrupación de factores cardiometabólicos que contribuyen a desarrollar diabetes tipo II y enfermedades cardiovasculares. El aumento de la prevalencia y el riesgo que conlleva, hacen que se convierta en una patología con un importante impacto en la salud pública. Estudios previos han relacionado las alteraciones metabólicas debido a dietas altas en grasa (HFD) con la modulación de los ritmos circadianos y la dinámica mitocondrial. No obstante, se ha evidenciado científicamente los beneficios terapéuticos de los polifenoles como posible tratamiento, con especial atención a un extracto de proantocianidinas de semilla de uva (GSPE). Este trabajo se centra en el estudio del impacto del GSPE sobre los ritmos circadianos musculares en un modelo de MetS. Por tanto, la hipótesis planteada es la existencia de una alteración circadiana en el metabolismo energético y la dinámica mitocondrial del músculo esquelético debido a una HFD. Para demostrarla se estudian parámetros bioquímicos, genes del reloj circadiano muscular, genes y proteínas de dinámica mitocondrial y proteínas metabólicas en un modelo experimental de MetS.

Dos grupos de ratas Fischer 344 se alimentaron durante 9 semanas con dieta estándar o cafetería (CAF), y fueron suplementadas con diferentes tratamientos, vehículo o GSPE, en las últimas 4 semanas. Las ratas CAF se consideran un modelo robusto de MetS, lo que se evidencia con el posterior análisis bioquímico. Nuestros resultados corroboran dicho modelo por la ganancia de peso corporal, ingesta de alimentos e hiperglucemia. Del mismo modo, el GSPE muestra un efecto beneficioso en la reducción de la glucemia a las 9PM. No obstante, el músculo sóleo muestra menos sensibilidad que otros órganos a la disrupción del reloj molecular por una HFD.

En conclusión, el GSPE ha mostrado efectos beneficiosos modulando las alteraciones metabólicas, considerándose por ello un buen candidato como estrategia terapéutica para pacientes con MetS.

Palabras clave: Síndrome metabólico; ritmos circadianos; GSPE; dieta de cafetería



ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	i
DATOS DEL CENTRO	ii
CONTEXTUALIZACIÓN DEL TFG	ii
RESUMEN	iii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. SÍNDROME METABÓLICO (MetS)	1
1.1.1. METABOLISMO ASOCIADO AL MÚSCULO ESQUELÉTICO	3
1.2. RITMOS CIRCADIANOS	5
1.2.1. RITMOS CIRCADIANOS DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO	9
1.3. DINÁMICA MITOCONDRIAL.....	10
1.4. EXTRACTO DE PROANTOCIANIDINAS DE SEMILLA DE UVA (GSPE)	12
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	16
3.2. GSPE	16
3.3. INFORMACIÓN DE LOS ANIMALES	16
3.3.1. ANÁLISIS DEL SUERO	17
3.4. EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL.....	17
3.4.1. RETROTRANSCRIPCIÓN	18
3.4.2. PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (RT-qPCR)	20
3.5. EXTRACCIÓN PROTEÍNAS	20
3.5.1. CUANTIFICACIÓN PROTEICA.....	22
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	22
4. RESULTADOS	23
4.1. ANÁLISIS DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS	23
4.1.1. PESO CORPORAL.....	23
4.1.2. INGESTA DE ALIMENTOS	25
4.1.3. GLUCOSA PLASMÁTICA	26
4.2. EXPRESIÓN GÉNICA Y PROTEICA EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO	27
4.2.1. GENES DEL RELOJ CIRCADIANO.....	27
4.2.2. GENES Y PROTEÍNAS DE LA DINÁMICA MITOCONDRIAL.....	29
4.2.3. PROTEÍNAS DEL METABOLISMO ENERGÉTICO	31



5.	DISCUSIÓN.....	32
6.	CONCLUSIONES	35
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	36
8.	AUTOEVALUACIÓN.....	40
9.	ANEXOS	41
	ANEXO 1: PERSPECTIVAS FUTURAS.....	41
	ANEXO 2: DISTRIBUCIÓN DE LA PLACA 384 PARA REALIZAR LA RT-qPCR.....	41
	ANEXO 3: <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA REALIZAR LA RT-qPCR	42
	ANEXO 4: DISTRIBUCIÓN DE LA PLACA DE 96 PARA EL ENSAYO DE BCA.....	42



1. INTRODUCCIÓN

1.1. SÍNDROME METABÓLICO (MetS)

El síndrome metabólico (MetS) es un grave problema de salud pública a nivel mundial ^{(1) (2)}. Se caracteriza por un conjunto interrelacionado de trastornos metabólicos que incluyen la obesidad abdominal, resistencia a la insulina (IR), hipertensión y dislipidemia ^{(1) (2) (3)}. Todo ello incrementa el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (CVD) y diabetes mellitus tipo 2 (T2DM), así como la morbilidad y mortalidad asociada ^{(1) (2) (3) (4)}. Además, el MetS está asociado con una gran variedad de cánceres incluyendo cáncer de mama, pancreático, de colon e hígado ⁽³⁾. El MetS se define por exhibir tres o más de estos factores metabólicos ⁽⁴⁾, siendo la obesidad abdominal el componente más frecuentemente observado en pacientes con MetS ⁽⁵⁾.

Estudios epidemiológicos indican que la incidencia del MetS varía entre el 20% y el 45% de la población, y se espera que aumente aproximadamente al 53% en 2035 ⁽⁵⁾. En 2015 se estimó que, más de 600 millones de adultos y 100 millones de niños en todo el mundo eran obesos. Actualmente, la obesidad se considera la principal responsable de la creciente prevalencia del MetS. Además, es un importante marcador de desregulación metabólica con un 12% de adultos obesos en el mundo ⁽⁴⁾. Por ello, el MetS ha adquirido más relevancia en los últimos años debido al aumento exponencial de la obesidad a nivel mundial ⁽⁶⁾. Aunque no existen estadísticas sobre la incidencia mundial del MetS, esta patología suele estar asociada a la obesidad y a la T2DM ⁽⁷⁾. Las estimaciones actuales sugieren que una cuarta parte de la población mundial ⁽⁷⁾, más de 1.000 millones de personas, tienen MetS ⁽⁴⁾. Esto indica la alta prevalencia mundial del MetS, alrededor de un 20-30% de todos los adultos ⁽¹⁾. Según criterios de la organización mundial de la salud, la prevalencia del MetS es del 36,8%. Actualmente, está aumentando en relación con la creciente incidencia de la T2DM y la obesidad ⁽¹⁾. Esta prevalencia del MetS depende de diversos factores como la edad, el sexo, la raza/etnia y de los criterios utilizados para el diagnóstico ⁽⁶⁾.

La etiología del MetS se cree que está relacionada con la desregulación de la homeostasis energética, en la cual es clave la interacción y comunicación entre tejidos como el hígado, tejido adiposo, músculo e intestino mediante factores secretados por estos ⁽⁴⁾. El desequilibrio metabólico se caracteriza principalmente por un mayor consumo que gasto energético ⁽⁷⁾. No obstante, los factores genéticos y adquiridos como por ejemplo un estilo de vida sedentario,



escasa actividad física, consumo de calorías excesivas, así como la composición de la microbiota intestinal, son determinantes en la patogénesis del MetS ⁽⁶⁾ ⁽⁷⁾.

Ciertos estudios han demostrado que la adiposidad visceral es el principal desencadenante de la mayoría de las vías implicadas en el MetS (*Figura 1*), siendo la alta ingesta calórica el principal factor causante ⁽⁶⁾. Además, la IR, la activación neurohormonal y la inflamación crónica por el incremento de citoquinas pro-inflamatorias parecen ser factores primordiales del inicio y progresión del MetS ⁽⁶⁾. Este incremento de inflamación puede inducir diferentes efectos sistémicos como la IR o la acumulación de ácidos grasos en el hígado, tejido adiposo, músculo o riñones. Otras complicaciones asociadas son el aumento de triacilglicéridos (TAGs) plasmáticos, la glucosa y el estrés oxidativo ⁽⁸⁾ ⁽⁹⁾.

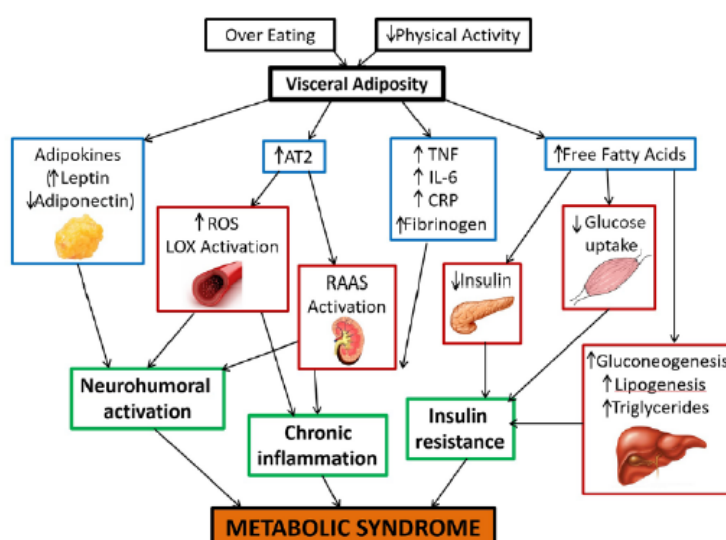


Figura 1 | Mecanismos fisiopatológicos del MetS ⁽⁶⁾. Se describen las diferentes vías y procesos que ocurren en el organismo que desencadenan el MetS.

Como consecuencia del incremento mundial en la prevalencia de la obesidad en los últimos años, el MetS se ha convertido en una gran preocupación de salud pública. Por tanto, la búsqueda de nuevos enfoques terapéuticos contra el MetS está aumentando ⁽¹⁾ ⁽⁸⁾. Actualmente, las intervenciones en el estilo de vida como el incremento de la actividad física y la modificación de la dieta para reducir el peso corporal, son los tratamientos más eficaces para el MetS ⁽¹⁾ ⁽⁴⁾. No obstante, también existen estrategias farmacológicas contra componentes individuales del MetS: antihipertensivos (como los inhibidores de la ACE), antidiabéticos (como la metformina) o antihipercolesterolémicos (como las estatinas) ⁽⁴⁾ ⁽⁶⁾. Por ejemplo, la metformina es el fármaco antidiabético más eficaz para prevenir el MetS en



pacientes con alto riesgo ⁽⁶⁾ ⁽⁷⁾. Sin embargo, no existe un único tratamiento farmacológico para el MetS que afecte directamente a sus causas principales ⁽⁴⁾ ⁽⁶⁾. Por tanto, la modificación de los factores dietéticos y la actividad física, indica ser lo más efectivo para dicha patología. En los últimos años, se ha producido un creciente interés por el uso de compuestos naturales para reducir el riesgo y la progresión del MetS ⁽⁶⁾. A pesar de la falta de consenso con respecto a una dieta óptima para la intervención en el MetS, la evidencia epidemiológica destaca la importancia del consumo de frutas y verduras a largo plazo, ya que son alimentos muy eficaces para inducir beneficios en la salud ⁽¹⁾ ⁽⁹⁾. En particular, los polifenoles presentes en estos han surgido como una potencial estrategia nutricional efectiva para mejorar el estado de salud de los pacientes con MetS ⁽¹⁾ ⁽⁶⁾.

1.1.1. METABOLISMO ASOCIADO AL MÚSCULO ESQUELÉTICO

El músculo esquelético es el tejido más abundante del cuerpo humano, comprendiendo aproximadamente el 45% de la masa corporal total ⁽¹⁰⁾. A diferencia de otros tipos de músculos, el músculo esquelético contribuye a generar el movimiento voluntario transformando energía química en mecánica. Esta función es posible gracias a la presencia de células musculares, conocidas como miocitos o fibras. Estas células musculares esqueléticas son muy heterogéneas tanto en estructura como función entre los diferentes tipos de músculo esquelético. Se han descrito tres tipos de fibras en función de sus propiedades: fibras de tipo I o fibras rojas de contracción lenta, fibras de tipo IIa de contracción intermedia y fibras IIb o fibras blancas de contracción rápida ⁽¹¹⁾. Cada tipo de músculo esquelético presenta un determinado tipo de fibra, no obstante, el músculo es un órgano con cierta plasticidad y puede ser modulado por estímulos externos como el ejercicio para adquirir otro tipo ⁽¹⁰⁾.

Los miocitos son células especializadas en la producción de ATP (*Adenosine triphosphate*) como fuente de energía, sin embargo, también contribuyen a la homeostasis metabólica de todo el cuerpo, regulando el equilibrio de la síntesis y degradación proteica ⁽¹¹⁾ ⁽¹²⁾. El músculo esquelético actúa como principal reservorio de aminoácidos en ayuno, permitiendo de este modo la síntesis de proteínas en otros tejidos. Además, también actúa como depósito de glucosa en estado postprandial. Los miocitos pueden absorber hasta el 80% de la glucosa a través de los transportadores de glucosa GLUT4, y producir ATP a través de la vía glicolítica o bien, polimerizar y almacenarla en forma de glicógeno ⁽¹⁰⁾ ⁽¹¹⁾. En consecuencia, el músculo esquelético es vital para la homeostasis de la glucosa a nivel sistémico ⁽¹⁰⁾, y por tanto, es un órgano altamente sensible a la insulina ⁽¹³⁾. Por otro lado, hay una síntesis de TAGs a partir de los ácidos grasos que provienen de la dieta y la circulación. En condiciones de demanda



energética debido al ayuno o actividad física, los almacenes de glucógeno y TAGs son degradados, y los sustratos obtenidos son utilizados como fuente de energía por el músculo esquelético⁽¹¹⁾.

Dentro del metabolismo del músculo esquelético, es importante destacar el papel de dos proteínas esenciales para mantener la homeostasis metabólica y el buen funcionamiento del músculo. Por un lado, se encuentra Akt o proteína kinasa B, descrita como un intermediario clave en la vía de señalización de la insulina^{(11) (14)}. Para mantener la homeostasis de la glucosa es necesaria la secreción de insulina en estado postprandial. No obstante, esta hormona requiere de diferentes vías metabólicas para transducir su señal, siendo una de ellas Akt^{(11) (14)}. La isoforma Akt2 se expresa principalmente en tejidos sensibles a la insulina como el músculo esquelético, participe de la regulación de la homeostasis energética. Una vez la insulina se ha unido a su receptor, se produce una cascada de señalización que acaba con la fosforilación y consiguiente activación de Akt⁽¹⁵⁾. Esta proteína desencadena la activación o inhibición de una gran cantidad de sustratos con funciones metabólicas. Cabe destacar que en condiciones de IR, Akt está suprimida^{(11) (15) (16)}.

Por otro lado, se encuentra AMPK (*Adenosine monophosphate-activated protein kinase*), un sensor de la energía celular que modula varias vías metabólicas y se considera el principal regulador de la homeostasis energética en el organismo. Esta proteína se activa por el aumento de los niveles de AMP (*Adenosine monophosphate*), asociado a condiciones de demanda energética como el ayuno o la actividad física. Por tanto, la proteína AMPK promueve las vías catabólicas que producen ATP como la absorción de glucosa por medio de la estimulación de GLUT4 en el músculo esquelético, e inhiben las vías anabólicas que consumen ATP, como los procesos de biosíntesis. Además, se ha evidenciado que AMPK está inhibida en condiciones de sobrealimentación, es decir, de obesidad^{(15) (17)}.

Los cambios en la composición y función muscular están fuertemente relacionados con el desarrollo de enfermedades tales como la T2DM, CVD o cáncer⁽¹⁰⁾. Además, la alteración de la función muscular puede contribuir a la IR y al MetS⁽¹⁰⁾. Ciertos estudios han evidenciado que el MetS también puede interrumpir la función del músculo esquelético, reduciendo así la movilidad de los individuos⁽⁸⁾.

Este trabajo se centra en el estudio de dos tipos de músculos esqueléticos diferentes, sóleo y gastrocnemio, con la finalidad de comprobar si existen diferencias entre ambos en presencia de MetS. El sóleo es un músculo postural pequeño compuesto principalmente por fibras de



tipo I de oxidación lenta, con un alto contenido de mitocondrias. Además, dichas fibras principalmente oxidan lípidos y glucosa y se dedican a ejercicios de resistencia de baja intensidad y larga duración ⁽¹³⁾. Por el contrario, el gastrocnemio es un músculo grande y de rápida contracción, está compuesto principalmente por fibras glicolíticas de tipo IIb que participan en ejercicios de alta intensidad y de corta duración. Además, tienen un bajo contenido en mitocondrias ⁽¹³⁾.

1.2. RITMOS CIRCADIANOS

Los ritmos circadianos son oscilaciones endógenas de aproximadamente 24 horas que regulan muchos procesos fisiológicos como la alimentación, sueño-vigilia, actividad locomotora y homeostasis del metabolismo en ausencia de señales ambientales ⁽¹⁸⁾ ⁽¹⁹⁾. Con el fin de adaptarse y anticiparse a los cambios diarios del medio ambiente, la mayoría de los organismos han desarrollado un sistema de sincronización, el llamado sistema de relojes circadianos moleculares situados a lo largo del cuerpo humano ⁽¹⁸⁾ ⁽¹⁹⁾ ⁽²⁰⁾. Este sistema regula y dirige los ritmos circadianos que a su vez son sincronizados por señales ambientales (*Zeitgebers* (ZTs)), como la duración del día (fotoperíodo), la temperatura o la alimentación ⁽¹¹⁾ ⁽¹³⁾ ⁽²¹⁾. A través de este sistema, por ejemplo, los humanos y otros mamíferos bajan su ritmo cardíaco y temperatura corporal con el fin de prepararse para el sueño ⁽²⁰⁾. Este sistema también permite que el organismo cambie su principal sustrato metabólico de carbohidratos durante la fase activa (diurna en los humanos y nocturna en animales nocturnos) a lípidos durante la fase inactiva (nocturna en humanos y diurna en animales nocturnos) ⁽²⁰⁾.

El sistema circadiano de los mamíferos consiste en: un reloj cerebral central localizado en el núcleo supraquiasmático (SCN) del hipotálamo, y relojes periféricos presentes en la mayoría de las células de órganos y tejidos, incluido músculo, tejido adiposo, páncreas e hígado ⁽²¹⁾. Los relojes circadianos son modificados por señales ambientales periódicas predecibles como el fotoperíodo (luminosidad/oscuridad), la disponibilidad de alimentos (ingesta/ayuno), actividad física o incluso cambios metabólicos ⁽¹⁴⁾ ⁽¹⁹⁾. El principal ZT que regula los ritmos circadianos es la luz, pero otras señales externas como la ingesta de alimentos y la actividad física también modulan los relojes circadianos ⁽¹⁵⁾. La luz ambiental (diurna) es percibida por la retina cuya señal es transmitida a través del tracto retinohipotalámico al SCN, y de este a los relojes periféricos ⁽¹⁹⁾. La luz sincroniza el ritmo circadiano de aproximadamente 24 horas del SCN con el ritmo diario exacto de 24 horas de las rotaciones de la tierra alrededor de su eje ⁽²⁰⁾ ⁽²¹⁾. Posteriormente, el reloj central del hipotálamo sincroniza los diferentes relojes periféricos a



través de las conexiones neuronales y la señalización hormonal ⁽⁸⁾ ⁽¹¹⁾. Por ejemplo, los glucocorticoides promueven la movilización de energía y la melatonina está asociada con la regulación circadiana de la secreción de insulina y los niveles de glucosa en sangre ⁽⁸⁾ ⁽²¹⁾. Esta sincronización también afecta a la regulación de múltiples procesos que influyen en: el ritmo diurno del metabolismo de la glucosa, ritmos fisiológicos diarios del comportamiento sueño-vigilia, la ingesta de alimentos, la secreción de hormonas, la sensibilidad a la insulina y el gasto energético ⁽²¹⁾. Los relojes periféricos de los tejidos son además sincronizados por otros ZTs como la composición e ingesta alimentaria, la temperatura corporal y la actividad física ⁽¹⁹⁾ ⁽²⁰⁾. Por lo tanto, la modificación de los estímulos externos puede desencadenar en una alteración metabólica del sistema circadiano ⁽¹⁹⁾.

A nivel molecular, los ritmos circadianos de las células, tanto periféricos como del SCN, se generan mediante un mecanismo similar que consiste en una serie de bucles de retroalimentación de transcripción-traducción (TTFL) positivos y negativos interconectados ⁽¹⁵⁾ ⁽²¹⁾ ⁽²²⁾. Sin embargo, los diversos genes y proteínas involucrados en estos TTFL difieren entre las especies. En los mamíferos, estos bucles aseguran la oscilación del sistema de cronometraje molecular y consisten en un conjunto de cuatro genes del reloj molecular circadiano: los factores de transcripción activadores BMAL1 (*The brain and muscle ARNT-like 1*) y CLOCK (*Circadian locomotor output cycles kaput*) que forman heterodímeros en el núcleo y se unen a la secuencia de unión de la *E-box* en regiones promotoras de los genes diana. Como se muestra en la *figura 2*, los heterodímeros CLOCK:BMAL1 promueven la expresión de las proteínas represoras PER1/2 (*Period circadian regulator*) y CRY1/2 (*Cryptochrome circadian regulator*) por la mañana. Después, estas proteínas se acumulan en el citoplasma y se degradan rápidamente tras la fosforilación por CK1s y AMPK. Al comienzo de la fase oscura, se forman complejos entre PER y CRY e inician la translocación al núcleo. Estos complejos inhiben la actividad CLOCK:BMAL1 durante la noche, y por tanto, su propia transcripción. Por la mañana, los niveles de PER y CRY disminuyen en el núcleo, y por tanto, se pierde la represión de CLOCK:BMAL1 iniciando un nuevo ciclo circadiano ⁽¹⁴⁾ ⁽²³⁾, tal y como se muestra en la *figura 2*.

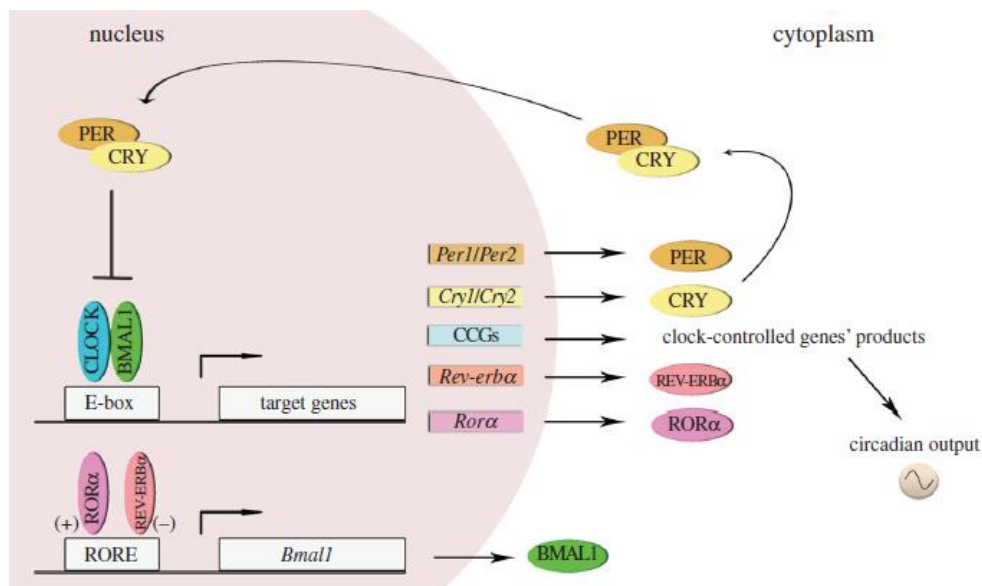


Figura 2|El reloj molecular circadiano en los mamíferos ⁽²²⁾. Se observan los mecanismos moleculares de los ritmos circadianos con los genes y proteínas involucrados.

La fluctuación de estos genes del reloj central se incrementa y estabiliza por un bucle secundario en el que la expresión de BMAL1 es activada por ROR α (*Nuclear receptor RAR-related orphan receptor alpha*) e inhibida por REV-ERB α/β (*Reverse-erythroblastosis virus*, también conocido como NR1D1) mediante la unión al elemento de respuesta RORE en la región promotora de BMAL1 ^{(11) (14)} (Figura 2). El resultado de estas complejas vías de regulación es que los niveles de ARNm y proteínas de la mayoría de los genes circadianos oscilan con un periodo aproximado de 24 horas.

El heterodímero CLOCK:BMAL1 también regula la transcripción de muchos CCGs (*Clock-controlled genes*) o genes metabólicos al unirse a las E-box de sus promotores ^{(18) (22)} (Figura 2). Un subconjunto de estos CCGs muestran ritmos en todos los tejidos ⁽²⁰⁾, no obstante, un gran porcentaje son específicos de tejidos como GLUT4, PPAR α y NAMPT, relacionados con varios procesos bioquímicos y metabólicos externos al mecanismo oscilatorio ^{(18) (22)}. Cabe destacar que las funciones celulares posteriores al mecanismo del reloj molecular (conservado en todos los tejidos del cuerpo) son específicas de cada tejido ⁽²⁰⁾.

Además, el sistema de TTFL está principalmente modulado por procesos transcripcionales y traduccionales ⁽¹⁷⁾. De hecho, se ha demostrado que hay reguladores post-traduccionales que aseguran la periodicidad del sistema rítmico ⁽¹⁷⁾. Por ejemplo, se ha evidenciado que CLOCK es una histona acetiltransferasa (activa la expresión génica) regulada por SIRT1 (*Sirtuin 1*), una histona deacetilasa (silencia los genes diana) dependiente de los niveles de NAD⁺ (*Nicotinamide adenine dinucleotide*). A su vez el NAD⁺ está regulado por la enzima NAMPT



(*Nicotinamide phosphoribosyltransferase*), que cataliza el primer paso de la síntesis de NAD^+ y cuyo promotor es activado por el heterodímero CLOCK:BMAL1⁽¹⁷⁾. Del mismo modo, se ha determinado que la proteína AMPK, puede estimular la transcripción de NAMPT a través de la fosforilación e inhibición del gen CRY. Todo esto refuerza el hecho de que los ritmos circadianos están directamente asociados con el metabolismo⁽¹⁷⁾.

En este sentido, recientemente se ha evidenciado que los ritmos circadianos están íntimamente asociados con la homeostasis metabólica a través de la regulación de una serie de procesos metabólicos⁽¹⁸⁾. Del mismo modo, se ha demostrado que ciertos metabolitos como los lípidos, la glucosa, y algunas hormonas como la insulina y la leptina, oscilan de manera circadiana en la sangre^{(11) (18)}. Cabe destacar que el ciclo de los componentes circadianos controla los procesos celulares y metabólicos fundamentales, como la gluconeogénesis, la fosforilación oxidativa y el procesamiento y traducción del ARNm⁽²²⁾. No obstante, perturbaciones de los ritmos circadianos debido al trabajo por turnos, muchas tareas ocupacionales, excesiva exposición a fuentes de luz artificial o mutaciones genéticas, se asocian con la disfunción metabólica⁽¹⁵⁾. Estudios epidemiológicos demuestran que el desajuste de los ritmos circadianos puede contribuir al desarrollo del MetS, a través de la hipertensión, IR y obesidad^{(18) (23)}. De forma recíproca, se ha determinado que ciertos sistemas metabólicos pueden afectar a los genes del reloj, y por tanto, a los sistemas circadianos^{(18) (23)}.

Como se ha descrito anteriormente, la ingesta de alimentos es un potente ZT con capacidad de perturbar los ritmos circadianos, especialmente de los relojes periféricos. Por lo tanto, hay una estrecha relación entre el estado metabólico y el reloj circadiano, tanto a nivel molecular como fisiológico⁽²²⁾. Varios estudios han identificado que una dieta alta en grasa (HFD) provoca la alteración del ciclo de alimentación normal y de los ciclos metabólicos⁽¹⁸⁾. Además, se ha determinado que las HFD también alteran los patrones de sueño al disminuir el tiempo de vigilia⁽¹¹⁾. Por ello, existe una alteración de los ritmos circadianos a causa de una HFD.

Visto lo comentado hasta ahora, uno de los objetivos principales de este trabajo se centra en estudiar la interacción entre una HFD, como modelo del MetS, y los ritmos circadianos en el tejido muscular, y por tanto, en el reloj periférico muscular.



1.2.1. RITMOS CIRCADIANOS DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO

El músculo esquelético de los humanos es uno de los tejidos periféricos con ritmos circadianos generados por un reloj molecular autónomo. Más de 2300 genes del músculo esquelético se expresan con un patrón circadiano, como por ejemplo, MYOD1, UCP3 o PGC1 α . Estos genes participan en una gran variedad de funciones, incluyendo la miogénesis, transcripción y el metabolismo. Los ritmos circadianos del músculo esquelético tal y como se ha comentado anteriormente, pueden ser sincronizados a través de diferentes señales externas, tanto indirectamente a través de la luz por el SCN o bien directamente a través de la alimentación y actividad física ^{(10) (15)}.

Principalmente, existen numerosos procesos metabólicos que ocurren en el músculo esquelético y están regulados por componentes del reloj circadiano. Por ejemplo, se ha evidenciado que BMAL1 y CLOCK aumentan la absorción de glucosa mediante el incremento de la expresión del transportador GLUT4 ⁽¹¹⁾. REV-ERB mejora la biogénesis mitocondrial y la función oxidativa al incrementar la expresión de AMPK, y ROR α estimula la β -oxidación de ácidos grasos ⁽¹¹⁾. Los mecanismos moleculares circadianos que regulan estos procesos metabólicos esenciales actúan de forma autónoma. Sin embargo, la perturbación de las señales ambientales puede alterar su ritmo, y consecuentemente, contribuir al desarrollo de ciertas patologías ⁽¹¹⁾. Estudios recientes han demostrado que las alteraciones en los ritmos circadianos pueden ser perjudiciales para la funcionalidad del músculo esquelético ⁽¹⁰⁾.

La actividad física se ha identificado como un potente ZT en el músculo esquelético ⁽¹²⁾. El ejercicio es uno de los estímulos que modula las propiedades del músculo, como por ejemplo, el tipo de fibras. No obstante, dicho estímulo actúa a nivel de todo el organismo para controlar el equilibrio energético ^{(12) (13)}. Varios estudios han determinado que el ejercicio modifica el ritmo de la maquinaria del reloj en el músculo esquelético e influye en el ritmo circadiano de todo el cuerpo ^{(12) (13)}. Así mismo, también se ha evidenciado que una dieta hipercalórica puede alterar los ritmos circadianos a nivel muscular ⁽¹³⁾. Dado que la función y movilidad del músculo esquelético se alteran con una HFD, se ha determinado que los cambios en la actividad física a causa de la obesidad alteran los ritmos circadianos del músculo esquelético ⁽¹²⁾. Por otro lado, otro factor que también contribuye a la desregulación de los ritmos circadianos en el músculo esquelético es AMPK. Esta proteína con importantes funciones metabólicas regula la expresión de varios genes del reloj ⁽¹⁷⁾. AMPK induce la actividad de SIRT1 que actúa sobre PGC1 α (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1-alpha*), principal regulador de la biogénesis mitocondrial y respiración en el músculo



esquelético ⁽¹³⁾ ⁽¹⁷⁾. Los diferentes estímulos ambientales como el ejercicio o los ciclos de ayuno/alimentación, modulan las propiedades metabólicas del músculo esquelético actuando sobre las relaciones AMP/ATP y NAD^+/NADH , controlando de este modo la actividad de AMPK y SIRT1 respectivamente ⁽¹³⁾.

1.3. DINÁMICA MITOCONDRIAL

Un parámetro importante que relaciona el metabolismo y el reloj muscular esquelético es la función mitocondrial ⁽¹²⁾. Las mitocondrias son orgánulos esenciales para la función celular debido a la producción de ATP mediante la fosforilación oxidativa ⁽²⁰⁾. Por tanto, son fundamentales en la regulación del metabolismo energético ⁽²⁴⁾. Además, las mitocondrias son altamente dinámicas tanto en forma como función. Sus actividades varían según el estado nutricional de la célula en los diferentes momentos del día, es decir, dependen del reloj circadiano ⁽¹²⁾. La dinámica mitocondrial es el proceso por el cual las mitocondrias se fusionan (fusión) y dividen continuamente (fisión), y está implicada en múltiples funciones celulares. Estos dos procesos opuestos se encuentran en equilibrio para mantener la morfología, la función mitocondrial y la red dinámica de la mitocondria ⁽²⁴⁾. De hecho, permite a la red celular mitocondrial modular sus propiedades bioenergéticas de acuerdo con las demandas nutricionales del organismo, regular la motilidad mitocondrial y actuar como un mecanismo de control de calidad facilitando la eliminación de las mitocondrias dañadas mediante la mitofagia ⁽¹⁴⁾. Por otro lado, se ha determinado que los procesos de fusión y fisión muestran cambios diurnos que están regulados por el ciclo de luz/oscuridad ⁽²⁰⁾.

La fusión mitocondrial está regulada por las GTPasas MFN1 (*Mitofusin 1*), MFN2 (*Mitofusin 2*) y OPA1 (*Optic atrophy 1*), mientras que la fisión mitocondrial está controlada por la GTPasa DRP1 (*Dynamin-related protein 1*), DNM2 (*Dynamine 2*) y FIS1 (*Fission 1*) ⁽¹⁴⁾. En el proceso de fragmentación mitocondrial, las mitocondrias son más redondas y pequeñas, no obstante, en la fusión, las mitocondrias sufren una elongación debido al incremento en su dimerización ⁽²⁵⁾ ⁽²⁶⁾ (*Figura 3*).

La fisión y fusión mitocondrial son los cambios estructurales más importantes que suceden en las mitocondrias. Sin embargo, perturbaciones en el equilibrio entre estos dos procesos afectan a la función mitocondrial y conducen a la disfunción mitocondrial ⁽²⁵⁾. Estudios recientes vinculan la dinámica mitocondrial con el equilibrio entre la demanda de energía y el suministro de nutrientes, sugiriendo cambios en la estructura mitocondrial como mecanismo

de adaptación bioenergética a las demandas metabólicas ⁽²⁶⁾, tal y como se muestra en la figura 3.

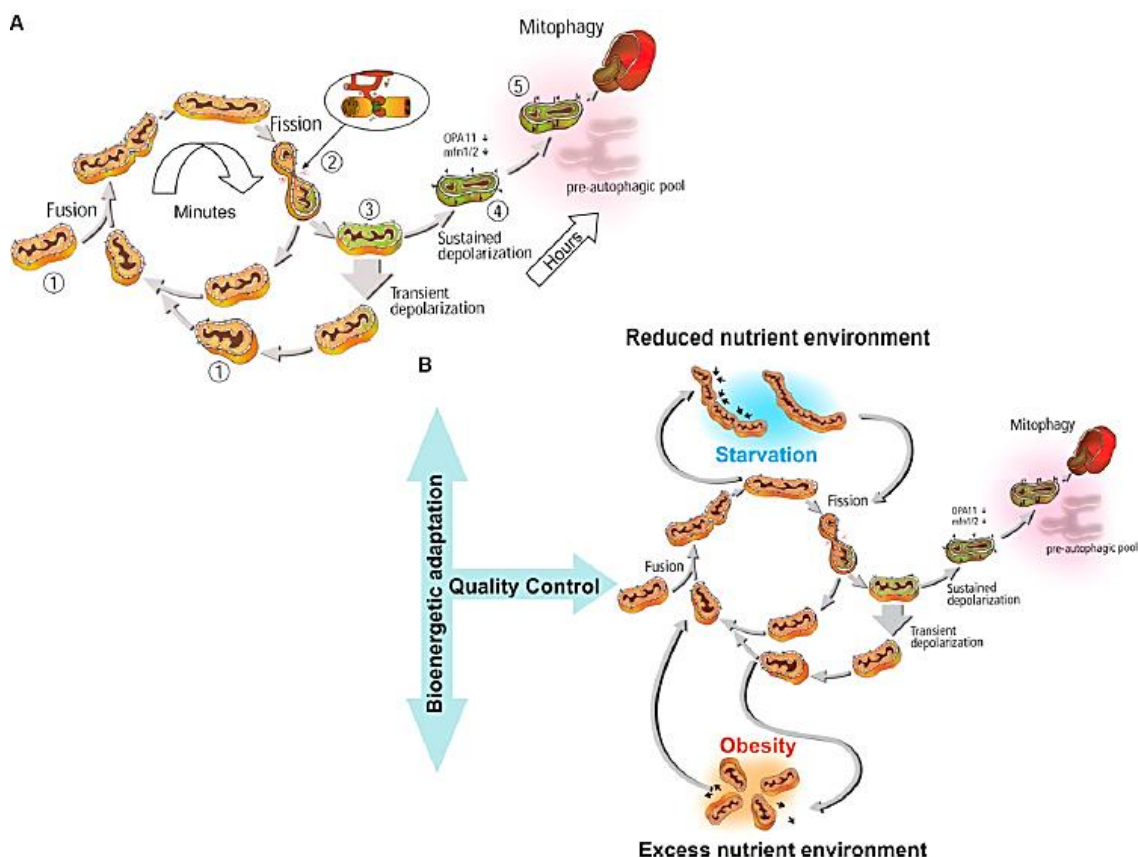


Figura 3|El ciclo de vida de las mitocondrias y su regulación por la disponibilidad de nutrientes ⁽²⁶⁾. (A) El ciclo se caracteriza por eventos de fusión y fisión. (B) Cambios en la disponibilidad de nutrientes y la demanda energética modifican la estructura mitocondrial a un estado elongado (inanición) o fragmentado (obesidad).

En efecto, existen evidencias de que la obesidad y el exceso de ingesta de energía alteran el equilibrio de la dinámica mitocondrial, contribuyendo por tanto, a la disfunción mitocondrial progresiva y al deterioro metabólico ⁽²⁴⁾ ⁽²⁶⁾. Por tanto, se sugiere que el exceso de grasa en la dieta afecta tanto a la biogénesis, la estructura como a la función mitocondrial ⁽²⁴⁾ ⁽²⁶⁾. De hecho, se ha determinado que las células expuestas a un entorno rico en nutrientes tienden a mantener sus mitocondrias en un estado fragmentado, mientras que las mitocondrias de las células en estado de inanición tienden al estado elongado ⁽²⁶⁾, tal y como se muestra en la figura 3. Así pues, se sugiere que la adaptación bioenergética implica una remodelación de la estructura mitocondrial ⁽²⁶⁾.

Ciertos estudios han determinado que las mitocondrias están implicadas en la fisiopatología de trastornos metabólicos como la T2DM, la obesidad, dislipidemia y CVD ⁽¹⁴⁾. Liesa et al ⁽²⁶⁾, encontraron mitocondrias fragmentadas en el músculo esquelético de individuos con T2DM y



obesidad. De hecho, se ha demostrado que la fisión mitocondrial contribuye a la disfunción mitocondrial y a la IR en el músculo esquelético ⁽²⁴⁾. Además, se sabe que las HFD regulan los genes relacionados con la biogénesis mitocondrial y el transporte de electrones en el tejido muscular ^{(24) (26)}. Así mismo, se ha documentado que pacientes con IR exhiben una disminución de la actividad oxidativa mitocondrial y de la síntesis de ATP en el músculo esquelético. En efecto, muestran una reducción tanto en número como en función de las mitocondrias ⁽²⁴⁾.

Consecuentemente, la alteración de la dinámica mitocondrial puede subyacer la patogénesis de la IR muscular en enfermedades como la obesidad o T2DM.

1.4. EXTRACTO DE PROANTOCIANIDINAS DE SEMILLA DE UVA (GSPE)

Las plantas han desarrollado vías metabólicas secundarias para incrementar las posibilidades de supervivencia. Estas vías implican la síntesis de compuestos bioactivos no nutritivos naturales, conocidos como fitoquímicos, con diferentes estructuras y funciones. Dentro de estos metabolitos secundarios hay diferentes tipos clasificados por su estructura química, donde se encuentran los compuestos fenólicos o polifenoles ^{(8) (9) (11)}. A su vez, los polifenoles, caracterizados por tener uno o más anillos aromáticos con grupos hidroxilos unidos, se clasifican en flavonoides o no flavonoides. Los flavonoides se componen de una gran variedad de compuestos, entre los que se encuentran los flavanoles. Estos últimos se encuentran en formas monoméricas, catequinas y epicatequinas o poliméricas, donde destacan las proantocianidinas (PACs) (polímeros de catequinas) ^{(9) (11) (27)} (Figura 4). Todos estos metabolitos secundarios se encuentran en los alimentos derivados de las plantas, tales como frutas y verduras ⁽²⁷⁾.

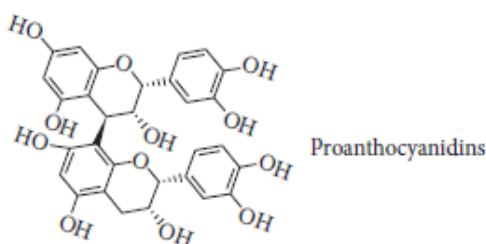


Figura 4 | Estructura química de las PACs ⁽²⁷⁾.

Los polifenoles de la dieta constituyen un gran grupo de compuestos naturales bioactivos con efectos beneficiosos en la salud, y además, son los metabolitos mayormente estudiados ⁽⁹⁾. Cabe destacar que la gran mayoría de los polifenoles no son absorbidos en el intestino delgado y llegan intactos al colon, donde son metabolizados por la microbiota intestinal en metabolitos de menor peso molecular ⁽¹⁾. Se sugiere que estos compuestos pueden ser los responsables de



los efectos beneficiosos para la salud ⁽¹⁾. Por lo tanto, las composiciones microbianas del intestino pueden determinar la eficacia de los polifenoles, y recíprocamente, los polifenoles pueden modular la composición ^{(1) (28)}. Varios estudios epidemiológicos han asociado la ingesta de estos compuestos (reveratrol, hesperidina, quercetina, PACs, epigallocatequina...) con efectos beneficiosos en la prevención y el tratamiento de varias enfermedades, como el cáncer, CVD, T2DM, obesidad o MetS ^{(9) (11)}.

Las PACs son una clase de compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en la naturaleza ⁽²⁹⁾. Se encuentran principalmente en frutas como las uvas, melocotones, cerezas, arándanos, o manzanas, verduras, cacao, frutos secos y en algunas bebidas como el vino tinto y el té ⁽²⁷⁾ ⁽²⁸⁾. Por lo tanto, su presencia en la dieta humana es considerablemente alta ⁽²⁸⁾. Cabe destacar que las PACs se consideran compuestos bioactivos por sus procesos fisiológicos y celulares ⁽³⁰⁾. Estudios previos del grupo de NG han evidenciado una amplia gama de efectos beneficiosos sobre la salud en relación con el metabolismo, como propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, hipotensivas e hipolipidémicas ^{(28) (30) (31)}. Además, las PACs causan el aumento de los genes relacionados con el gasto energético en el músculo esquelético y el hígado ⁽²⁹⁾.

Particularmente, se ha indicado que el GSPE, procedente de PACs presentes en la semilla de uva, podría ser beneficioso para controlar las alteraciones metabólicas observadas en el MetS ⁽³²⁾. El grupo de NG ha demostrado que este extracto tiene propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, mejora el metabolismo de los lípidos, limita la adipogénesis y actúa como agente mimético de la insulina ^{(29) (32)}. Estas propiedades lo hacen buen candidato como compuesto contra el MetS ⁽²⁹⁾. Estos polifenoles también corrigen la dislipidemia inducida por la dieta, reduciendo los niveles de TAGs y colesterol LDL ^{(9) (27) (28)}. Además, otros estudios del grupo han demostrado que el GSPE tiene la capacidad de reducir el peso corporal, la presión arterial y los depósitos de grasa en un modelo de MetS ^{(28) (31) (32) (33)}, así como modular la funcionalidad del tejido adiposo, el músculo esquelético y el hígado ^{(8) (9) (29) (31)}. Concretamente, se ha visto que el GSPE causa la activación de AMPK en el músculo esquelético ^{(28) (31)}, cuya activación induce la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática, aumentando así la absorción de glucosa ⁽³¹⁾. Además, la activación de AMPK también inhibe la lipogénesis, estimula la oxidación de ácidos grasos en el músculo esquelético y previene la producción de especies reactivas de oxígeno ^{(28) (31)}. Otros estudios han evidenciado disminuciones significativas en los niveles de glucosa e insulina después de tratamientos con



PACs en animales alimentados con una HFD ⁽²⁸⁾. Su efecto se relaciona con un incremento en la absorción de glucosa y gasto energético en tejidos sensibles a la insulina como el músculo esquelético ⁽²⁸⁾. El GSPE se ha asociado con un amplio rango de efectos beneficiosos para la prevención o tratamiento de las alteraciones metabólicas hepáticas y/o musculares causadas por la obesidad como la IR ^{(11) (32)}. Por ello, se sugiere que constituye un buen suplemento natural para actuar contra el MetS.

Por otro lado, el grupo de NG ha determinado que las PACs pueden actuar como ZT ⁽²⁸⁾. Además, se ha evidenciado que el GSPE puede modular significativamente los ritmos biológicos en las ratas, regulando la expresión génica de BMAL1 en el SCN ⁽²⁸⁾. Sin embargo, a parte de su efecto en el reloj central, los PACs también pueden modificar los ritmos circadianos en tejidos periféricos como el hígado e intestino ^{(28) (30)}.

Consecuentemente, dietas ricas en GSPE podrían ser una estrategia nutricional eficaz para mejorar la salud de los pacientes con MetS. Por tanto, en este trabajo se han estudiado los efectos del compuesto bioactivo PACs de semilla de uva en ratas Fischer 344 alimentadas con una HFD, ya que han demostrado ser un modelo experimental animal de MetS humano ^{(1) (32) (33)}. Además, se ha estudiado el efecto del GSPE en los ritmos circadianos musculares.



2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Estudios previos del grupo de investigación de NG han determinado el impacto de las alteraciones de factores ambientales como la dieta en los ritmos circadianos, y consecuentemente, en la homeostasis metabólica del músculo esquelético. Además, la dinámica mitocondrial es un indicio clave de lo que sucede a nivel celular con una alteración metabólica circadiana. Del mismo modo, los hallazgos del grupo sugieren que el extracto de PACs de semilla de uva es un buen candidato para reducir la presión arterial así como otras morbilidades asociadas al MetS como el peso corporal.

Por lo tanto, la hipótesis planteada es que existe una alteración circadiana en el metabolismo energético y la dinámica mitocondrial del músculo debido a una HFD. Además, el GSPE es capaz de modular dicha alteración. Para demostrar dicha hipótesis se definen los siguientes objetivos:

- 1) Estudiar cambios en determinados parámetros bioquímicos
- 2) Estudiar los genes del reloj en el músculo esquelético
- 3) Estudio de los genes y proteínas implicados en la dinámica mitocondrial
- 4) Estudio de proteínas implicadas en el metabolismo energético

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

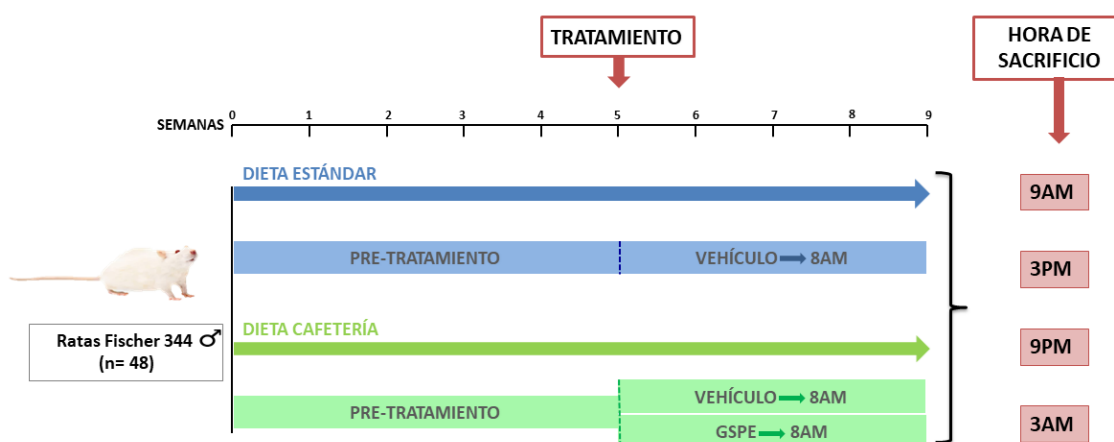


Figura 5 | Diseño experimental para el estudio del MetS en el modelo de ratas Fischer 344. Durante las cinco primeras semanas del experimento, un grupo fue alimentado con dieta estándar (STD) que se representa en azul y el otro grupo con dieta cafetería (CAF) en verde. A partir de la quinta semana, los animales fueron tratados con vehículo (VH) o GSPE diariamente a las 8AM durante cuatro semanas. En la novena semana, los animales fueron sacrificados en cuatro tiempos como se muestra en la figura.

3.2. GSPE

El GSPE fue proporcionado por Les Dérivés Résiniques et Terpéniques (Dax, Francia). La composición del GSPE utilizado en este estudio contiene: monómeros de flavanoles (21,3%), dímeros (17,4%), trímeros (16,3%), tetrámeros (13,3%) y oligómeros (31,7%) de PACs.

3.3. INFORMACIÓN DE LOS ANIMALES

Los animales utilizados fueron 48 ratas macho Fischer 344 de 12 semanas de edad (Charles River Laboratories, España). Las ratas fueron alojadas en parejas en cuartos de animales a 22°C, bajo un fotoperiodo estándar de 12 horas de luz (de ZTs 08:00 a 20:00) y 12 horas de oscuridad. Todos los animales fueron alimentados *ad libitum* con una dieta estándar (STD) (2,90 kcal/g) (Teklad Global 14% Protein Rodent Diet, ENVIGO, España) y agua. Después del periodo de aclimatación durante cinco días, los animales se distribuyeron al azar en dos grupos experimentales, ratas alimentadas con dieta STD (n=16) o ratas alimentadas con dieta cafetería (CAF) (n=32). La dieta STD consistía en pienso y agua mientras que la dieta CAF se componía de dieta CAF fresca además de la dieta STD. La dieta CAF consistía en galletas con paté y galletas con queso, beicon, zanahorias, ensaimada y leche con un 22% de sacarosa. Todos los animales fueron alimentados con alimentos frescos diariamente *ad libitum* durante 5 semanas.



A partir de la quinta semana, a las ratas alimentadas con dieta STD (grupo control) se les dio la misma dieta complementada con leche condensada como vehículo (VH) (n=16). Los animales alimentados con dieta CAF se dividieron en 2 grupos (n=16 en cada uno). Un grupo de ratas se alimentó con dieta CAF suplementada con VH y el otro grupo se alimentó con dieta CAF suplementada con una única dosis de GSPE (25 mg/kg diluido en 1/5 de leche condensada). Ambos tratamientos VH o GSPE fueron administrados por vía oral con una jeringa a los animales diariamente durante 4 semanas a las 8AM (ZT0, al comienzo de la fase de luz) (*Figura 5*). En los tres grupos se registró semanalmente (durante las 9 semanas) los datos sobre el peso corporal y la ingesta total de alimentos de cada animal.

Después de 9 semanas, los animales fueron ayunados durante 3 horas tras la administración de la última dosis, y seguidamente, fueron sacrificados por decapitación en 4 horas diferentes (9AM, 3PM, 9PM y 3AM). De este modo, cada grupo (n=16) se subdividió en 4 grupos en función de las horas de sacrificio (n=4 por cada subgrupo). Cabe destacar que 1 de las 48 ratas murió durante el tratamiento, correspondiente con el grupo CAF+GSPE. Posteriormente, se recogió la sangre y el suero se obtuvo por centrifugación a 2000 g durante 15 minutos a 4°C y se almacenó a -80°C hasta su análisis. Los músculos sóleo y gastrocnemio de cada animal se diseccionaron, pesaron y congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis. Cabe destacar que por problemas durante la extracción de órganos y tejidos no se pudo obtener el músculo sóleo de dos ratas, correspondientes a los grupos STD+VH y CAF+GSPE. Por tanto, el número de ratas fue n=47 para gastrocnemio y n=45 para sóleo. El diseño experimental completo se esquematiza en la *figura 5*. El Comité de Ética Animal de la Universidad Rovira i Virgili (Tarragona, España) aprobó todos los procedimientos realizados por el grupo de NG.

3.3.1. ANÁLISIS DEL SUERO

Para el análisis de la glucosa de todas las ratas a partir del suero obtenido, se utilizó un kit colorimétrico enzimático (QCA, España).

3.4. EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL

La extracción del ARN total se llevó a cabo a partir de los músculos sóleo y gastrocnemio previamente diseccionados por el grupo de NG. En primer lugar, se pesaron entre 65-70 mg de músculo en un eppendorf de 2 mL en la balanza analítica, se añadieron dos bolas metálicas y se mantuvieron las muestras en hielo. A continuación, para extraer el ARN total se agregaron 600 µL del reactivo TRIzolTM (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, España) a cada muestra en la campana de acuerdo con el protocolo del fabricante. Después, tras refrigerar la pieza del



Tissue Lyser LT (Qiagen, España) en hielo se homogenizaron las muestras a potencia máxima (50V) durante 50 segundos, con la ayuda de las bolas metálicas previamente añadidas. Este paso se repitió hasta que el tejido quedó totalmente homogeneizado. Seguidamente, las muestras se centrifugaron a 12.000 g en la centrifuga Z 233 MK-2 (HERMLE LaborTechnik GmbH, Alemania) durante 10 minutos a 4°C.

En segundo lugar, se retiró el sobrenadante a un nuevo eppendorf de 1,5 mL, se añadieron 120 µL de cloroformo (Prolabo®, VWR, España) e inmediatamente se agitó con el vórtex durante 15 segundos. Después, los eppendorf se dejaron durante 5 min en hielo hasta observar dos fases bien diferenciadas. A continuación, se centrifugaron a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C y se retiró la fase acuosa superior a un nuevo eppendorf de 1,5 mL. Después, se agregaron 300 µL de isopropanol (Prolabo®, VWR, España), se agitaron durante 15 segundos manualmente y las muestras se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, las muestras se centrifugaron a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C, seguidamente se descartó el sobrenadante y se preservó el precipitado, el ARN total. A continuación, se agregaron 500 µL de etanol 70% para lavar el precipitado y las muestras se agitaron en vórtex a potencia media con la finalidad de despegar el *pellet*. Luego, las muestras se centrifugaron a 8.000 g durante 5 minutos a 4°C. De nuevo se realizan otras dos veces los pasos anteriores, se descartó el sobrenadante, se agregó 500 µL de etanol 70%, se agitaron en vórtex y se centrifugaron en las mismas condiciones anteriores. Finalmente, se dejó secar completamente el precipitado durante 10 minutos y el ARN total se resuspendió en 40 µL de agua ARNasa *free* (Thermo Fisher Scientific).

A continuación, se realizó la cuantificación y se midió la pureza del ARN total extraído con 1 µL de cada muestra en el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, España). El blanco se realizó con 1 µL de agua ARNasa *free*.

3.4.1. RETROTRANSCRIPCIÓN

El ARN total obtenido de las muestras fue retrotranscrito a ADN complementario (cADN) para llevar a cabo las reacciones cuantitativas en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-qPCRs). Este protocolo se dividió en dos pasos diferentes, el primero era para eliminar todas las posibles trazas de ADN de las muestras de ARN, y el segundo para retrotranscribir el ARN presente en las muestras.

En primer lugar, se obtuvieron los valores de las concentraciones de ARN de las muestras medidas con el NanoDrop. Después, se calculó la cantidad de muestra necesaria para obtener una concentración final de ARN de 100 ng/µL en todas las muestras. Estas fueron diluidas con



el volumen correspondiente de agua libre de nucleasas hasta llegar a un volumen final de 50 μL en un eppendorf de 1,5 mL (*Tabla 1*). Después, se cogieron 10 μL y se añadieron a un eppendorf de 0,5 mL, obteniendo de este modo una concentración de ARN de 50 ng/ μL en cada muestra.

Tabla 1|Ejemplo de cálculo de la cantidad necesaria de ARN y agua libre de nucleasas para obtener 100 ng/ μL de ARN. Se describe un ejemplo de muestra, la concentración de ARN (ng/ μL), μL de ARN para 100 ng/ μL y la cantidad de agua libre de nucleasas necesaria para un volumen total de 50 μL .

Muestra rata (sóleo)	ARN (ng/ μL)	μL muestra para 100 ng/ μL de ARN	μL agua libre de nucleasas (VT= 50 μL)
1	1059,8	4,72	45,3

En segundo lugar, la retrotranscripción se llevó a cabo con el kit de transcripción inversa de cADN de alta capacidad (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, España). La *MasterMix* de la retrotranscripción contenía: agua libre de nucleasas, 10x RT Buffer, 10x RT *Random Primers*, 25x dNTPs Mix y la enzima *MultiScribe Reverse Transcriptase* (50 U/ μL). Se añadieron 10 μL de *MasterMix* a cada una de las muestras presentes en los eppendorf de 0,5 mL. Finalmente, las muestras se incubaron en el *Multigene Thermal Cycler* (Labnet, España) durante 10 minutos a 25°C, luego 120 minutos a 37°C y finalmente 5 minutos a 85°C. Los cálculos de cada uno de los componentes del kit se realizaron acorde con el número de reacciones (muestras) y con un volumen extra para compensar los errores de pipeteo (*Tabla 2*). Por último, las muestras de cADN obtenidas se diluyeron con 80 μL de agua libre de nucleasas para llevar a cabo posteriormente las RT-qPCRs.

Tabla 2|Ejemplo de cálculo de los reactivos necesarios para realizar la retrotranscripción. Se describen los reactivos utilizados que componen la Mix, la cantidad de reactivo por muestra y la cantidad total de la MasterMix.

REACTIVOS (MASTERMIX)	VOLUMEN (μL /muestra)	VOLUMEN TOTAL (μL) (Nº MUESTRAS: 50)
Agua libre de nucleasas	4,2	210
10x RT Buffer	2	100
25x dNTPs Mix	0,8	40
10x RT <i>Random Primers</i>	2	100
<i>MultiScribe Reverse Transcriptase</i>	1	50
VOLUMEN TOTAL	10	500



3.4.2. PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (RT-qPCR)

La RT-qPCR es una técnica que amplifica y detecta el ADN en tiempo real mediante el uso de *primers* específicos y un reportero fluorescente, en este caso se utiliza la sonda SYBR Green. El número de moléculas de ADN amplificadas se puede cuantificar analizando la intensidad de la señal fluorescente.

Los genes estudiados en las RT-qPCRs con el objetivo de evaluar su expresión en condiciones de MetS, son los genes del reloj molecular: BMAL1, CRY1, PER2 y PPIA (*Peptidylprolyl isomerase A*) como gen control endógeno. El cADN estudiado procedía de las 45 muestras de músculo sóleo de los diferentes grupos. Para la preparación de la RT-qPCR, se diseñó una placa de 384 pocillos (Applied biosystems®, ThermoFisher Scientific, EEUU) con los genes y muestras necesarias para el análisis (*Anexo 2*).

En primer lugar, las muestras de cADN y los *primers* fueron mezclados con vórtex. Seguidamente, se preparó la *MasterMix* para cada gen en un eppendorf de 1,5 mL teniendo en cuenta el número de reacciones: se añadieron 2,5 µL de iTaq™ Universal SYBR Green Supermix (Bio-rad, España), 1 µL de agua libre de nucleasas, 0,25 µL de *forward primer* y 0,25 µL de *reverse primer* por reacción. Los *primers* que se utilizaron para amplificar la secuencia diana de cada gen se describen en la *tabla A2* del *anexo 3*. En segundo lugar, se añadieron 1 µL/pocillo de cada muestra de cADN y 4 µL/pocillo de *MasterMix* a la placa de PCR de acuerdo al diseño previo de esta.

A continuación, las placas se cubrieron con cubiertas adhesivas ópticas (Applied biosystems®, ThermoFisher Scientific, EEUU) y las muestras fueron centrifugadas. Por último, se establecieron las condiciones experimentales y se realizó la amplificación cuantitativa de la PCR en el 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied biosystems®, ThermoFisher Scientific, EEUU) durante 2 horas. Tras acabar la RT-qPCR, se realizó el análisis de las curvas de *melting* para cada gen, con la finalidad de comprobar la formación de productos no específicos. Además, se obtuvieron los valores C_T para cada muestra y posteriormente, fueron analizados.

3.5. EXTRACCIÓN PROTEÍNAS

La extracción de proteínas se llevó a cabo a partir de los músculos (tanto sóleo como gastrocnemio) previamente diseccionados por el grupo de NG. Para llevar a cabo la extracción proteica, previamente se preparó el *buffer* de lisis RIPA (*Radio-Immunoprecipitation Assay*) que contenía:



- 25 mL de 100 mM Tris-HCl y 300 mM NaCl
- 5 mL de Tween 10%
- 1,25 mL de Sodium deoxycholate 10% (Sigma-Aldrich, EEUU)
- 18,75 mL de agua miliQ
- pH = 7,4

Después de obtener la solución RIPA, se suplementó con 2 inhibidores de proteasas y 2 de fosfatasa. Los inhibidores se añadieron en las siguientes proporciones por cada mililitro de RIPA: 10 μ L de PMSF (1/100) (*Phenylmethanesulfonyl fluoride, serine protease inhibitor*) (FLUKA, BioChemika, EEUU), 1 μ L de PIC (1/1000) (*Protease inhibitor cocktail*) (Sigma-Aldrich, EEUU), 10 μ L de CIF 2 (1/100) (*Phosphatase Inhibitor Cocktail 2*) (Sigma-Aldrich, EEUU) y 10 μ L de CIF 3 (1/100) (*Phosphatase Inhibitor Cocktail 3*) (Sigma-Aldrich, EEUU). Seguidamente, la mezcla se agitó con el vórtex para homogenizar la solución. Después, se calculó la cantidad necesaria de RIPA e inhibidores en función del número de reacciones (muestras). Cabe destacar que a cada muestra se agregaron 500 μ L de RIPA suplementado y que se preparó una reacción extra para compensar los errores de pipeteo (*Tabla 3*).

Tabla 3| Ejemplo de cálculo de la solución RIPA e inhibidores en función de las proporciones. Se describen el número de muestras, los reactivos utilizados, el volumen por reacción y el volumen total de cada reactivo.

Nº MUESTRAS: 24	REACTIVOS	VOLUMEN (μ L/muestra)	VOLUMEN TOTAL (μ L)
	RIPA	500	12.000
	PMSF (1/100)	5	120
	PIC (1/1000)	0,5	12
	CIF2 (1/100)	5	120
	CIF3 (1/100)	5	120

A continuación, se pesaron entre 50-60 mg de músculo en la balanza analítica y se agregaron 500 μ L de RIPA con inhibidores a cada muestra. Después, las muestras se homogeneizaron con ayuda de dos bolas metálicas en el *Tissue Lyser* a 50V durante 30 segundos (4 veces). Luego, las muestras se incubaron en agitación durante 30 minutos a 4°C. Seguidamente, se recogió el sobrenadante en un nuevo eppendorf y se centrifugó a 20.000 g durante 15 minutos a 4°C. Una vez centrifugadas las muestras se recogió el sobrenadante en tres eppendorf de 0,5 mL, uno para realizar la cuantificación proteica y los otros dos para llevar a cabo los western blot.



3.5.1. CUANTIFICACIÓN PROTEICA

La cuantificación de proteínas se realizó con el *PierceTM BCA Protein Assay Kit* de acuerdo con las instrucciones del proveedor (ThermoFisher Scientific, EEUU). El procedimiento para realizar la cuantificación en una placa de 96 pocillos se dividió en dos pasos.

En el primer paso se preparó una recta patrón de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma-Aldrich, EEUU) con 8 estándares y un blanco. Primero, se vertió una ampolla de BSA de 2 mg/mL a un eppendorf de 1,5 mL y se agregaron 500 μ L de RIPA con inhibidores. A partir de este eppendorf (estándar 1) se realizó un banco de diluciones. Se agregaron 500 μ L de RIPA con inhibidores a otros 8 eppendorf de 1,5 mL y se realizaron diluciones seriadas cogiendo 500 μ L de la dilución anterior. Por último, todos los eppendorf se agitaron con el vórtex.

En el segundo paso se preparó la *MasterMix* sabiendo que el volumen por reacción era de 200 μ L. Se calculó el volumen necesario teniendo en cuenta el número de muestras, estándares y réplicas, además de un volumen extra de reactivo para compensar los errores de pipeteo. A continuación, se mezclaron 50 partes del Reactivo A con 1 parte del Reactivo B. Seguidamente se agregaron en la placa de 96 pocillos: 25 μ L de los estándares y blanco por duplicado y 25 μ L de las muestras por triplicado en cada pocillo (*Anexo 4*). Después, se añadieron 200 μ L de *MasterMix* a cada pocillo y la placa se introdujo en el espectrofotómetro (Synergy HT, BioTek, EEUU). En dicho aparato, se escogió un programa predeterminado que agitó durante 30 segundos e incubó durante 30 minutos a 37°C la placa. Seguidamente, se midió la absorbancia de las muestras en el mismo a 562 nm.

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se presentan como la media más el error estándar de la media (SEM). Los *outliers* fueron determinados mediante *QuickCalcs* de GraphPad. Los datos se analizaron mediante el análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) para determinar las diferencias significativas utilizando el software estadístico SPSS (IBM SPSS Statistics 25, EEUU). Los p-valores estadísticamente significativos se denotaron en las figuras como: *P-valor < 0,05; **P-valor < 0,01; ***P-valor < 0,005 y **** P-valor < 0,001. Los gráficos se realizaron con GraphPad Prism 7.04 (GraphPad Software, EEUU).



4. RESULTADOS

Las ratas alimentadas con dieta CAF han sido descritas como un modelo robusto de MetS humano ^{(1) (32) (33)}. Este modelo experimental proporciona una herramienta excepcional para estudiar la obesidad y el MetS, ambas enfermedades pandémicas entre la población occidental ⁽³²⁾. En efecto, esta dieta induce la hiperfagia voluntaria que resulta en un rápido aumento de peso, debido al alto contenido de grasa y azúcar ^{(29) (33)}. Además, estudios anteriores han determinado que las ratas Fischer 344 son especialmente sensibles a las interrupciones de los ritmos circadianos. Por otro lado, estudios previos del grupo de NG han demostrado que el GSPE es un compuesto efectivo para el tratamiento del MetS ^{(29) (32) (33)}, capaz de revertir los efectos de una HFD, por ello, lo convierte en un objeto de estudio interesante.

4.1. ANÁLISIS DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

4.1.1. PESO CORPORAL

En primer lugar, se validó la dieta cafetería en el modelo experimental utilizado. Como se muestra en la *figura 6A* las ratas alimentadas con dieta STD aumentaron de peso progresivamente durante el transcurso del experimento. Sin embargo, como se esperaba, el aumento de peso corporal en el grupo alimentado con dieta CAF fue significativamente mayor en todas las semanas respecto al grupo control (*Figura 6A*). El peso corporal final de los animales alimentados con dieta CAF fue significativamente mayor que el de los animales alimentados con dieta STD ($209,13 \pm 9,56$ vs $134,29 \pm 8,75$, respectivamente; con **** $p < 0,001$). Tras demostrar la eficacia de la dieta CAF en los animales, se comparan los diferentes tratamientos. La *figura 6B* compara el aumento del peso corporal entre los dos tratamientos, VH o GSPE en ratas alimentadas con dieta CAF. En esta se observa una reducción estadísticamente no significativa del peso corporal de los animales tratados con GSPE, no obstante, hay una pequeña tendencia de reducción a partir de la sexta semana del experimento.

Por otro lado, la *figura 7* muestra el aumento del peso corporal tomando como referencia la semana 5 en la que comienza el tratamiento con VH o GSPE en el grupo con dieta CAF. Se observa como la administración de GSPE diariamente a lo largo de cuatro semanas, genera una tendencia en la reducción del incremento del peso corporal en la séptima y octava semana del experimento ($\#p = 0,055$; $\#p = 0,049$, respectivamente). El peso corporal final de este grupo tratado con GSPE fue menor que el grupo tratado con VH ($65,33 \pm 4,32$ vs $74,38 \pm 3,88$, respectivamente). Cabe destacar que hubo una reducción estadísticamente significativa en el grupo CAF+VH entre el aumento de peso respecto a la semana 1 y en las 4 semanas de



tratamiento ($209,13 \pm 9,56$ vs $74,38 \pm 3,88$, respectivamente; con **** $p < 0,001$). Del mismo modo para el grupo CAF+GSPE ($201,53 \pm 8,94$ vs $65,33 \pm 4,32$, respectivamente; con **** $p < 0,001$).

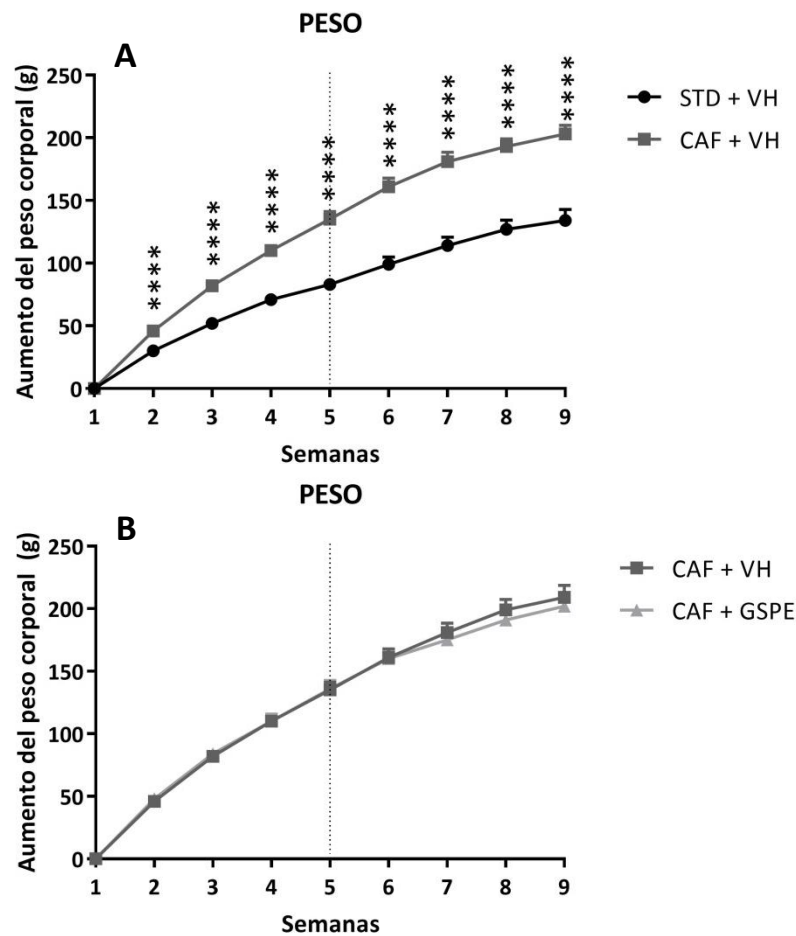


Figura 6|Aumento del peso corporal durante el experimento respecto a la semana 1. En el eje de ordenadas se representa el aumento del peso corporal (g) y en el eje de abscisas las semanas del experimento. A partir de la semana 5 (línea de puntos) se administra a los animales VH o GSPE. **(A)** Comparación entre el grupo con dieta STD y tratamiento VH vs grupo con dieta CAF y tratamiento VH. **(B)** Comparación de tratamientos (VH o GSPE) del grupo con dieta CAF. Los datos se presentan como la media $\pm$ SEM. **** $p < 0,001$

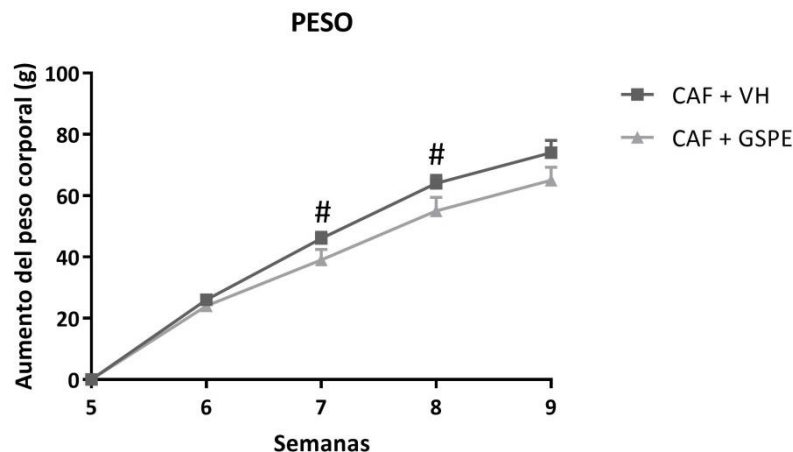


Figura 7| Aumento del peso corporal durante las 4 semanas de tratamiento respecto a la semana 5. En el eje de ordenadas se representa el aumento del peso corporal (g) y en el eje de abscisas las semanas del experimento. Comparación de tratamientos (VH o GSPE) con dieta CAF durante las 4 semanas de tratamiento. Los datos se presentan como la media $\pm$ SEM. #Indica tendencia.

4.1.2. INGESTA DE ALIMENTOS

A lo largo del experimento, la ingesta de alimentos en el grupo con dieta CAF fue significativamente mayor que en el grupo STD (*Figura 8A*), validando de nuevo el modelo experimental utilizado. Sin embargo, no hubo diferencias significativas (a excepción de la semana 4) entre el grupo CAF+VH y el grupo CAF+GSPE (*Figura 8B*). No obstante, se puede observar una pequeña reducción de la ingesta durante la última semana en el grupo CAF+GSPE. Además, independientemente del tratamiento (VH o GSPE), las ingestas totales durante el curso del experimento, fueron significativamente mayores en los grupos alimentados con dieta CAF (*Figura 8*). De forma similar, se encontró que la energía total consumida durante el curso del experimento también fue mayor en todos los grupos CAF. No obstante, el grupo control (*Figura 8A*) no tuvo ningún efecto sobre este parámetro ya que el valor energético permaneció casi constante durante todas las semanas del experimento.

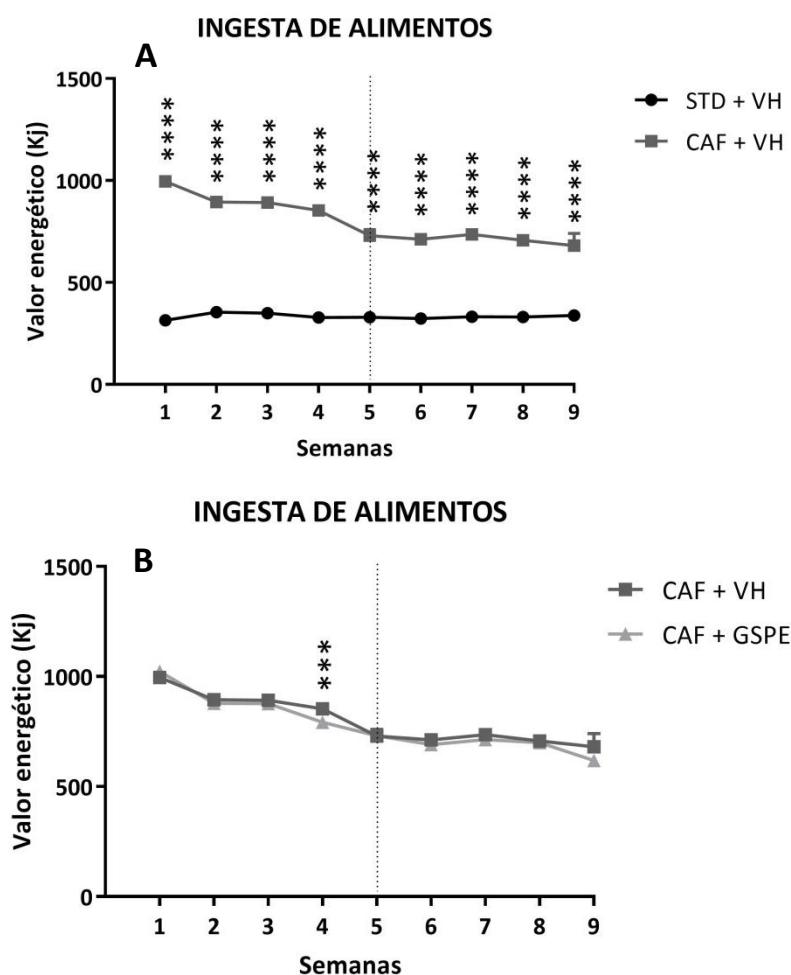


Figura 8|Ingesta total de alimentos durante las semanas del experimento. En el eje de ordenadas se representa el valor energético (Kj) y en el eje de abscisas las semanas del experimento. A partir de la semana 5 (línea de puntos) se tratan a los animales con VH o GSPE. **(A)** Comparación entre el grupo con dieta STD y tratamiento VH vs grupo con dieta CAF y tratamiento VH. **(B)** Comparación de tratamientos (VH o GSPE) del grupo con dieta CAF. Los datos se presentan como la media $\pm$ SEM. **** $p < 0,001$; *** $p < 0,005$

Por otro lado, se comparó la ingesta de alimentos antes y durante las 4 semanas de tratamiento dentro de un mismo grupo. Como se muestra en la *figura 9A* hay una disminución significativa de la ingesta de los animales entre las 5 primeras semanas sin tratamiento y durante las 4 semanas de tratamiento con VH ($872,82 \pm 42,79$ vs $708,59 \pm 11,46$, respectivamente; con $*p<0,05$). Del mismo modo la *figura 9B* muestra la disminución significativa de la ingesta entre las semanas sin tratamiento y las semanas de tratamiento con GSPE ($860,19 \pm 49,15$ vs $680,51 \pm 21,28$, respectivamente; con $*p<0,05$).

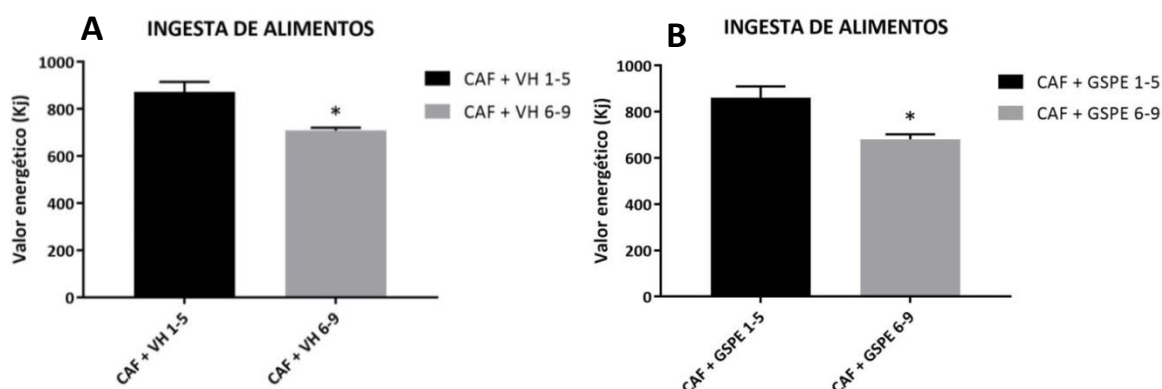


Figura 9|Ingesta total de alimentos antes y durante el tratamiento con VH o GSPE. En el eje de ordenadas se representa el valor energético (Kj) y en el eje de abscisas las semanas del experimento (1-5 o 6-9, sin tratar y tratados, respectivamente). **(A)** Comparación del subgrupo CAF+VH entre las 5 primeras semanas sin tratamiento y las 4 últimas semanas con tratamiento (VH). **(B)** Comparación del subgrupo CAF+GSPE entre las 5 primeras semanas sin tratamiento y las 4 últimas semanas con tratamiento (GSPE). Los datos se presentan como la media $\pm$ SEM. $*p<0,05$

4.1.3. GLUCOSA PLASMÁTICA

Los niveles de glucosa plasmática en ayunas se midieron tras sacrificar a los grupos de animales en cuatro puntos temporales circadianos diferentes. Por un lado, como se muestra en la *figura 10*, los niveles de glucosa en el grupo STD+VH siguen un ritmo diurno, ya que permanecen casi constantes en todos los puntos circadianos a excepción del último (3AM) que disminuye la concentración. Además, se observa como los niveles de glucosa del grupo CAF+VH fueron mucho más elevados que los del grupo control en los puntos temporales de las 3PM, 9PM y 3AM, debido a una hiperglucemia. De hecho, hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos STD+VH y CAF+VH a las 3PM ($p=0,011$), 9PM ($p=0,001$) y 3AM ($p=0,02$). Por otro lado, entre los grupos CAF+VH y CAF+GSPE no se observan diferencias significativas en los niveles de glucosa ($p=0,09$ a las 9PM). No obstante, el suplemento de GSPE en la dieta CAF mejoró los niveles de glucosa en comparación con el grupo CAF+VH a las 9PM. Cabe destacar que, en este punto temporal, el grupo CAF+GSPE alcanza un nivel similar de glucosa al del grupo control. Por lo tanto, la mejora en la glucemia inducida por el GSPE sigue un cierto ritmo circadiano.



En general, se observa que la dieta CAF altera la glucemia a los diferentes tiempos y que el GSPE únicamente es capaz de corregir dicha alteración a las 9PM. Por tanto, esto indica una variación de los efectos beneficiosos del GSPE a lo largo del tiempo post-tratamiento (18-24h). Dicha variación podría estar modulada por la maquinaria circadiana, la cual puede impactar como se ha comentado anteriormente a diferentes niveles como a nivel fisiológico (p.ej. señalización hormonal).

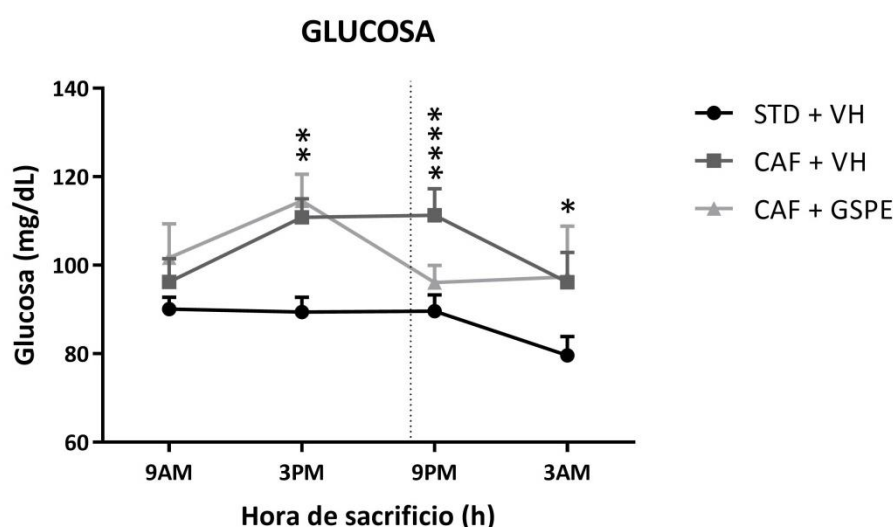


Figura 10|Niveles de glucosa plasmática en ayunas de los animales. En el eje de ordenadas se representa la concentración de glucosa (mg/dL) y en el eje de abscisas las horas de sacrificio (puntos circadianos). Se representan las diferentes dietas (STD o CAF) con sus respectivos tratamientos (VH o GSPE). La línea de puntos indica la separación entre la fase diurna y la fase oscura. Los datos se presentan como la media $\pm$ SEM. *Indica las diferencias significativas entre STD+VH vs CAF+VH: **** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

4.2. EXPRESIÓN GÉNICA Y PROTEICA EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO

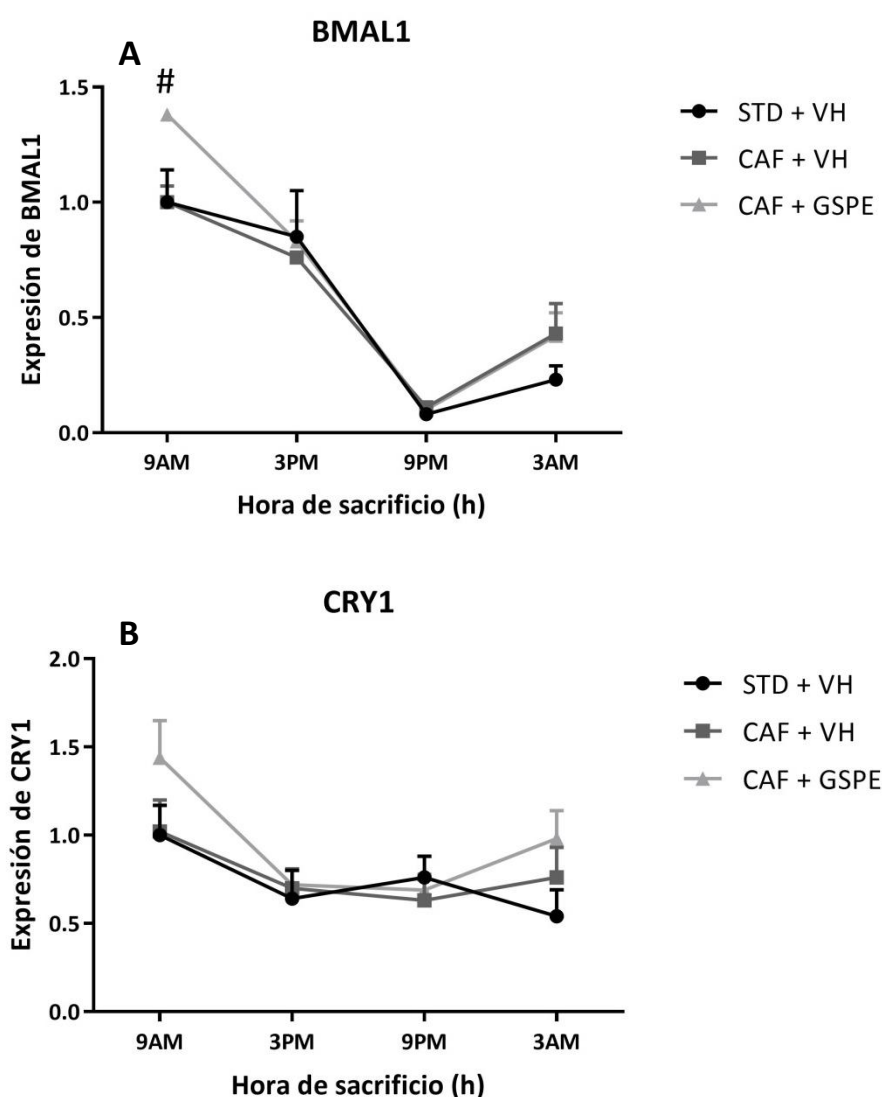
4.2.1. GENES DEL RELOJ CIRCADIANO

En primer lugar, cabe destacar que la expresión de los genes del reloj se iba a estudiar tanto en músculo esquelético sóleo (metabolismo eminentemente oxidativo) como gastrocnemio (metabolismo eminentemente glucolítico) con el objetivo de comparar la expresión entre ambos. No obstante, por falta de tiempo a causa del COVID-19, la expresión génica únicamente se estudió en el músculo sóleo.

Las siguientes gráficas de la *figura 11* muestran la expresión de los genes del reloj (BMAL, CRY1 y PER2) en el músculo sóleo de los diferentes grupos en los cuatro puntos de tiempo analizados. Se observó una expresión rítmica en todos los genes del reloj muscular estudiados del grupo control. La expresión relativa del gen que codifica un regulador positivo (BMAL1) muestra una mínima expresión en la fase nocturna, a las 9PM y 3AM (*Figura 11A*). Mientras que en la fase diurna tiene una mayor expresión (9AM y 3PM). Por el contrario, se observa que

el ritmo de los genes que codifican el regulador negativo (CRY1 y PER2), tienen el máximo de expresión por la noche, a las 9PM, aunque con cierta diferencia entre ambos genes (*Figuras 11B y 11C*). La mínima expresión se produjo en la fase diurna a las 3PM. Como se muestra en la *figura 11*, las expresiones de los genes del reloj se alteraron en varios puntos temporales circadianos en los animales alimentados con dieta CAF. En los genes PER2 y CRY1 (*Figuras 11B y 11C*) se observa una disminución de la expresión a las 9PM y un aumento de la expresión a las 3AM respecto al grupo control. Además, hay diferencias estadísticamente significativas en la expresión de PER2 entre los grupos control y CAF+VH a las 9PM y 3AM ($p=0,009$ y $p=0,00002$, respectivamente). En el gen BMAL1 se observa un incremento de la expresión a las 3AM respecto al grupo control.

Por otro lado, se analizó la expresión circadiana de los genes del reloj en el grupo CAF tratado con GSPE. La *figura 11* muestra cómo los genes se expresaron de manera circadiana. De hecho, el GSPE reguló la alteración de la expresión de los genes debido a la dieta CAF en determinados puntos temporales, sobretudo en el gen PER2 (*Figura 11C*). Hubo diferencias significativas entre los grupos CAF+VH y CAF+GSPE en la expresión de BMAL1 a las 9AM y en PER2 a las 3AM ($p=0,022$ y $p=0,024$, respectivamente).



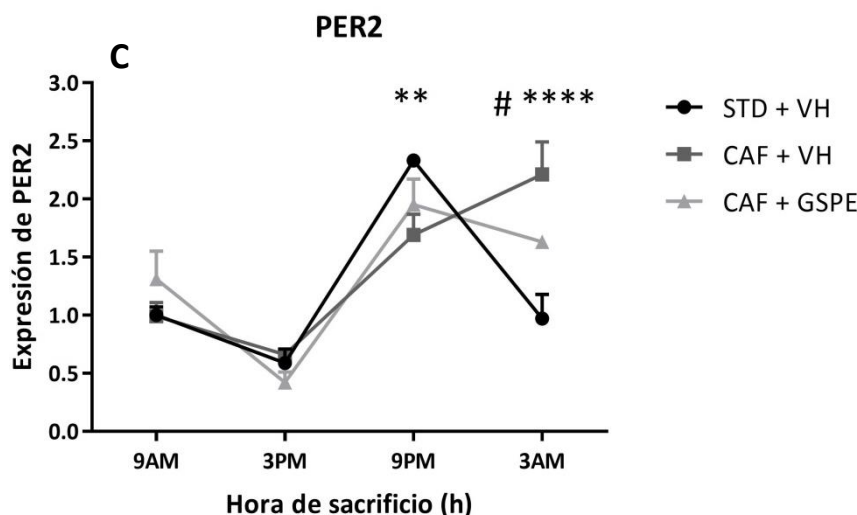


Figura 11|Expresión relativa de los genes del reloj circadiano muscular respecto al punto temporal 9AM. En el eje de ordenadas se representa la expresión relativa y en el eje de abscisas las horas de sacrificio (puntos circadianos). Se representan los diferentes grupos con sus dietas (STD o CAF) y respectivos tratamientos (VH o GSPE) **(A)** Expresión de BMAL1 **(B)** Expresión de CRY1 **(C)** Expresión de PER2. Los datos se presentan como la media $\pm$ SEM. *Indica las diferencias significativas entre STD+VH vs CAF+VH: **** $p<0,001$; ** $p<0,01$. #Indica las diferencias significativas entre CAF+VH vs CAF+GSPE: # $p<0,05$

4.2.2. GENES Y PROTEÍNAS DE LA DINÁMICA MITOCONDRIAL

En este apartado del trabajo no se presentan los resultados experimentales obtenidos ya que no se pudo acceder al laboratorio debido a la situación de emergencia sanitaria por el COVID-19. A partir del material genético y proteico muscular que se obtuvo de los diferentes grupos de animales, se pretendía estudiar mediante RT-qPCR y western blot la expresión diferencial de los genes y proteínas involucrados en la dinámica mitocondrial: DRP1, FIS1, MFN1 y MFN2. Estos experimentos se realizarán en un futuro fuera del contexto de este TFG. A continuación, se presenta la justificación del porque se tenía previsto realizar dichos experimentos. Basándonos en la bibliografía se ha determinado cómo una HFD influye en la dinámica mitocondrial del músculo esquelético y cómo los polifenoles son capaces de modularla. Además, también se ha observado una influencia de los ritmos circadianos en la dinámica mitocondrial.

Determinados estudios han revelado que la disponibilidad de nutrientes y las demandas metabólicas repercuten en la estructura mitocondrial, ya que se ha observado una fragmentación de las mitocondrias del músculo esquelético en modelos obesos de humanos o ratones. Por tanto, este proceso está asociado con un exceso de nutrientes, es decir, con una HFD. Por el contrario, la elongación de las mitocondrias sucede en respuesta a la privación de nutrientes ^{(14) (24) (26)}. En consecuencia, estas evidencias indican que los resultados que se esperarían obtener en este apartado son los siguientes: en condiciones de MetS inducido por una dieta CAF, se esperaría una sobreexpresión de los genes involucrados en la fisión mitocondrial, DRP1 y FIS1 y una represión transcripcional de los genes de fusión, MFN1 y



MFN2. Así pues, en el grupo CAF tratado con GSPE se esperaría encontrar mitocondrias fusionadas, es decir, una mayor expresión de las mitofusinas (MFN1 y MFN2). De este modo, se demostraría el efecto beneficioso del GSPE en la dinámica mitocondrial.

Estudios recientes han evidenciado que los polifenoles en concreto el resveratrol, está asociado con una amplia gama de efectos beneficiosos para la salud a través de la modulación de la dinámica mitocondrial. Dicho compuesto bioactivo atenúa la fisión y estimula la fusión mitocondrial mediante la expresión de la MFN2 en el músculo esquelético de un modelo con diabetes ^{(34) (35)}.

En la misma línea, los resultados esperados de la expresión proteica en el músculo, podrían ser comparables con los obtenidos por *Jheng et al* ⁽²⁴⁾ en el músculo esquelético de un modelo de ratón con obesidad inducida por una HFD (*Figura 12*). Los niveles de las proteínas de fusión (MFN1 y MFN2) no se alteraron en los músculos de estos ratones. No obstante, se observó un incremento significativo de DRP1 y FIS1 (fisión mitocondrial) en la fracción mitocondrial del músculo de estos ratones a las 16 semanas de ser alimentados con una HFD ⁽²⁴⁾.

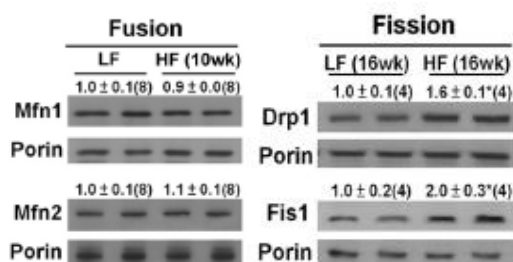


Figura 12|Expresión de proteínas involucradas en la dinámica mitocondrial (fisión/fusión) en el músculo esquelético de ratones alimentados con una LF y HF ⁽²⁴⁾. LF: Low fat diet; HF: High-fat diet.

Por otro lado, *Schmitt et al* ⁽³⁶⁾ demostraron que los procesos de fisión/fusión mitocondrial están fuertemente controlados por el reloj circadiano. En un cultivo de fibroblastos, se observó como la morfología mitocondrial exhibía ritmos circadianos ⁽³⁶⁾. Además, se evidenció que la dinámica mitocondrial en un contexto de HFD, puede oscilar de manera circadiana en el músculo esquelético ^{(12) (14) (36)}.

Visto lo comentado hasta ahora, se ha determinado que una HFD perturba los procesos de fisión/fusión, que los polifenoles presentan efectos beneficiosos a través de la alteración de esta dinámica y la presencia de un ritmo circadiano en la dinámica mitocondrial. En este sentido, se pretendían obtener resultados interesantes con el GSPE, ya que se podría esperar que dicho compuesto bioactivo pudiese ejercer sus efectos terapéuticos a través de la modulación de los procesos de fisión/fusión en un contexto de HFD. Además, se pretendía estudiar si dicha influencia del GSPE podría seguir un patrón circadiano.

4.2.3. PROTEÍNAS DEL METABOLISMO ENERGÉTICO

En este apartado del trabajo no se presentan los resultados experimentales obtenidos ya que no se pudo acceder al laboratorio debido a la crisis sanitaria por el COVID-19. A partir del material proteico muscular que se obtuvo de los diferentes grupos de animales, se tenía previsto realizar western blot de proteínas involucradas en el metabolismo energético: AMPK-p/AMPK total, AKT-p/AKT total, GSK3 β -p/ GSK3 β total (*Phospho-Glycogen synthase kinase 3 beta*). A continuación, se presenta la justificación del porque se pretendía realizar dicho experimento.

La homeostasis metabólica y su adaptación a los cambios nutricionales, está regulada por la activación e inhibición de varias vías de señalización intracelular que involucran determinados genes y proteínas con un papel metabólico clave ⁽¹¹⁾. Dentro de la regulación del metabolismo de la glucosa, lípidos y aminoácidos, y por tanto, en el mantenimiento de la homeostasis de tejidos metabólicos, destacan: AKT y su diana directa GSK3 β y AMPK ^{(11) (15)}. *Xi You-Li et al* ⁽³⁷⁾, demostraron que no había diferencias entre tratamientos (control o HFD) en los niveles totales de AMPK, AKT y GSK3 β del músculo esquelético de un modelo de ratón. Sin embargo, observaron que una HFD provocaba la reducción de la fosforilación de AMPK, AKT y GSK3 β en el músculo esquelético (*Figura 13*). No obstante, como se muestra en la *figura 13*, el compuesto polifenólico baicalina reestableció el estado fosforilado del grupo control ⁽³⁷⁾.

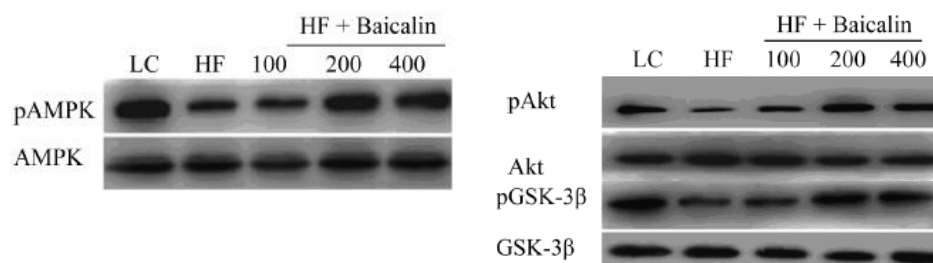


Figura 13|Expresión de proteínas metabólicas en el músculo esquelético de ratones LC y alimentados con una HFD ⁽³⁷⁾. Efecto del compuesto polifenólico baicalina a diferentes concentraciones en la HFD. LC: Control; HF: Alta en grasa.

Por otro lado, se ha observado una ritmicidad circadiana de las proteínas de estudio involucradas en el metabolismo del músculo esquelético, AMPK, Akt y GSK3 β ⁽¹⁵⁾.

En consecuencia, se ha determinado que una HFD modula el metabolismo energético muscular, así mismo, se evidencia que el polifenol baicalina es capaz de revertir las alteraciones producidas por la dieta, y que las proteínas metabólicas musculares presentan una regulación circadiana. Todo ello indica que se esperaba obtener un efecto beneficioso del GSPE en un contexto metabólico de HFD, y que dicho compuesto ejerciera influencia sobre los ritmos circadianos musculares.



5. DISCUSIÓN

Este trabajo está basado en el estudio de los ritmos circadianos en el músculo esquelético y el efecto terapéutico de los polifenoles en un modelo de MetS. Concretamente se centra en analizar un extracto de PACs de semilla de uva.

El MetS caracterizado por un conjunto de desórdenes metabólicos, ha adquirido gran importancia recientemente debido al aumento exponencial de la obesidad en todo el mundo ^{(2) (5)}. El diagnóstico temprano es clave para poder modificar el estilo de vida y los factores de riesgo asociados. No obstante, no existe un único tratamiento contra el MetS. Consecuentemente, se requieren nuevos tratamientos terapéuticos para prevenir y paliar sus efectos. Por ello, se ha determinado que el consumo de compuestos naturales como los polifenoles en la dieta, particularmente el GSPE, constituye una estrategia nutricional eficaz para mejorar la salud de pacientes con MetS.

En este trabajo se demuestra que las ratas alimentadas con una HFD son un modelo representativo del MetS humano, debido a que dicha dieta promueve la hiperfagia voluntaria que resulta en un rápido incremento del peso corporal en comparación con el grupo control. Por tanto, este proyecto demuestra el desarrollo de la hiperfagia y obesidad en los animales alimentados con dieta CAF durante 9 semanas.

Nuestros resultados indican una ganancia de peso corporal significativa entre una dieta STD y CAF. En el grupo CAF+GSPE las pérdidas de peso que se observaron fueron pequeñas, no obstante, estas incrementaron a partir de la sexta semana del experimento. Dicha circunstancia podría deberse tal y como se ha evidenciado en estudios previos del grupo de NG a la dosis administrada de GSPE ^{(29) (32)}. Dichos estudios han determinado la eficacia del GSPE en la disminución del peso corporal de animales alimentados con dieta CAF, así como otros efectos beneficiosos en los componentes del MetS ^{(29) (32)}. Sin embargo, estos utilizaron dosis más altas de GSPE (100 mg/kg ⁽³²⁾, 200 mg/kg ⁽³²⁾ o incluso 500 mg/kg ⁽²⁹⁾) que la que se utilizó en el presente trabajo (25 mg/kg). En consecuencia, pérdidas de peso más elevadas han sido obtenidas por el mismo grupo a dosis más altas, no obstante, más alejadas de lo fisiológico. Por lo tanto, existe una correlación entre la dosis y el efecto beneficioso del GSPE respecto a la pérdida de peso. Por ello, en futuras investigaciones en esta línea, se sugiere aumentar la dosis administrada de GSPE en los animales, ya que se podrían obtener mejores resultados. Sin embargo, se necesitan más estudios para establecer la dosis óptima. Del mismo modo, en líneas futuras se ha de determinar el mejor momento del día para la administración del GSPE



frente a los efectos nocivos de una dieta obesogénica, complementando los resultados obtenidos en este trabajo con los del experimento paralelo adicional (*Anexo 1*).

En lo que respecta al metabolismo glucídico, se ha observado una diferencia importante en los niveles de glucosa del grupo CAF, lo que indica la existencia de una hiperglucemia en dicho grupo debido a la administración de una dieta con alta densidad energética. Esta hiperglucemia ha sido observada por otros autores en modelos de MetS ⁽¹⁵⁾ ⁽²⁹⁾. Además, se ha determinado que los niveles de glucosa plasmática siguen un ritmo diurno. En los modelos de roedores, durante la fase activa y oscura, intermediarios metabólicos como la glucosa se utilizan principalmente para la síntesis y almacenamiento de lípidos, mientras que en la fase inactiva y de luz, la producción de glucosa por el hígado compensa la glucemia durante el ayuno ⁽¹⁵⁾. Este cambio en la utilización de combustible metabólico se refleja en el aumento significativo de la glucemia inducida por la dieta (*Figura 10*) durante la fase inactiva del día. Por otro lado, se obtiene un efecto beneficioso del GSPE a las 9PM, la glucemia disminuye hasta un nivel similar al del grupo control. Dicha diferencia en la glucemia en el punto de las 9PM evidencia que existe cierta ritmicidad, es decir, indica una eficacia diferencial del GSPE a lo largo del tiempo post-tratamiento.

Este efecto beneficioso del GSPE se refuerza con otros estudios en los que se ha identificado como un compuesto con actividad anti-hiperglucémica ⁽²⁸⁾ ⁽³¹⁾. Además, se ha evidenciado el efecto circadiano de la glucosa en función de dicho compuesto polifenólico, lo que se refuerza por *Pinent et al* ⁽³⁸⁾ quienes demostraron que el GSPE está asociado con la restauración rítmica de la glucosa plasmática en ayunas. No obstante, no hay una correspondencia con los genes del reloj muscular estudiados, lo que indica que existen otros mecanismos que regulan estos procesos. Por lo tanto, esta regulación de los efectos beneficiosos del GSPE sobre la glucemia, puede que se esté llevando a cabo a nivel central o en otros órganos como a nivel hepático.

En cuanto a los resultados de la expresión de los genes del reloj circadiano muscular, estudios previos han evidenciado que las HFD provocan una disrupción de la expresión de dichos genes ⁽¹⁶⁾. No obstante, vistos nuestros resultados de expresión de los genes del reloj circadiano en el músculo sóleo, sugieren que la influencia de la dieta CAF sobre los ritmos circadianos no es tan significativa como lo podría ser en otros órganos. Esto se refuerza por los resultados obtenidos por *Ribas-Latre et al* ⁽³⁰⁾, quienes demostraron que la obesidad inducida por la dieta CAF provocó perturbaciones en los genes del reloj, principalmente en el hígado y el intestino. Por tanto, esto indica que tanto el hígado como el intestino son órganos más sensibles que el músculo esquelético a la disrupción de los ritmos circadianos inducida por una dieta CAF.



Cabe destacar que el efecto beneficioso del GSPE a las 9PM en la glucemia, no se puede correlacionar con lo que se ha estudiado a nivel muscular. En consecuencia, otros mecanismos alternativos han de ser responsables de la regulación de estos procesos. No obstante, estudios previos han evidenciado que el GSPE es capaz de modular los relojes periféricos y contrarrestar las perturbaciones inducidas por la dieta CAF en los genes del reloj ⁽²⁸⁾ ⁽³⁰⁾. Por ello, se sugiere que en aquellos órganos más sensibles a la disrupción del reloj molecular por una HFD, como el hígado e intestino, el GSPE tendría un mayor impacto en la modulación de la maquinaria circadiana.

Por tanto, nuestros resultados contribuyen a la idea de que las PACs derivadas de la semilla de uva, compuesto bioactivo natural presente en una gran variedad de alimentos, tienen la capacidad de modular los ritmos circadianos en un estado obeso. Además, estos compuestos polifenólicos desempeñan un papel eficaz como agentes preventivos contra daños inducidos por el MetS.



6. CONCLUSIONES

Tras el estudio de los resultados, las conclusiones que se obtienen son:

1. Se valida el modelo de MetS inducido por una dieta CAF tras los valores obtenidos del peso corporal e ingesta de alimentos de los animales.
2. A la dosis estudiada de GSPE (25 mg/kg) se observa una pequeña tendencia de pérdida de peso a partir de la sexta semana del experimento tras la administración del tratamiento.
3. Existe una diferencia en la glucemia entre el grupo control y CAF, destacando la hiperglucemia en este último.
4. El efecto beneficioso del GSPE varía en función del tiempo post-tratamiento, ya que únicamente corrige la glucemia del grupo CAF a las 9PM. Por tanto, el GSPE sigue un cierto ritmo circadiano.
5. El músculo esquelético sóleo muestra mayor resistencia que otros órganos a la disrupción del reloj circadiano por una HFD.

Por último, cabe destacar que no hay una correlación entre los efectos obtenidos a nivel plasmático con los efectos moleculares a nivel muscular estudiados. Por lo tanto, otros mecanismos alternativos a los genes del reloj a nivel muscular, podrían ser responsables de la disminución de la glucemia a las 9PM como consecuencia del tratamiento con GSPE.



7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Guirro, M., Gual-Grau, A., Gibert-Ramos, A., Alcaide-Hidalgo, J. M., Canela, N., Arola, L., & Mayneris-Perxachs, J. (2020). Metabolomics elucidates dose-dependent molecular beneficial effects of hesperidin supplementation in rats fed an obesogenic diet. *Antioxidants*, 9(1), 1–19. <https://doi.org/10.3390/antiox9010079>
- [2] Kaur, J. (2014). A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiology Research and Practice*, 2014, 943162. <https://doi.org/10.1155/2014/943162>
- [3] O'Neill, S., & O'Driscoll, L. (2015). Metabolic syndrome: A closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obesity Reviews*, 16(1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/obr.12229>
- [4] Priest, C., & Tontonoz, P. (2019). Inter-organ cross-talk in metabolic syndrome. *Nature Metabolism*, 1(12), 1177–1188. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0145-5>
- [5] Engin, A. (2017). The definition and prevalence of obesity and metabolic syndrome. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 960, 1–17. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_1
- [6] Rochlani, Y., Pothineni, N. V., Kovelamudi, S., & Mehta, J. L. (2017). Metabolic syndrome: Pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*, 11(8), 215–225. <https://doi.org/10.1177/1753944717711379>
- [7] Saklayen, M. G. (2018). The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Current Hypertension Reports*, 20(2), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11906-018-0812-z>
- [8] Palacios, H. Thesis, D. (2019). Metabolomics strategy to comprehend the interactions between circadian rhythms and flavanol activity on the hepatic metabolism.
- [9] Amiot, M. J., Riva, C., & Vinet, A. (2016). Effects of dietary polyphenols on metabolic syndrome features in humans: A systematic review. *Obesity Reviews*, 17(7), 573–586. <https://doi.org/10.1111/obr.12409>
- [10] Harfmann, B. D., Schroder, E. A., & Esser, K. A. (2015). Circadian rhythms, the molecular clock, and skeletal muscle. *Journal of Biological Rhythms*, 30(2), 84–94. <https://doi.org/10.1177/0748730414561638>
- [11] Mariné, R. Thesis, D. (2018). Physiological and metabolic adaptations to different photoperiods: effects of obesity and seasonal fruit consumption.
- [12] Gabriel, B. M., & Zierath, J. R. (2019). Circadian rhythms and exercise — re-setting the clock in metabolic disease. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(4), 197–206. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0150-x>



- [13] Mayeuf-Louchart, A., Staels, B., & Duez, H. (2015). Skeletal muscle functions around the clock. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 17 Suppl 1, 39–46. <https://doi.org/10.1111/dom.12517>
- [14] Puig, L. S., Valera-Alberni, M., Cantó, C., & Pilon, N. J. (2018). Circadian rhythms and mitochondria: Connecting the dots. *Frontiers in Genetics*, 9, 452. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00452>
- [15] Basse, A. L., Dalbram, E., Larsson, L., Gerhart-Hines, Z., Zierath, J. R., & Treebak, J. T. (2018). Skeletal muscle insulin sensitivity show circadian rhythmicity which is independent of exercise training status. *Frontiers in Physiology*, 9, 1198. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01198>
- [16] Andrich, D. E., Ou, Y., Melbouci, L., Leduc-Gaudet, J. P., Auclair, N., Mercier, J., ... St-Pierre, D. H. (2018). Altered lipid metabolism impairs skeletal muscle force in young rats submitted to a short-term high-fat diet. *Frontiers in Physiology*, 9, 1327. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01327>
- [17] Kjøbsted, R., Hingst, J. R., Fentz, J., Foretz, M., Sanz, M. N., Pehmøller, C., ... Lantier, L. (2018). AMPK in skeletal muscle function and metabolism. *FASEB Journal*, 32(4), 1741–1777. <https://doi.org/10.1096/fj.201700442R>
- [18] Mi, Y., Qi, G., Fan, R., Ji, X., Liu, Z., & Liu, X. (2017). EGCG ameliorates diet-induced metabolic syndrome associating with the circadian clock. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1863(6), 1575–1589. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2017.04.009>
- [19] Sun, L., Wang, Y., Song, Y., Cheng, X. R., Xia, S., Rahman, M. R. T., ... Le, G. (2015). Resveratrol restores the circadian rhythmic disorder of lipid metabolism induced by high-fat diet in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 458(1), 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.072>
- [20] De Goede, P., Wefers, J., Brombacher, E. C., Schrauwen, P., & Kalsbeek, A. (2018). Circadian rhythms in mitochondrial respiration. *Journal of Molecular Endocrinology*, 60(3), R115–R130. <https://doi.org/10.1530/JME-17-0196>
- [21] Stenvers, D. J., Scheer, F. A. J. L., Schrauwen, P., la Fleur, S. E., & Kalsbeek, A. (2019). Circadian clocks and insulin resistance. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(2), 75–89. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0122-1>
- [22] 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), 20120465. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0465>



- [23] Kiehn, J. T., Tsang, A. H., Heyde, I., Leinweber, B., Kolbe, I., Leliavski, A., & Oster, H. (2017). Circadian rhythms in adipose tissue physiology. *Comprehensive Physiology*, 7(2), 383–427. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160017>
- [24] Jheng, H.-F., Tsai, P.-J., Guo, S.-M., Kuo, L.-H., Chang, C.-S., Su, I.-J., ... Tsai, Y.-S. (2012). Mitochondrial Fission Contributes to Mitochondrial Dysfunction and Insulin Resistance in Skeletal Muscle. *Molecular and Cellular Biology*, 32(2), 309–319. <https://doi.org/10.1128/mcb.05603-11>
- [25] Lima, A. R., Santos, L., Correia, M., Soares, P., Sobrinho-Simões, M., Melo, M., & Máximo, V. (2018). Dynamin-related protein 1 at the crossroads of cancer. *Genes*, 9(2), 115. <https://doi.org/10.3390/genes9020115>
- [26] Liesa, M., & Shrihail, O. S. (2013). Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metabolism*, 17(4), 491–506. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.03.002>
- [27] Chiva-Blanch, G., & Badimon, L. (2017). Effects of Polyphenol Intake on Metabolic Syndrome: Current Evidences from Human Trials. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 5812401. <https://doi.org/10.1155/2017/5812401>
- [28] 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>
- [29] 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>
- [30] Ribas-Latre, A., Baselga-Escudero, L., Casanova, E., Arola-Arnal, A., Salvadó, M. J., Arola, L., & Bladé, C. (2015). Chronic consumption of dietary proanthocyanidins modulates peripheral clocks in healthy and obese rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(2), 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.09.006>
- [31] 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>
- [32] 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>



- [33] Pons, Z., Margalef, M., Bravo, F. I., Arola-Arnal, A., & Muguerza, B. (2016). Acute administration of single oral dose of grape seed polyphenols restores blood pressure in a rat model of metabolic syndrome: role of nitric oxide and prostacyclin. *European Journal of Nutrition*, 55(2), 749–758. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-0895-0>
- [34] Wang, D., Sun, H., Song, G., Yang, Y., Zou, X., Han, P., & Li, S. (2018). Resveratrol Improves Muscle Atrophy by Modulating Mitochondrial Quality Control in STZ-Induced Diabetic Mice. *Molecular Nutrition and Food Research*, 62(9), 1–11. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700941>
- [35] Robb, E. L., Moradi, F., Maddalena, L. A., Valente, A., Fonseca, J., & Stuart, J. A. (2017). Resveratrol stimulates mitochondrial fusion by a mechanism requiring mitofusin-2. *Biochemical and biophysical research communications*, 485(2), 249–254. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.02.102>
- [36] Schmitt, K., Grimm, A., Dallmann, R., Oettinghaus, B., Restelli, L. M., Witzig, M., ... Eckert, A. (2018). Circadian Control of DRP1 Activity Regulates Mitochondrial Dynamics and Bioenergetics. *Cell Metabolism*, 27(3), 657–666.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.01.011>
- [37] Xi, Y. L., Li, H. X., Chen, C., Liu, Y. Q., Lv, H. M., Dong, S. Q., ... Liu, H. (2016). Baicalin attenuates high fat diet-induced insulin resistance and ectopic fat storage in skeletal muscle, through modulating the protein kinase B/Glycogen synthase kinase 3 beta pathway. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 14(1), 48–55. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1009.2016.00048>
- [38] Pinent, M., Cedó, L., Montagut, G., Blay, M., & Ardévol, A. (2012). Procyanidins Improve some Disrupted Glucose Homoeostatic Situations: An Analysis of Doses and Treatments According to Different Animal Models. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(7), 569–584. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.501533>



8. AUTOEVALUACIÓN

Formar parte de una de las líneas de investigación del grupo de NG para realizar prácticas extracurriculares, ha sido una experiencia muy gratificante. Dicha estancia me ha permitido principalmente desarrollar este trabajo de fin de grado, así como adentrarme un poco más en el mundo de la ciencia y concretamente en la rama de nutrición.

Por un lado, realizar este trabajo me ha permitido aplicar numerosos conocimientos teóricos y prácticos aprendidos a lo largo de la carrera. Durante este tiempo he aprendido diferentes técnicas de laboratorio como la extracción proteica y de ARN. Además, he reforzado la capacidad de interpretación de los resultados. Por otro lado, gracias a estas prácticas he podido ampliar mis conocimientos sobre los ritmos circadianos y el MetS, tema principal del grupo de investigación. Asimismo, esta estancia me ha ayudado a decidir en qué rama de estudio quiero centrarme en un futuro.

Por último, la realización de este trabajo ha sido muy positiva para mí, ya que me ha ayudado a crecer tanto personal como profesionalmente, así como adquirir las habilidades y la capacidad para desenvolverse ante determinadas circunstancias de manera responsable e independiente.



9. ANEXOS

ANEXO 1: PERSPECTIVAS FUTURAS

Cabe destacar que se realizó un experimento paralelo adicional al desarrollado en este trabajo en el cual la dosis de tratamiento fue administrada a los animales (n=48) a las 8PM (Z12, al comienzo de la fase de oscuridad). Durante la estancia de prácticas se realizó tanto el análisis de los parámetros bioquímicos como las extracciones de ARN total correspondientes a los músculos de estos animales (sóleo y gastrocnemio). No obstante, por tiempo y capacidad únicamente se llevó a cabo el análisis de las ratas con tratamiento a las 8AM. Posteriormente, el grupo realizará el resto de experimentos.

ANEXO 2: DISTRIBUCIÓN DE LA PLACA 384 PARA REALIZAR LA RT-qPCR

Tabla A1|Ejemplo de distribución de la RT-qPCR en una placa de 384 pocillos. Las muestras se añadieron en vertical por duplicado. Los primers se añadieron en horizontal: PPIA se representa en rojo, BMAL1 en verde, CRY1 en azul y PER2 en naranja. B: Blanco.

1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10	11	11	12	12
13	13	14	14	15	15	B	B	17	17	18	18	19	19	20	20	21	21	22	22	23	23	24	24
25	25	26	26	27	27	28	28	29	29	30	30	31	31	32	32	33	33	34	34	35	35	36	36
37	37	38	38	39	39	41	41	42	42	43	43	44	44	45	45	46	46	47	47				
1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10	11	11	12	12
13	13	14	14	15	15	B	B	17	17	18	18	19	19	20	20	21	21	22	22	23	23	24	24
25	25	26	26	27	27	28	28	29	29	30	30	31	31	32	32	33	33	34	34	35	35	36	36
37	37	38	38	39	39	41	41	42	42	43	43	44	44	45	45	46	46	47	47				
1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10	11	11	12	12
13	13	14	14	15	15	B	B	17	17	18	18	19	19	20	20	21	21	22	22	23	23	24	24
25	25	26	26	27	27	28	28	29	29	30	30	31	31	32	32	33	33	34	34	35	35	36	36
37	37	38	38	39	39	41	41	42	42	43	43	44	44	45	45	46	46	47	47				
1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10	11	11	12	12
13	13	14	14	15	15	B	B	17	17	18	18	19	19	20	20	21	21	22	22	23	23	24	24
25	25	26	26	27	27	28	28	29	29	30	30	31	31	32	32	33	33	34	34	35	35	36	36
37	37	38	38	39	39	41	41	42	42	43	43	44	44	45	45	46	46	47	47				



ANEXO 3: PRIMERS UTILIZADOS PARA REALIZAR LA RT-qPCR

Tabla A2/ Secuencias de nucleótidos de los primers utilizados en la RT-qPCR. Se describe el nombre de los primers, su secuencia de 5' a 3' y el proveedor. Rev: reverse; For; forward.

PRIMERS	SECUENCIA (5' a 3')	PROVEEDOR
BMAL1-rev	CTTGTCTGTAAACTTGCCTGTGAC	(Biomers, Alemania)
BMAL1-for	GTAGATCAGAGGGCGACGGCTA	(Biomers, Alemania)
CRY1-rev	TCCAGGAGAACCTCCTCACG	(Biomers, Alemania)
CRY1-for	TGGAAGGTATGCGTGTCTC	(Biomers, Alemania)
PER2-rev	AGGATCCAAGAACGGCACAG	(Biomers, Alemania)
PER2-for	CGGACCTGGCTTCAGTTCAT	(Biomers, Alemania)
PPIA-rev	ATTCCTGGACCCAAAACGCT	(Biomers, Alemania)
PPIA-for	CCAAACACAAATGGTTCCCAGT	(Biomers, Alemania)

ANEXO 4: DISTRIBUCIÓN DE LA PLACA DE 96 PARA EL ENSAYO DE BCA

Tabla A3/Ejemplo de distribución en la placa de 96 pocillos para la cuantificación proteica. Las dos primeras columnas corresponden a los estándares por duplicado. Las muestras (1-24) están por triplicado en el resto de pocillos. B: Blanco.

St1	St1	1	1	1	2	2	2	3	3	3	
St2	St2	4	4	4	5	5	5	6	6	6	
St3	St3	7	7	7	8	8	8	9	9	9	
St4	St4	10	10	10	11	11	11	12	12	12	
St5	St5	13	13	13	14	14	14	15	15	15	
St6	St6	16	16	16	17	17	17	18	18	18	
St7	St7	19	19	19	20	20	20	21	21	21	B
St8	St8	22	22	22	23	23	23	24	24	24	B