



# UNIVERSIDAD DE MURCIA

## FACULTAD DE MEDICINA

Aspectos Cronobiológicos del Tejido Adiposo  
Humano *In Vitro*

**Dña. María Paz Carrasco Benso**  
**2017**



Memoria presentada por la  
Lda. D<sup>a</sup> María Paz Carrasco Benso  
para optar al GRADO DE DOCTOR por la  
Universidad de Murcia, 2017.

Esta tesis doctoral ha sido dirigida por:

Dra. MARTA GARAULET AZA  
Catedrática de Fisiología.  
Departamento de Fisiología.  
Universidad de Murcia, Murcia. España.



A Jose Antonio y Norberta, el mejor padre  
y la mejor tita que podía tener.



## **AGRADECIMIENTOS**

Esta tesis doctoral nunca habría empezado de no ser por ella. Agradecer en primer lugar a la persona que realmente ha hecho posible todo esto, a mi directora de tesis, la Dra. Marta Garaulet. Alguien muy especial, que ha hecho realidad mi sueño de ser investigadora. Esta tesis doctoral no ha sido un camino fácil para ninguna de las dos, pero su capacidad de trabajo, su perseverancia, su manera de transmitir la ilusión, de hacer que el lema “no hay nada imposible” sea un modo de vida ante cada obstáculo en el camino, nos ha permitido llegar hoy hasta aquí. Agradezco tu confianza en mí, y el dejarme formar parte de este equipo tan especial que has logrado conseguir.

Sobre todo, Marta, gracias a ti ha sido posible conocer a tantas y tantas personas que han aportado mucho a mi vida como investigadora, pero sobre todo, como persona. Espero no olvidar a nadie.

Siguiendo un poco el orden cronológico, (que no cronobiológico, aún) me gustaría dar las gracias a Jose Carlos Rodríguez Rey, por abrirme las puertas de su laboratorio en la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria, y hacerme sentir como si fuera el mío propio durante un mes. Agradecer también que me presentara a su equipo: Javi, Fonso o Carmen, sin olvidar a las demás chicas de la sala: Lucía y “la Maña”. Javi, contigo experimenté los primeros sin sabores que la ciencia a veces da, pero también las primeras alegrías. Gracias por iniciarme en el bonito mundo del cultivo de células.

A todo el servicio de cirugía general del Hospital Virgen de la Arrixaca, que ha formado parte de esta experiencia. Gracias por acoger a “la chica de la grasa”. En especial y particularmente al Doctor Luján, sin su ayuda no habría sido posible realizar

esta tesis doctoral sobre el tejido adiposo en humanos. Gracias por estar siempre que te hemos necesitado.

Al personal de admisión: especialmente a Alfonso, gracias por la alegría que transmites, por cada palabra de ánimo, y por todos los consejos dados que no tenías por qué dar. Sin embargo, ya es tarde para reclamarlos, me quedo con todos. Gracias también a las chicas, qué paciencia tienen contigo, pero a cambio saben que no pueden tener mejor compañero de trabajo.

A todas las personas de quirófano. A las enfermeras Toñi, Pilar, Ana M<sup>a</sup>, M<sup>a</sup> José y todas aquellas que hacían mi estancia allí tan agradable. Gracias también a las Dras M<sup>a</sup>Dolores Frutos, cariñosamente conocida como Coco, y Quiteria Hernández, conocida como Quite. Gracias a todos por ese último ratito dedicado en el quirófano para que yo pudiera irme al laboratorio con mis muestras de tejido adiposo, las que dan sentido a esta tesis.

Agradecer llegados a este punto, a los pacientes que desinteresadamente han participado en los estudios llevados a cabo. De todos ellos me llevaba algo nuevo que contar a casa cada miércoles. Me han hecho sentir que ese “ratito” servía para algo más que para conseguir los datos de la investigación, que tan valiosos han sido. Esas tardes nos hacíamos mutua compañía.

A toda la plantilla del Servicio de apoyo a la investigación de la Universidad de Murcia, al SACE. Aunque me resulta muy difícil resumir lo que han significado para mí durante este camino hacia la tesis. A Juana, por ser para mí algo más que una de las personas responsables del SACE. A Toñi, Pepe y Pilar por vuestra ayuda prestada en el laboratorio y el conocimiento transmitido, siempre acompañado de cariño. A Vero, M<sup>a</sup> Ángeles, Azucena y mis Lauris, ¿cuántas pipetas habréis sellado en estos 4 años en total

para mis experimentos? Gracias no sólo por todo eso. Así como a los usuarios con los que he compartido experiencias que sólo nosotros entenderemos, cómo olvidarme de vosotros.

A Olga Martínez, por ofrecernos sus conocimientos y la experiencia con los western blot. A Belén, porque sin ella, el trabajo habría sido mucho más difícil de conseguir y porque nunca ha desistido en su empeño para hacer que todo saliera bien. A Andrea, por continuar con las muestras cuando Belén no pudo hacerlo. Gracias también Belén, por aquellos días que pasé en vuestro laboratorio de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada.

A Juan Antonio Madrid, la persona que nos enseñó un poquito más a entender la Cronobiología, ciencia clave en mi trabajo de investigación.

A Toni Díez Noguera, por enseñarnos a usar un poco mejor el programa de cronobiología que ellos mismos diseñaron. Sin esos conocimientos el trabajo tampoco habría sido el mismo. Y además, nos permitió colaborar con María Jesús Moreno Aliaga y su doctorando Miguel Yoldi, siempre tan atento y agradecido. Un placer compartir ciencia con vosotros.

Agradecer especialmente a Frank Scheer, profesor en Harvard, por hacer junto a Marta, grandes los resultados de un trabajo tan largo, que llevaba detrás la implicación de tantas personas y que tan duro fue de conseguir. De él me llevo algo más. Lo admiración que le tengo como profesional, por su meticulosidad, y sobre todo, por ser un perfecto curioso (la cualidad de todo gran investigador). Gracias por tu amabilidad, tu humildad, y tu sonrisa siempre sincera hacia nosotros. Thank you always Frank!

Debo agradecer también a los demás profesores del dpto.: Elvira, Jose Ángel, Javier Martínez, Javier Sánchez, Francisca Pérez (Paquita), Salvador Zamora, Pilar Mendiola y Jorge de Costa, por los momentos compartidos y el cariño mostrado.

A mis compañeros de equipo, mi verdadera familia científica: Bea, Nuria, Vero, Cristina, gracias por todo tipo de momentos compartidos, de risas, llantos, bailes, y alegrías, pero sobre todo por el apoyo tan grande que he recibido a diario. Desde hace muy poquito sois también ya parte del equipo, Álvaro, Uri, Nieves, Patricia (se te echaba de menos) y Teresa, sois todos los mejores. JUNTOS SOMOS UN EQUIPAZO, OS QUIERO Y REQUIERO!!

Puri y Jesús, no me había olvidado de vosotros. También formáis parte del EQUIPAZO, pero os tenía que poner a parte, porque sin vosotros, esto no sería hoy una realidad. Gracias, gracias y GRACIAS. Gran parte de mi trabajo es vuestro. Sin vosotros no habría ganado ese premio tan bonito en Santiago de Compostela. Puri, de ti heredé el legado de investigar los aspectos moleculares del tejido adiposo, pero sobre todo, agradezco que hayas estado siempre (especialmente estas últimas semanas), y sé que no lo has hecho sólo porque somos casi de la familia, lo has hecho porque eres así, magnífica por dentro y por fuera, imparabile, una crack de la vida. Has sido imprescindible para mí aquí y te adoro.

Jesús, como tú bien dices, mi “hermanico”, porque yo también lo siento así. Tú y yo hemos ido de la mano casi desde el día 1, y vamos a llegar juntos a la meta. Tengo que agradecer a Marta que te mandara al laboratorio conmigo esas noches eternas, que, aunque no te lo creas, ahora recuerdo con nostalgia. Gracias por haber hecho de mis experimentos los tuyos y por integrarme en tu grupo de tus amigos.

A mis compañeros del dpto: Antonio, gracias por todo. No he podido tener un mejor compi de sala. También a María, Domingo, y ahora de nuevo María Sánchez, así como los chicos de las salas vecinas, Dani, Juan Fernando, Jose Fernando y Oli gracias por tantos y tantos raticos compartidos.

Recuerdo ahora también el apoyo recibido por nuestras compañeras extranjeras, especialmente Gloria, mi italiana favorita, gracias por tus consejos y tus palabras de ánimo, siempre. A Isa, desde Alemania, extrañamente alegre para ser de allí, agradecer no sólo tu alegría, sino tu aportación, tan importante para esta tesis y para los experimentos en el futuro.

A mis compis de la carrera de Biología, gracias por seguir ahí y tener siempre una palabra de ánimo: Blanca, Juanjo, Santi, Rafa, Pablo, Edu, Vero, Pedro. A mis chicas: Ana, Débora, Vero, M<sup>a</sup>Ángeles, Loli. Especialmente a Jonatan, gracias por escucharme siempre, te ha tocado ser los oídos que representaban al grupo durante las horas del café y la comida estos últimos años. Mar, tú nunca has dudado que algún día lo lograría. Has sido el Pepito Grillo que más ha repetido la palabra doctora junto a mi nombre, pues mira, ahora ya estamos más cerca. Gracias por estar siempre ahí.

A mis amigas, las de siempre, mi mejor medicina para celebrar las alegrías, pero sobre todo, para celebrar y festejar también los malos momentos. Os quiero.

María Dolores y Estefanía, simplemente gracias.

Mencionar llegados a este punto especialmente a Francisco, gracias por preocuparte, por el apoyo y los consejos que, aunque llegaron hace muy poquito, han sido muy útiles para mí.

A Pedro, gracias por aparecer en mi vida justo a tiempo, cuando más falta me hacías y además, porque lo estás haciendo genial. Gracias por tu apoyo y los empujones para seguir siempre adelante.

Por último, y no precisamente por ser menos importantes en la consecución de este gran objetivo, un enorme G R A C I A S a mi familia, a todos vosotros, gracias por estar siempre. A mis tíos, siempre atentos a todo lo que he necesitado. Gracias por el apoyo incondicional. Antonia que, aunque no es familia directa, es una persona muy importante en mi vida, pues me ha cuidado y querido como nadie, sin tener necesidad de hacerlo, todo esto también es por ti. A Josete, mi hermano, gracias porque sé que te preocupas por mí siempre, y tratas de protegerme. Que sepas que me he salvado gracias a tus platos de comida, eres el mejor hermano-cocinero del mundo.

Y por fin, a la persona a quien realmente va dedicada esta tesis. A mi padre, mi amigo, mi calma, mi paz, la persona que con palabras todo lo cura. Porque primero te has esforzado tú en conseguir que hoy sea la persona que soy. Por enseñarme a ser paciente, constante, responsable, y sobre todo por confiar en mí por encima de todo. Gracias por ser el mejor padre del mundo. GRACIAS!

# ÍNDICE

---



<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>13</b>
<b>ANTECEDENTES (BACKGROUND)</b> .....	<b>17</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>19</b>
1. Cronobiología.....	21
El sistema circadiano y el reloj central.....	21
Los relojes periféricos .....	23
Genes reloj en el tejido adiposo de modelos de experimentación animal .....	24
El tejido adiposo humano, un tejido periférico con ritmos circadianos endógenos .....	25
2 Métodos de estudio de los ritmos circadianos en el tejido adiposo.....	29
A) Análisis de un solo punto en biopsias de TA .....	30
B) Cultivo de biopsias realizadas en un solo punto (explantes de TA).....	31
C) Realizar biopsias en serie .....	32
D) Cultivos celulares y análisis a tiempo real de la expresión génica.....	34
3 El tejido adiposo humano y sensibilidad a la insulina.....	37
El tejido adiposo humano .....	37
Fisiopatologías asociadas al exceso de tejido adiposo humano .....	41
Acción de la insulina en el tejido adiposo .....	42
Sensibilidad a la insulina.....	43
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	<b>45</b>
Situación actual y objetivo general .....	47
Objetivos específicos .....	49
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>51</b>
1 Cultivo celular, diferenciación y tratamientos .....	54
Establecimiento del Cultivo Primario .....	54
Caracterización de adipocitos (análisis histológico) .....	55
Sincronización del cultivo .....	56
2 Estudio de la expresión de genes reloj .....	57
Extracción de ARN .....	57
Tratamiento con ADNasa.....	57
Retrotranscripción y PCR cuantitativa a tiempo real .....	58
3 Análisis de los ritmos circadianos.....	59
4 Muestras de tejido adiposo.....	61
PROTOCOLO COMÚN DE LOS DOS OBJETIVOS .....	61
Obtención de muestras .....	61

## Índice

Establecimiento del cultivo in vitro.....	61
PROCOLO ESPECÍFICO DEL OBJETIVO 2.....	62
5. Aislamiento, cultivo y sincronización de adipocitos del tejido adiposo humano.....	62
Sincronización de los adipocitos .....	63
6 Ensayo de la luciferasa.....	63
Generación de lentivirus.....	64
Transducción de los adipocitos .....	65
Registro de la bioluminiscencia .....	66
PROCOLO ESPECÍFICO DEL OBJETIVO 3.....	66
7 Cultivo y sincronización de explantes del tejido adiposo .....	66
Protocolo para el estudio de ritmos circadianos de la sensibilidad a insulina.....	67
8 Análisis de la señalización de la insulina .....	68
Experimento de exposición a insulina.....	69
Análisis de la acción de la insulina en el TA humano.....	71
Análisis de proteínas mediante la técnica de western blot .....	72
Densitometría .....	74
9 Población de estudio de los objetivos 2 y 3.....	74
Selección de los sujetos participantes en el estudio .....	74
Estudio antropométrico y evaluación de la obesidad .....	75
Características del síndrome metabólico.....	79
10 Historia clínica y aspectos cronobiológicos de cada sujeto.....	81
Cuestionarios.....	81
11 Estadística .....	83
Ritmos circadianos en una línea celular primaria de adipocitos (PT-5020).....	83
Ritmos circadianos en adipocitos primarios del TA humano.....	83
Ritmos circadianos en la acción de una hormona en explantes de TA humano.....	83
12 Estudio bibliográfico.....	85
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>87</b>
1. Análisis de la presencia de ritmos circadianos en una línea celular primaria comercial de adipocitos humanos.....	89
2. Aplicación de la técnica de bioluminiscencia para evaluar los ritmos circadianos de adipocitos y preadipocitos primarios del tejido adiposo humano, subcutáneo y visceral .....	95
3. Estudio de la presencia en el tejido adiposo humano de ritmos circadianos para la sensibilidad a la insulina .....	103
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>113</b>
1 Sobre la existencia de ritmos circadianos en una línea celular primaria comercial de adipocitos humanos.....	115

2 Sobre la aplicación de la técnica de bioluminiscencia para evaluar los ritmos circadianos de adipocitos y preadipocitos primarios del tejido adiposo humano subcutáneo y visceral. ....	119
3. Sobre el estudio de la presencia de ritmos circadianos intrínsecos para la sensibilidad a la insulina en el tejido adiposo humano .....	125
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>131</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>135</b>
<b>VIII. ANEXOS.....</b>	<b>147</b>
8. 1. Tablas .....	149
8. 2. Producción científica.....	151



**ABREVIATURAS**

A	Amplitud
ADIPOQ	Adiponectina
ADIPOR	Receptores de la adiponectina
ADNc	Ácido dextrirribonucleico complementario
ALT	Alanina Transaminasa
AMPc	Ácido dextrirribonucleico complementario
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ASCs	Células madre derivadas del tejido adiposo (siglas en inglés: Adipose stem cells)
AST	Aspartato Transaminasa
BCA	Ácido bicinchonínico (siglas en inglés: Bicinchoninic acid)
BMAL1	Brain and muscle ARNT-like protein
CCG	Genes controlados por los genes reloj (siglas en inglés: clock controlled genes)
CLOCK	Circadian locomotor out-put cycles kaput (por sus siglas en inglés)
CKI $\delta/\epsilon$	Caseinquininas $\delta$ y $\epsilon$
CPS	Cuentas por segundo
CRY	Cryptochrome
CT	Tiempo circadiano (siglas en inglés: <i>Circadian Time</i> )
DE	Desviación estándar
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (por sus siglas en inglés)
EEM	Error estándar de la media

## Abreviaturas

FBXL3	Proteínas con un dominio F (siglas en inglés, F-box/LRR-repeat protein 3)
HDL	Lipoproteínas de alta densidad (siglas en inglés: high density lipoproteins)
IMC	Índice de masa corporal
IR	Receptor de la insulina (siglas en inglés: Insulin receptor)
LDL	Lipoproteínas de baja densidad (siglas en inglés: low density lipoproteins)
LEP	Leptina
LEPR	Receptor de la leptina
M	Mesor
NSQ	Núcleo supraquiasmático
pAKT	AKT fosforilada (siglas en inglés: phospho-AKT)
PAS	dominio Per-Arnt-Sim (por sus siglas en inglés)
PBS	Tampón fosfato salino (siglas en inglés: Phosphate buffered saline)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés: Polymerase chain reaction).
PER	Period
PR	Porcentaje del ritmo
RCC	Relación cintura-cadera
RCM	Relación cintura-muslo
RT-qPCR	PCR cuantitativa a tiempo real (siglas en inglés: Real time quantitative PCR)
SBF	Suero bovino fetal
SDS	Dodecilsulfato sódico (siglas en inglés: sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (siglas en inglés: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
SMet	Síndrome metabólico

## Abreviaturas

T	Periodo
TA	Tejido adiposo
tAKT	AKT total (siglas en inglés: total-AKT)
TAS	Tejido adiposo subcutáneo
TAV	Tejido adiposo visceral
TBS-T	Tris-buffered salino, contiene 0.1% Tween, y 5% leche desnatada



## **ANTECEDENTES (BACKGROUND)**

Uno de los grandes descubrimientos en el área de investigación en obesidad de las últimas décadas, ha sido la presencia de relojes circadianos activos, que existen no sólo en nuestro cerebro, sino también en varios órganos relacionados con la ingesta alimentaria como son el hígado, el aparato digestivo o el páncreas. Quizás, el tejido que más relevancia adquiere en el estudio de la obesidad sea el tejido adiposo, lo que llevó a nuestro grupo de investigación a investigar, y finalmente demostrar, que el tejido adiposo también presenta un reloj propio, capaz de funcionar incluso fuera del cuerpo, *in vitro*, sin la influencia del reloj central [1].

Actualmente, la comunidad científica acepta que existe un nexo de unión entre la obesidad, el síndrome metabólico (SMet) y el sistema circadiano. Por ello, esta tesis doctoral pretende aportar una mayor comprensión a) del funcionamiento de este reloj interno del tejido adiposo, que presenta ritmos diarios de 24h, también llamados ritmos circadianos, b) de su relación con el metabolismo, y c) más específicamente de su interacción con la función endocrina del tejido adiposo. Con este nuevo conocimiento, esperamos contribuir al desarrollo de una terapéutica más racional de la obesidad y de las alteraciones asociadas, en la que se tenga en cuenta el “cuándo” [2].



# I. INTRODUCCIÓN

---



## 1. Cronobiología

La cronobiología es la ciencia que estudia los ritmos biológicos de los seres vivos, es decir, las variaciones periódicas que se manifiestan regularmente como consecuencia de los cambios que ocurren en la Tierra, así como su adaptación a estos cambios, en todos los niveles de organización. Estos ritmos biológicos se clasifican en tres grandes grupos según el tiempo que tardan en realizar un ciclo completo (periodo):

- *Ritmos ultradianos*: aquellos que presentan una duración inferior a 24 horas, como las frecuencias cardíacas y respiratorias.
- *Ritmos infradianos*: cuando el ciclo tarda más de 24 horas en completarse, como son los ciclos menstruales.
- *Ritmos circadianos*: aquellos que duran aproximadamente 24 horas como es la secreción de hormonas tales como la melatonina y el cortisol, los ciclos de sueño/vigilia o los ciclos de ingesta/ayuno. Esta tesis doctoral se plantea en el estudio de estos ritmos de 24h. Y es que estos últimos engloban la mayoría de ritmos en los que se ha centrado principalmente la cronobiología. Esta ciencia, a pesar de ser relativamente moderna, pues su desarrollo máximo en fisiología se inició sobre los años 70 del pasado siglo, presenta ya un largo recorrido en su conexión con la fisiología y fisiopatología del ser humano[3-5].

### *El sistema circadiano y el reloj central*

El sistema circadiano de los mamíferos está compuesto por una red de estructuras jerárquicamente organizadas responsables de la generación de ritmos circadianos y de su sincronización con el entorno. Este sistema circadiano está formado principalmente por un marcapasos central, localizado en el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo [6, 7]. En condiciones ambientales naturales, el NSQ se «reajusta» cada día mediante una señal periódica de luz/oscuridad gracias a la existencia

de una ruta no visual basada en las células ganglionares provistas del pigmento melanopsina y en el tracto retino-hipotalámico. Aunque la entrada luminosa (cambios luz/oscuridad) sea la principal señal entrante al NSQ, existen otras entradas periódicas, como el horario de las comidas (ingesta/ayuno) y el ejercicio programado (actividad/reposo), capaces de poner en hora el sistema circadiano de los mamíferos. El marcapasos central, a su vez, sincroniza la actividad de varios relojes periféricos fuera del NSQ mediante la secreción cíclica de hormonas y la actividad del sistema nervioso vegetativo.

El control de la expresión de los ritmos circadianos se realiza a través de los denominados “genes reloj”. Estos genes codifican una serie de proteínas que generan mecanismos de autorregulación mediante bucles de retroalimentación transcripcionales positivos y negativos [8]. Por un lado, los elementos positivos del reloj central, CLOCK (circadian locomotor out-put cycles kaput) y BMAL1 (brain and muscle ARNT-like protein), dos proteínas con estructura de hélice-bucle-hélice que contienen dominios PAS (Per-Arnt-Sim, que permiten la unión proteína proteína) para factores de transcripción; por otra parte, las proteínas PER (period) y CRY (cryptochrome) son los componentes negativos del bucle de retroalimentación. CLOCK heteromeriza con BMAL1 (CLOCK:BMAL1) para activar la transcripción rítmica de los genes *PER* y *CRY* [9, 10], que se acumulan en el citoplasma, heteromerizan entre sí (PER:CRY) y se translocan hacia el núcleo, donde inhiben al complejo activador CLOCK:BMAL1, y además reprimen su propia transcripción completando el bucle de retroalimentación transcripcional/translacional [11, 12]. Por lo tanto, los picos de expresión de estos dos juegos de genes ocurren en el NSQ en antifase uno respecto al otro. Además, dentro de este proceso cíclico, proteínas como las caseinquininas (CKI $\delta/\epsilon$ ) o proteínas con un dominio F (FBXL3) se encargan de controlar la estabilidad de las proteínas PER y

CRY, respectivamente [13, 14]. Se cree que este control post-translacional es clave en la determinación de la longitud de la oscilación molecular [15].

Actualmente, se conoce muy bien cómo participa directamente en el metabolismo la maquinaria del reloj circadiano. Aproximadamente entre un 10 y un 30% de los genes, dependiendo de los tejidos, parece mantener un ritmo de expresión guiado por los genes reloj. Existen numerosas enzimas metabólicas tales como la acil-CoA oxidasa, y la HMG-CoA sintasa, y sistemas de transporte como la sirtuina-1, que muestran ritmos circadianos controlados por el reloj molecular por lo que se consideran genes controlados por los genes reloj (CCG por sus siglas en inglés). En este sentido, proteínas del reloj como BMAL1 y otras proteínas también controladas por los genes reloj, como el PPAR $\alpha$  y el REV-ERB $\alpha$ , están involucradas en el metabolismo lipídico. Además, sabemos que el dímero formado por BMAL1 y CLOCK está implicado en la homeostasis de la glucosa, mientras que CLOCK y PER2 parecen asociarse con la regulación del apetito. En definitiva, hay evidencias sólidas de que el sistema circadiano influye sobre el metabolismo.

### ***Los relojes periféricos***

Tal y como comentábamos al inicio, este reloj circadiano intracelular no solo reside en las neuronas del NSQ del hipotálamo sino que también lo hace en varios tejidos periféricos como son el hígado, el corazón o el páncreas [16-18]. Estos relojes periféricos tienen la capacidad de oscilar de manera autónoma, expresando sus propios “genes reloj”, aunque son sincronizados por el reloj central. De hecho, se ha demostrado que el NSQ no es esencial para dirigir las oscilaciones periféricas, pero sí presenta un papel fundamental como sincronizador de estos cambios cíclicos. En otras palabras, el reloj central no es necesario para que se produzcan los ritmos de estos relojes periféricos, pero sí lo es para ponerlos en hora según las necesidades de nuestro

organismo [18]. Por ello se puede afirmar que la ritmicidad en los tejidos periféricos puede estar controlada directamente por los “genes reloj” propios del tejido, aunque son sincronizados por el reloj central.

### ***Genes reloj en el tejido adiposo de modelos de experimentación animal***

La gran mayoría de los estudios realizados sobre los genes reloj en el tejido adiposo, se lleva a cabo en animales de experimentación, sobre todo en roedores [19-24]. De hecho, con estos modelos experimentales se ha demostrado que la expresión de los genes reloj presenta ritmicidad circadiana, de manera que los ritmos de los elementos positivos (*Bmal1* y *Clock*) están en anti-fase con los ritmos de los elementos negativos (*Per2* y *Cry1*) [19, 20, 25, 26].

En este sentido, gracias a estos estudios se ha podido demostrar la relación entre la alteración de estos ritmos circadianos y los estados patológicos asociados con la obesidad, enfermedad metabólica que se caracteriza por presentar un exceso de TA. Por ejemplo, varios grupos de investigación han estudiado los genes reloj en el tejido adiposo de ratones obesos [20, 25-27]. Los resultados obtenidos de estos trabajos han sido muy dispares, y mientras algunos indicaban que la obesidad tenía efectos leves sobre el reloj circadiano [26], otras investigaciones demostraron que la obesidad, no sólo afectaba de manera importante a la expresión de los genes reloj, sino que incluso era capaz de bloquearla. Concretamente, el estudio realizado por Ando y cols. [20], fue decisivo, ya que mostró cómo la expresión rítmica de los genes reloj se atenuaba en mayor o menor grado dependiendo del grado de obesidad de los ratones. Así, los ratones obesos KK presentaron una atenuación leve de los ritmos, mientras que los ratones con mayor grado de obesidad y diabetes KK-AY tuvieron un aplanamiento de los ritmos significativamente superior que los KK. Esta idea fue reforzada por el estudio realizado por Turek y cols. [27], el cual demostró que los ratones mutantes knock-out

homocigóticos para *Clock* presentaban ritmos de ingesta alterados, eran ratones obesos y además desarrollaban síndrome metabólico (SMet). Este estudio fue clave para conocer la conexión entre los genes reloj en el TA y la obesidad o el SMet, que derivan de un exceso de tejido adiposo.

Otros modelos de experimentación animal *in vitro* que han demostrado ser válidos para el estudio de la biología molecular del tejido adiposo humano son, ciertas líneas celulares de ratón, como la línea celular 3T3-L1 [28], o por ejemplo el cultivo de células madre derivadas de tejido adiposo (ASC) [29].

### ***El tejido adiposo humano, un tejido periférico con ritmos circadianos endógenos***

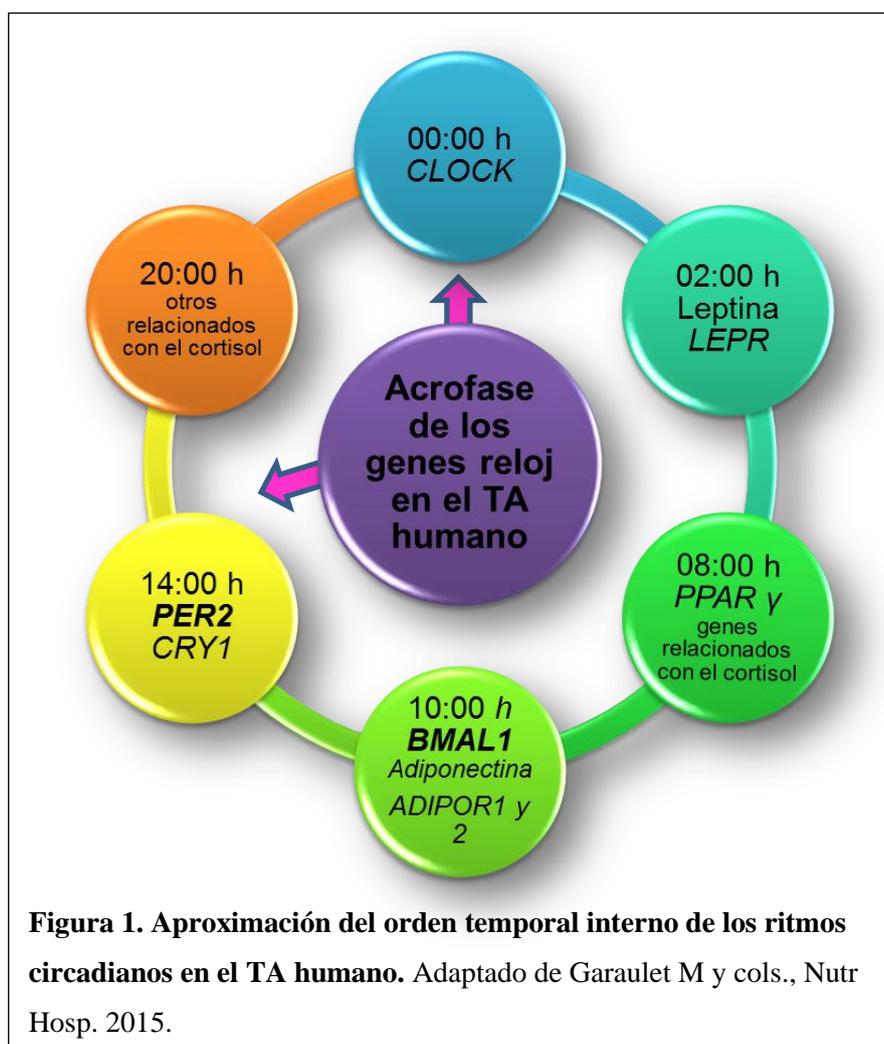
Un ritmo circadiano endógeno es aquel que no necesita la acción del núcleo supraquiasmático para producirse. Tal y como se comentó al inicio, nuestro grupo de investigación demostró hace unos años que el tejido adiposo humano, posee un verdadero reloj endógeno con ritmicidad propia. Fue en el año 2009 cuando descubrimos, gracias a la tesis doctoral de la Dra. Gómez-Abellán, que ciertos genes reloj, tales como *PER2*, *BMAL1* y *CRY1*, se expresaban en el TA humano, en diferentes localizaciones adiposas, subcutánea y visceral [30].

Una vez demostrada la existencia de genes reloj en el tejido adiposo humano, pudimos comprobar, tras una serie de cultivos celulares, la naturaleza periódica de estos genes en el tejido adiposo [1]. Un aspecto importante a destacar fue que en los explantes (piezas de tejido adiposo de un diámetro de 1-5 mm de diámetro aproximadamente) estos genes reloj mantuvieron un ritmo de expresión cíclico *in vitro* al menos durante dos ciclos tras ser extraídos de los sujetos mediante cirugía de bypass gástrico. Este hecho reforzó la teoría de que los genes reloj en los tejidos periféricos oscilan independientemente del NSQ. Este mismo trabajo mostró que el patrón circadiano de

expresión de los genes reloj difería entre los dos depósitos grasos, subcutáneo y visceral. De hecho, la expresión de los genes reloj en el tejido adiposo visceral se asoció más estrechamente con las características del SMet que la del tejido adiposo subcutáneo [1, 31].

A partir de este estudio se realizaron otros trabajos en los que se analizaron otros genes implicados en el metabolismo del tejido adiposo como es el caso de *PPARY* y otros genes relacionados con el metabolismo del cortisol. De nuevo, se demostró que los genes de determinadas citoquinas relacionadas con el tejido adiposo, presentan ritmicidad. Entre ellas, la adiponectina (*ADIPOQ*), considerada como un factor protector frente a perturbaciones asociadas al SMet. Tanto ella, como sus receptores *ADIPOR1* y *ADIPOR2*, mostraron ritmicidad circadiana en el tejido adiposo de pacientes con obesidad severa [32]. Por otro lado, la leptina (*LEP*), otra adipoquina secretada en el tejido adiposo y fuertemente implicada en el control de la ingesta, también presentó ritmicidad circadiana en su expresión, al igual que el gen de su receptor *LEPR*.

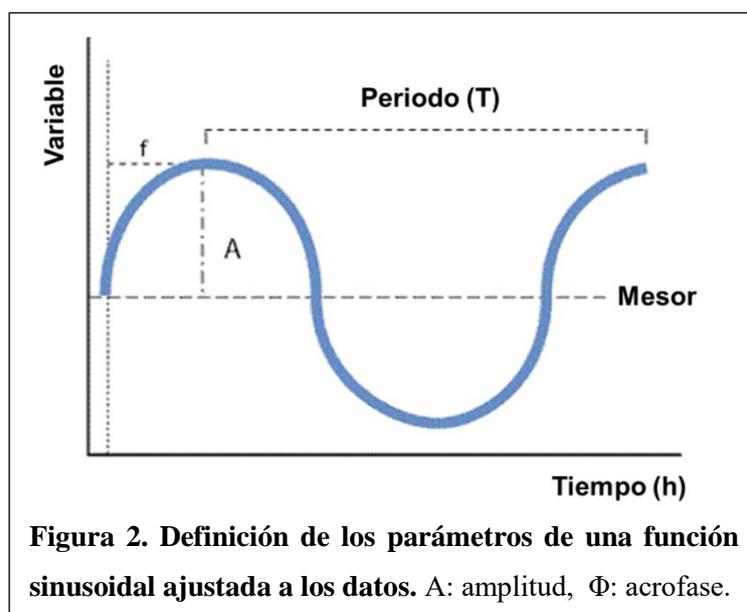
La **figura 1** resume una aproximación del orden temporal interno de los ritmos circadianos del TA humano en el que se señala el horario de máxima expresión o acrofase, de diferentes genes reloj y otros genes de importancia metabólica en el tejido adiposo humano [33]. Por ello, la existencia de un orden temporal específico en los patrones diarios de estos genes parece ser crucial en el tejido adiposo para acumular o movilizar la grasa en el momento adecuado, un fenómeno conocido como compartimentación temporal [33].



Además de la acrofase, hora de máximo pico de expresión, existen otros parámetros interesantes para definir las características del ritmo. Para el estudio del comportamiento de las variables rítmicas, en cronobiología se suele usar el método Cosinor, una herramienta que ajusta los datos de dichas variables a una función coseno o sinusoidal. Se considera que un ritmo es circadiano, si su patrón se puede ajustar a una curva sinusoidal. Este concepto es importante, ya que una variable puede tener cambios a lo largo del día, lo que se podría comprobar estadísticamente gracias a un ANOVA de muestra repetidas, pero esto no asegura que los cambios sean rítmicos, y por lo tanto no podemos decir que un ritmo es circadiano, aunque cambie a lo largo del día, si no presenta este patrón sinusoidal. Además, los cronobiólogos más puros consideran que

un ritmo es circadiano, sólo si además se demuestra que no está marcado por las conductas del individuo, sino que se produce como consecuencia de su reloj interno.

El método cosinor, permite obtener una serie de parámetros que describen objetivamente el ritmo de la variable. Estos parámetros pueden observarse en la **figura 2** y son: el mesor (M) o valor medio del ritmo ajustado a la función sinusoidal; la amplitud (A) diferencia entre el valor máximo y el valor medio del ritmo; el porcentaje del ritmo (PR) o porcentaje de variabilidad considerado para la curva de coseno; y por último el periodo (T), definido como el tiempo de duración de un ciclo completo en una variable rítmica. En el método Cosinor, el periodo es un valor que debe ser conocido previamente, y normalmente al estudiar ritmos circadianos se le suele asignar el valor de 24 horas. Existe otra variable importante en el estudio de los ritmos circadianos, ésta es la frecuencia (f) o número de ciclos que tiene lugar por unidad de tiempo. El periodo o T es un valor que no se puede obtener mediante el método Cosinor, pero si mediante otro método que ajusta el ritmo a una curva de seno. La frecuencia nos permite determinar el periodo real del ritmo.

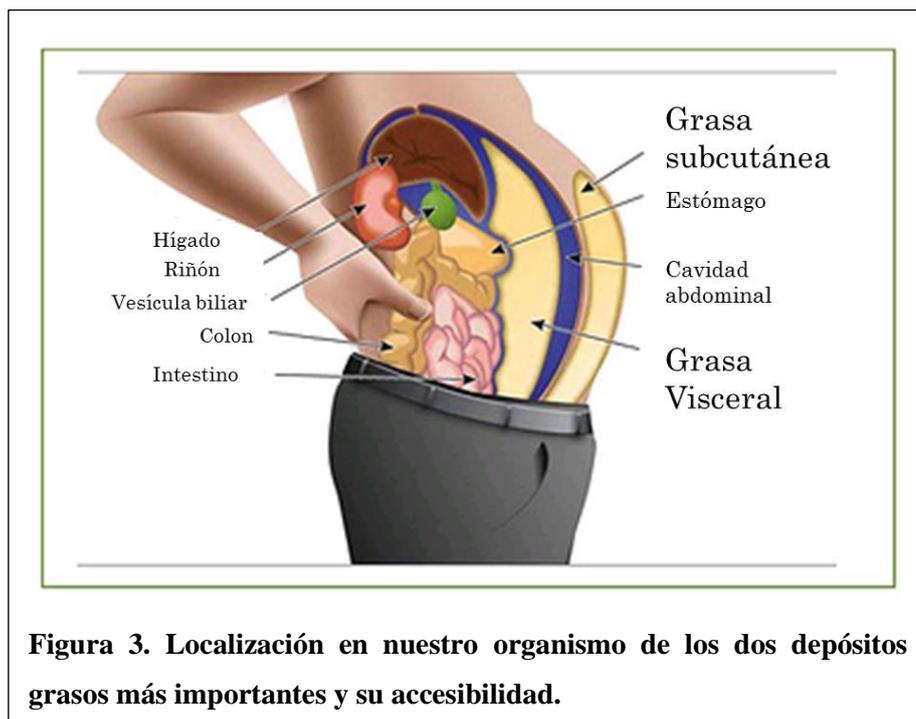


Estudios previos han demostrado que la robustez de un ritmo se puede determinar de dos maneras. Por un lado, se dice que un ritmo es robusto cuando el PR obtenido tras el análisis de cosinor es superior al 60% [32, 34], o por otro lado, cuando el valor del ritmo es estadísticamente significativo, es decir ( $P \leq 0,05$ ) [35].

## 2 Métodos de estudio de los ritmos circadianos en el tejido adiposo

Los explantes de TA humano se pueden considerar el mejor modelo para el estudio de la fisiología y metabolismo de dicho tejido. Sin embargo, su utilización en ocasiones no es posible, ya que este tipo de experimentos necesita de una gran cantidad de tejido, el cual se extrae a los sujetos participantes en los estudios mediante métodos invasivos. Concretamente, nuestra experiencia indica que se necesita al menos una cantidad de 12 gramos de TA para establecer una curva de expresión circadiana fiable [1, 32, 34, 35]. Ésta se consigue tomando muestras de TA al menos cada 4 horas para analizar 6 puntos horarios en el total de 24 horas del día. En ocasiones, por motivos éticos, esto no siempre es posible, siendo una gran limitación en este tipo de estudios.

Tampoco resulta fácil encontrar un tejido que sea buen modelo para estudiar las funciones de los relojes periféricos *in vivo*. Según la localización existen dos tipos de TA en los seres humanos: el TA subcutáneo (TAS), situado justo por debajo de la piel, y el TA visceral (TAV) localizado en el interior de la cavidad abdominal rodeando las vísceras. El TAS presenta una accesibilidad mejor que el TAV (**figura 3**).



**Figura 3. Localización en nuestro organismo de los dos depósitos grasos más importantes y su accesibilidad.**

Por estos motivos, se han descrito una serie de métodos para analizar los ritmos circadianos en el TA, así como las ventajas y desventajas que presenta cada uno de ellos [36].

#### ***A) Análisis de un solo punto en biopsias de TA***

El análisis de un solo punto en biopsias de TA, de la expresión de genes reloj en particular o del metabolismo en general, es uno de los métodos más simples. En este caso, las biopsias se realizan una única vez en el tiempo, y es importante determinar el momento de día en el que éstas se realizan, de tal manera que sea similar entre todas aquellas biopsias que se van a comparar en un mismo estudio. De esta manera, se asegura la relación entre la expresión de los genes estudiados y el estado metabólico de los sujetos participantes.

Este tipo de técnica ha sido muy útil en nuestro grupo de investigación ya que, gracias a ella en 2008, pudimos, por primera vez analizar la expresión de ciertos genes reloj (*BMAL1*, *PER2* y *CRY1*) en el TA humano. En este estudio se usaron biopsias de

TAS y TAV, que procedían de hombres obesos (índice de masa corporal (IMC)  $\geq 40$  Kg/m<sup>2</sup>) [30]. La expresión de los tres genes en el TAS se correlacionó significativamente con el colesterol plasmático total y con las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Además, se encontró una relación negativa entre la expresión del gen *PER2* y la circunferencia de la cintura en el TAV. En otro estudio [37], mediante esta misma técnica, se comparó la expresión del ARN mensajero (ARNm) en el TAS con el IMC de los sujetos. En este caso se estudiaron sujetos que presentaban desde un IMC  $<25$  Kg/m<sup>2</sup> (normopeso) a un IMC  $> 30$  Kg/m<sup>2</sup> (obesos). Los resultados mostraron que la expresión de la mayoría de los genes reloj se correlacionaba con la expresión de genes biomarcadores de los adipocitos. Todos estos estudios han sido muy útiles para vincular la expresión de los genes reloj en el TAS y TAV, con el estado metabólico del sujeto.

Sin embargo, la desventaja en este caso es que los análisis en un solo punto horario a lo largo del día, no da información sobre la naturaleza circadiana del tejido adiposo.

### ***B) Cultivo de biopsias realizadas en un solo punto (explantes de TA)***

Pronto surgió una buena alternativa para solventar la problemática que presentaban los muestreos de un solo punto horario. Esa alternativa fue realizar el cultivo de biopsias de TA extraídas de voluntarios humanos que eran sometidos a una intervención quirúrgica. Tras la obtención de una sola biopsia, ésta es llevada al laboratorio y allí, mediante un bisturí y pinzas, la biopsia se divide en varias porciones o explantes de TA. Un explante de TA, por tanto, es parte de este tejido que se cultiva en un medio artificial *in vitro*, bajo unas condiciones que simulen las condiciones *in vivo*. Una vez establecido el cultivo, los explantes se recogen a distintas horas del día para su posterior análisis a intervalos de 4-6 horas durante un periodo de 24 horas. Mediante

este protocolo, nuestro grupo de investigación pudo demostrar la expresión circadiana de los genes de los glucocorticoides, así como los ritmos circadianos de ciertas adipocinas como la adiponectina [31, 32]. Además, pudimos comprobar que el ARNm de los genes reloj oscilaba de manera rítmica a lo largo del día y que su expresión era diferente entre los TAS y TAV. Este experimento afianzó la teoría de que ambos depósitos grasos eran diferentes, no solo desde el punto de vista fisiológico, sino también de su metabolismo, y por tanto, debían ser analizados por separado.

La gran ventaja de esta técnica es que a partir de una sola biopsia se consigue comparar los resultados obtenidos entre el TAS y el TAV de un mismo individuo. Además, permite estudiar las características de los ritmos circadianos endógenos de un tejido periférico, como es el TA humano. Aunque esta técnica también presenta algunas desventajas. Una de ellas, es el número de experimentos que se puede realizar. Éste va a depender del tamaño de la biopsia que se obtenga durante la cirugía. Como se mencionó anteriormente, el tamaño mínimo de la biopsia para obtener un ritmo circadiano fiable es de 12 gramos. Solamente se puede hacer esta técnica en individuos con obesidad severa, y que sean operados quirúrgicamente. La otra desventaja que presenta es la dificultad que supone extrapolar los resultados obtenidos del cultivo *in vitro* a las características fisiológicas que se dan *in vivo*.

### ***C) Realizar biopsias en serie***

A pesar de que el muestreo de determinados tejidos no resulta fácil, en este sentido, se han conseguido avances hacia un mayor conocimiento del funcionamiento de los relojes periféricos en humanos. A ello ha colaborado la extracción de biopsias en serie, técnica que consiste en obtener del mismo organismo distintas biopsias en diferentes momentos del día. Además del TA humano, se han usado otros tejidos en este tipo de análisis, como son las células sanguíneas [38, 39], o los folículos pilosos [40].

Concretamente, los ritmos circadianos encontrados en leucocitos se correlaciona tanto con los ritmos de la melatonina y el cortisol, como con los horarios de sueño-vigilia, lo que demuestra la capacidad que presentan de capturar el ritmo interno del individuo, a pesar de ser extraídos del organismo [41]. Por otro lado, los folículos pilosos humanos pueden usarse como marcadores de los ritmos periféricos humanos [40]. La desventaja de estos tejidos es que no tienen una clara relación con el metabolismo.

En este sentido, mediante estas biopsias en serie del TAS, varios estudios han demostrado la posibilidad de captar los cambios a lo largo del tiempo en la expresión génica. Concretamente, Loboda y cols., realizaron la extracción de tres biopsias de la región subcutánea, muy cerca del ombligo, concretamente por la mañana, por la tarde y por la noche, en un intervalo total de diez horas y media. En este caso, los sujetos participantes eran todos hombres sanos con sobrepeso y obesidad (IMC entre 27-35 kg/m<sup>2</sup>). Tras analizar el transcriptoma del TA humano, concluyeron que, aproximadamente el 25% del mismo presentaba cambios significativos en el tiempo, es decir a lo largo del día, en la regulación de su expresión diaria [42].

En otro estudio posterior, las biopsias de TAS se recogieron en serie cada seis horas a lo largo de un período de 24 horas, esta vez en una región de la nalga superior, la cual contiene TA metabólicamente activo [43]. En este caso, se analizó la expresión génica diaria en tres grupos de sujetos, divididos en delgados, ligeramente obesos y obesos con diabetes tipo 2 [44]. Los sujetos se trasladaron al laboratorio la noche previa al experimento para conseguir una aclimatación al entorno similar entre ellos. Además, durante la semana previa a la realización del estudio, todos ellos siguieron una misma rutina en sueño y alimentación. Los resultados mostraron de nuevo ritmos robustos en todos los genes reloj analizados, así como los genes implicados en el metabolismo del TA humano regulados de manera circadiana. Sorprendentemente, y en contraste con los

datos obtenidos en un experimento similar con ratones [20], no se encontraron diferencias significativas en la expresión génica entre los tres grupos experimentales, según el grado de obesidad, tras permanecer en condiciones de laboratorio controladas.

Esta técnica se reduce al estudio del TAS, ya que no es posible realizar la obtención de biopsias en serie del TAV, esto limita la utilidad de la técnica ya que el TAS no es tan buen predictor del síndrome metabólico como el TAV [45]. No obstante, el uso de biopsias en serie, ha demostrado ser un protocolo útil para el análisis de los ritmos circadianos *in vivo* en un tejido metabólicamente activo como es el TAS. Esto supone una ventaja frente al estudio de los ritmos circadianos en las células sanguíneas o los folículos pilosos, que no se consideran tejidos metabólicos. Por lo tanto, queda claro que el TAS es un buen marcador fisiológico de los relojes periféricos para el estudio de la cronobiología en humanos.

#### ***D) Cultivos celulares y análisis a tiempo real de la expresión génica***

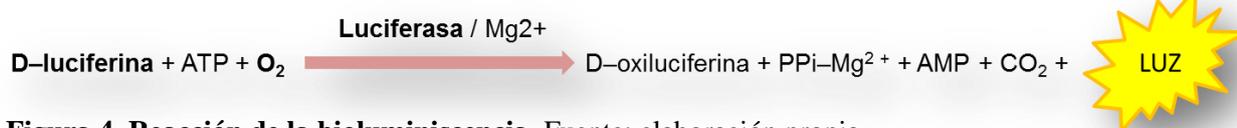
Hasta ahora, todas las técnicas descritas han utilizado el TA como biopsia o explante, compuesto por diferentes tipos celulares, ya que además de adipocitos, el tejido adiposo presenta otras células como macrófagos o linfocitos. Para conseguir una mayor comprensión de la biología molecular circadiana de las células que caracterizan principalmente al tejido adiposo, que son los adipocitos, es necesario recurrir al uso de otras técnicas, como alternativa a la metodología descrita hasta ahora.

Para estudiar los adipocitos, y su ritmicidad circadiana, una de las técnicas que se utiliza, es la manipulación genética del núcleo del reloj en los adipocitos. Ésta proporciona a tiempo real el análisis de los genes denominados “reporteros” y gracias a ella se consigue una resolución temporal, es decir muchas más mediciones durante las 24h del día, que con las técnicas previamente usadas. Este tipo de técnica se ha usado con éxito en fibroblastos de piel humana *in vitro* [46]. La ventaja de esta técnica,

además del número de determinaciones, que puede ser de unas 200 medidas, es que a partir de una pequeña cantidad de tejido de origen permite el análisis de múltiples ciclos circadianos, es decir de varios días. Es por ello, que esta técnica resulta ideal para comparar las propiedades circadianas de los adipocitos de diferentes depósitos grasos (TAS y TAV). Además, permite estimar de manera fiable el periodo y la fase de los relojes periféricos humanos [46], con resultados paralelos a los obtenidos en otros estudios realizados en animales [47].

El mecanismo que permite a esta técnica captar el ritmo de estos genes reporteros, se basa en la capacidad que tienen ciertos organismos vivos de producir luz: es la reacción de bioluminiscencia.

De forma resumida, esta reacción es un proceso bioquímico, que ocurre de la siguiente manera: el oxígeno oxida al sustrato (la luciferina), en un proceso catalizado por el enzima luciferasa, y en el que interviene una molécula de ATP proporcionando la energía necesaria para que la reacción ocurra. Gracias a esta reacción se obtiene luz, que es lo que finalmente se determina (**figura 4**).



**Figura 4. Reacción de la bioluminiscencia.** Fuente: elaboración propia.

Por lo tanto, para llevar a cabo esta técnica es necesario obtener modelos de estudio, como líneas celulares o explantes de tejidos, que contengan en su genoma el promotor del gen reloj de interés, unido al gen de la luciferasa, de tal manera que, cuando se activa el mecanismo de expresión del propio gen, provoca a su vez la expresión del gen de la luciferasa, y así es como se puede observar a tiempo real la

expresión de un gen específicamente. Dicho de otra manera, la emisión de bioluminiscencia es directamente proporcional a la expresión génica.

El modo de conseguir esto en una línea celular, es mediante transducción, término genético que se utiliza para nombrar al proceso por el que se introduce material genético exógeno utilizando un virus como vector. Para conseguirlo en explantes, lo que se hace es extraer el tejido de animales transgénicos, es decir, aquellos animales a los que se ha modificado genéticamente alguna secuencia de su ADN con el fin de conseguir un efecto en particular. En ambos casos, el efecto que se quiere obtener es el detectar luz tras la expresión del gen de interés.

Como ya se ha comentado, la técnica ha sido utilizada para evaluar los relojes periféricos en humanos, mediante el cultivo de fibroblastos procedentes de biopsias de piel, principalmente [46, 48-50]. En estos estudios, la transducción de los fibroblastos se realizó con un vector de lentivirus que contenía el gen promotor de un gen reloj, fusionado con el gen de la luciferasa y posteriormente se registró la bioluminiscencia a tiempo real.

La principal ventaja de esta técnica reside en que los datos se registran de manera continua, y aunque se trata de un método que técnicamente puede considerarse más complejo o exigente, resulta mucho más eficaz en la determinación de los ritmos circadianos que el hecho de recoger varias muestras a lo largo del día. Este registro, además, se realiza en una sola placa de cultivo, durante varios días y sin necesidad de efectuar distintos muestreos en el transcurso de esos días.

Estos genes reporteros de bioluminiscencia, se han usado con éxito en otras células humanas como las células de los islotes pancreáticos [51] o células epiteliales del pigmento retiniano [52].

No obstante, esta técnica presenta algunas limitaciones. Una de las principales es el hecho de extrapolar los parámetros del ritmo circadiano observado en un cultivo de células *in vitro* hacia la situación *in vivo*. En este sentido existe gran controversia, ya que mientras que unos estudios demuestran una correlación significativa entre la situación *in vivo* e *in vitro* [53], otros, muestran la ausencia de esta correlación [50]. Por tanto, aunque se necesitan más estudios para verificar si los ritmos *in vitro* reflejan con precisión el comportamiento del reloj en su entorno natural (*in vivo*), la mayor ventaja de esta técnica es que es perfecta para determinar los ritmos circadianos del tejido, ya que por el mero hecho de presentar ritmicidad fuera *in vitro*, es decir sin la influencia del reloj central, demuestra que estos ritmos son circadianos, es decir que están generados por el reloj propio del tejido en estudio.

### **3 El tejido adiposo humano y sensibilidad a la insulina**

#### ***El tejido adiposo humano***

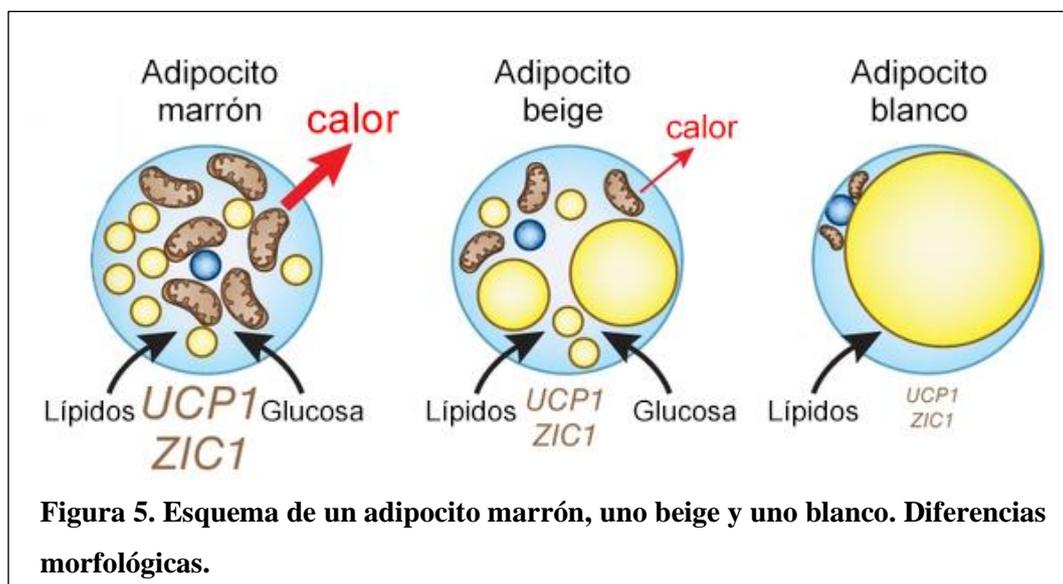
El TA humano clásicamente era considerado como un tejido pasivo cuya única función era la de almacenar energía a largo plazo y ser aislante mecánico y térmico de órganos vitales. Actualmente esta idea ha cambiado por completo, y además de ser almacén de energía, se le reconoce como un importante órgano endocrino [54]. Se trata de un tejido que secreta múltiples moléculas bioactivas como son las denominadas adipoquinas [55, 56]. Estas adipoquinas tales como la adiponectina, la leptina o la resistina, entre otras, tienen una acción autocrina: ya que actúan en el propio tejido adiposo dónde se producen; paracrina: es decir en tejidos cercanos, pero también y lo más importante es que presentan una acción endocrina; es decir pueden ser secretadas a sangre y actuar sobre otros órganos y tejidos. De esta manera, interactúan localmente en el tejido adiposo y con otros órganos como el cerebro, el páncreas o el hígado,

influyendo activamente sobre el metabolismo sistémico, y además muchas de ellas muestran concentraciones plasmáticas que varían a lo largo de las 24 horas del día [57-60]. Además, nuestro grupo de investigación ha demostrado que los genes reloj juegan, dentro del tejido adiposo humano, un papel fundamental en la regulación de la expresión de todas las adipoquinas secretadas por él, y por tanto sobre el metabolismo [61].

El TA está compuesto por diferentes tipos celulares que contribuyen y participan en mayor o menor grado en su función secretora [62]. En él se puede distinguir, una fracción adiposa propiamente dicha y mayoritaria, que se compone de las células de la grasa o adipocitos (**figura 5**) y preadipocitos (sus precursores), y por otro lado, una fracción denominada estroma-vascular, que se conforma de vasos sanguíneos, terminaciones nerviosas y células inmunitarias, como macrófagos y linfocitos [63]. Además, como han descrito varios autores, para estudiar los ritmos circadianos del TA es importante tener en cuenta esta naturaleza heterogénea [64, 65]. De hecho, se sabe que la mayoría, sino todos los tipos celulares que forman parte de este tejido poseen un reloj circadiano endógeno propio, e incluso su composición varía según el estado metabólico del individuo. Por ejemplo, el TA de sujetos obesos se caracteriza por presentar una infiltración superior de macrófagos a la que presenta el TA de sujetos no obesos, por ello se dice que el individuo obeso tiene un tejido adiposo “inflamado”. Ésta es una cuestión que debe ser considerada, ya que en ocasiones no se puede saber con certeza qué tipo celular aporta la ritmicidad del tejido.

Por otro lado, en función del tipo de características de la fracción adiposa se distinguen principalmente dos tipos tisulares como son el tejido adiposo marrón (TAM) y el tejido adiposo blanco (TAB), ambos funcional e histológicamente bien diferenciados.

Los adipocitos blancos almacenan energía en forma de lípidos, principalmente triglicéridos, por ello, se caracterizan por presentar una gran y única vacuola almacenadora de ácidos grasos procedentes de la dieta, que ocupa casi todo el citoplasma, quedando su núcleo desplazado hacia la periferia (**figura 5, izquierda**). Por otro lado, a los adipocitos marrones (**figura 5, derecha**) se le atribuye desde hace más de 20 años un papel clave en la termogénesis inducida por el frío y la homeostasis del peso corporal. De hecho, la grasa marrón es esencial en bebés humanos, pero no tanto en adultos debido a la mayor tasa metabólica y masa muscular que poseen en comparación [66, 67]. La conversión de tejido adiposo blanco en marrón o pardo ha sido denominada también como “tejido adiposo beige” (también llamada tejido adiposo convertible). Este es un tipo de tejido intermedio entre el blanco y el marrón, por adquirir similitudes con los adipocitos pardos (**figura 5, centro**).

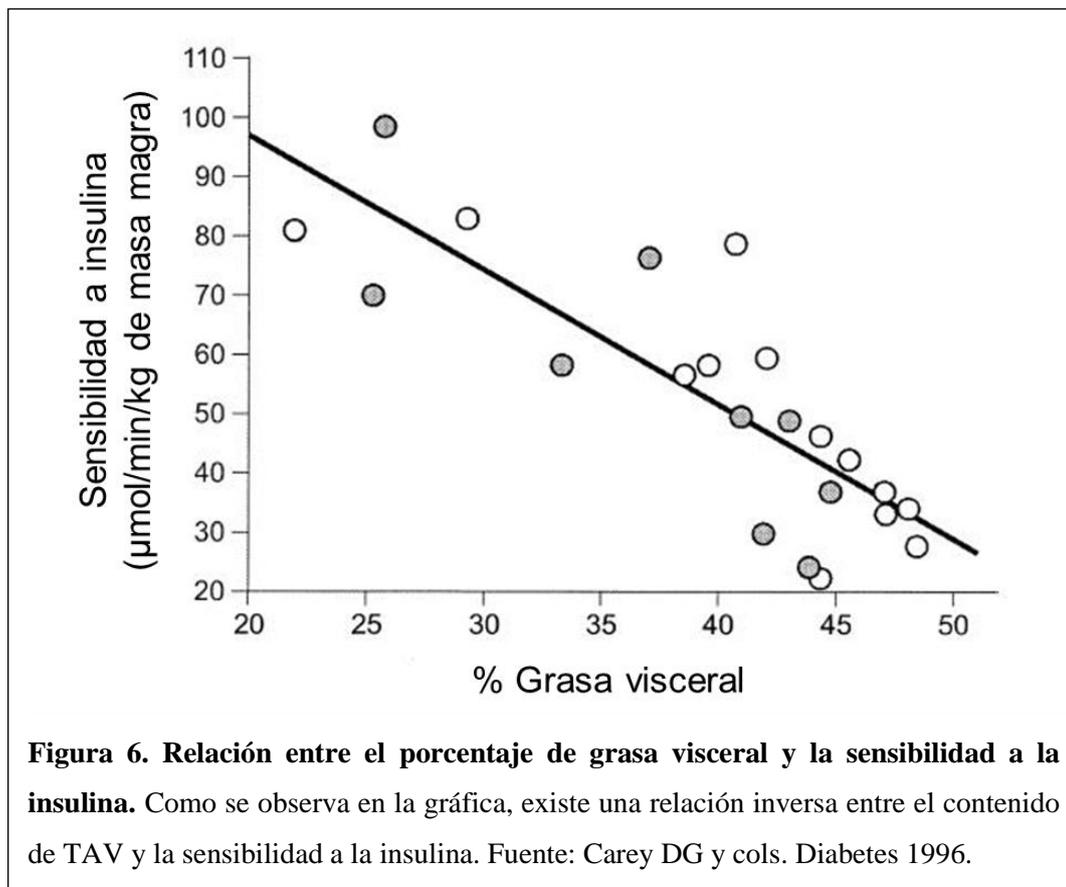


Específicamente, el tejido adiposo blanco presenta diferencias metabólicas en función de su localización anatómica. En humanos el TA se distribuye principalmente en dos depósitos grasos mayoritarios, como se ha comentado anteriormente, el depósito visceral (o intraabdominal) y el subcutáneo. Ambos presentan características anatómicas y fisiológicas bien diferenciadas, de manera que el tejido adiposo subcutáneo (TAS), situado justo por debajo de la piel, presenta mayor capacidad de expansión, y por ejemplo, se sabe que en ratas secreta una mayor cantidad de leptina que el tejido adiposo visceral (TAV) [68]. El TAV, sin embargo, se localiza en el interior de la cavidad abdominal rodeando las vísceras y presenta una mayor respuesta lipolítica [69], así como una mayor captación de glucosa en respuesta a la insulina que el TAS [70].

Cabe destacar, que el TA se encuentra ampliamente distribuido a lo largo de todo el organismo, llegando a definirse como uno de los órganos más extensos del cuerpo. Debido a su gran capacidad plástica, representa desde un 5% en deportistas de élite a más de un 50% del peso corporal, en individuos obesos y obesos extremos. Por lo tanto, este órgano adiposo [54] aumentará de tamaño cuando el balance energético del organismo resulte positivo, ya que aumenta la cantidad de lípidos almacenados en los adipocitos. Este agrandamiento se da mediante dos mecanismos conocidos como hipertrofia e hiperplasia. El primero de ellos ocurre cuando aumenta el tamaño del adipocito y el segundo cuando lo hace el número de adipocitos. Si tenemos en cuenta este aspecto junto con la función endocrina del TA, sabremos que un exceso de TA se traduce en un desequilibrio en la actividad metabólica de nuestro organismo, lo que conducirá a la aparición de alteraciones fisiopatológicas, como la obesidad y otras enfermedades asociadas, como la diabetes tipo II.

***Fisiopatologías asociadas al exceso de tejido adiposo humano***

La obesidad, como se ha mencionado anteriormente, es un exceso de tejido adiposo que origina un aumento de peso corporal con respecto a lo que correspondería según sexo, talla y edad. Hoy en día la obesidad es considerada la epidemia del siglo XXI y es un problema serio de salud mundial, ya que está vinculada estrechamente con las principales causas de morbilidad (enfermedad), mortalidad y discapacidad. De todas las patologías que se asocian a la obesidad, la diabetes mellitus tipo II es una de las más frecuentes. Este tipo de diabetes (conocida anteriormente como diabetes no insulino dependiente) es una enfermedad metabólica caracterizada por altos valores de glucosa en la sangre. Esta hiperglucemia se debe a la resistencia que se produce en las células a la acción de la insulina que puede estar combinada, en los últimos estadios de la enfermedad, con una secreción deficiente de insulina por el páncreas. Unos individuos pueden tener resistencia a la insulina, mientras que en otros se puede dar un mayor defecto en la secreción de la hormona. Según esto, la resistencia a la insulina se podría definir como una sensibilidad reducida en los tejidos corporales a la acción de la insulina y afecta a la disponibilidad de glucosa en el músculo y en el tejido adiposo [71, 72]. Cuando los sujetos obesos, que presentan un porcentaje de grasa elevado, sufren o padecen resistencia a la insulina, el páncreas intenta superar los defectos de la resistencia a través de la sobreproducción de esta hormona, con lo que se produce un aumento de los valores de insulina en sangre, efecto al que se conoce como hiperinsulinemia [71]. De hecho, Carey DG y cols., demostraron que el aumento de la adiposidad en el TAV se correlaciona negativamente con la sensibilidad a la insulina (**figura 6**) [72]. En general, la resistencia a la insulina parece estar relacionada con un aumento de la adiposidad, y de la grasa visceral en particular. Así, el compartimiento visceral es más resistente a la acción de la insulina que el subcutáneo.



### *Acción de la insulina en el tejido adiposo*

La insulina, hormona cuyo papel fundamental es la homeostasis de la glucosa en sangre, está además implicada activamente en el metabolismo de los lípidos en el TA.

Las diferentes acciones de la insulina sobre este tejido están mediadas por los receptores de superficie en las células grasas. Cuando la insulina se une a su receptor específico IR (“insulin receptor”, por sus siglas en inglés), en el adipocito se produce una cascada de reacciones de fosforilación/desfosforilación de distintas proteínas. Una de las proteínas clave en la ruta de señalización de la insulina es la proteína AKT (o protein kinase B, PKB). Esta enzima se fosforila/defosforila según la acción de la insulina en las células del TA, de tal manera que la pAKT (AKT fosforilada) se ve incrementada con la interacción de la insulina con el adipocito. Las concentraciones de

tAKT (AKT total) y pAKT se pueden determinar mediante técnicas experimentales conocidas, como es el western blot, lo que nos aporta información sobre la acción de la insulina en la célula. Además, existen anticuerpos independientes frente a estas proteínas [73].

Como previamente se ha comentado, estados fisiopatológicos como la obesidad que se alargan en el tiempo, conducen a una disminución de la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos donde esta hormona actúa, esta sensibilidad cambia a lo largo del día.

### ***Sensibilidad a la insulina***

Se sabe, que la insulina se secreta en el organismo de forma continua a lo largo del día, lo que se conoce como secreción basal, y también lo hace de forma aguda en dos fases como respuesta a las comidas. En humanos, la tolerancia a la glucosa varía con la hora del día [74]. Este sistema sirve para mantener los valores de glucemia dentro de unos límites adecuados. La secreción basal constituye el 50% del total diario, mientras que el otro 50% se secreta en respuesta a las comidas. La secreción de insulina no es igual a lo largo del día caracterizándose por un descenso durante la noche. La glucosa en plasma en respuesta a las comidas, glucosa oral, y glucosa intravenosa es mucho más alta por la tarde-noche que por la mañana [75]. Además, conforme pasa el día, se produce una disminución de la sensibilidad a la insulina, además de una disminución en la secreción lo que da lugar a una menor tolerancia a la glucosa al final del día [76].

A pesar de todas estas evidencias, los mecanismos responsables de la variación diaria en la homeostasis de la glucosa no se conocen todavía. Además, para determinar la existencia de un patrón circadiano endógeno, se debe intentar minimizar los factores externos, marcados por la conducta del individuo, que puedan dar lugar a confusión

como son, la variabilidad en el tamaño y composición de la comida, grado de actividad física, patrones de sueño y otros factores que influyen en la tolerancia a la glucosa [77].

Otra cuestión importante a considerar es que parte de las fluctuaciones diarias que se producen en la tolerancia a la glucosa/sensibilidad a la insulina se deben al control circadiano del cuerpo *versus* la influencia del ciclo conductual. La mayoría de los estudios realizados en seres humanos no están diseñados para probar la existencia de un patrón endógeno circadiano en la secreción o acción de la insulina, independiente de los ritmos diarios en los comportamientos y en el medio ambiente. La ritmicidad circadiana endógena en los seres humanos como ya se ha mencionado antes, es generada por las neuronas del núcleo supraquiasmático (NSQ, el reloj central) y osciladores periféricos localizados en prácticamente todos los órganos y células de nuestro cuerpo. Aunque estos tejidos periféricos tienen relojes intrínsecos, existe una información limitada sobre sus funciones fisiológicas [78, 79]. Los estudios realizados en animales de experimentación han demostrado que es necesario un reloj circadiano intrínseco en el páncreas para que se produzca la liberación normal de insulina y la homeostasis de la glucosa [80]. En los ratones, el reloj del hígado también contribuye a la homeostasis de la glucosa mediante la conducción de un ritmo diario de la producción de glucosa hepática que compensa el ciclo diario de ayuno e ingesta [78]. Sin embargo, poco se sabe sobre la contribución del reloj periférico del tejido adiposo en la sensibilidad a la insulina. Como ya se ha comentado previamente, en los seres humanos, el TA es uno de los órganos más grandes del cuerpo, y que además de funcionar como aislamiento mecánico y térmico de órganos vitales y como importante almacén de energía a largo plazo, es un tejido metabólicamente activo y clave en la regulación del metabolismo de la glucosa [81].

## **II. OBJETIVOS**

---



## Situación actual y objetivo general

El tejido adiposo humano posee un reloj circadiano periférico que puede funcionar independientemente del control del NSQ. Para demostrarlo, nuestro grupo de investigación llevó a cabo cultivos de explantes de tejido adiposo humano. Sobre ellos se analizó la expresión circadiana de los genes reloj, así como la de otros genes del tejido adiposo relacionados con el metabolismo. Los muestreos se realizaron con una frecuencia máxima de 6 puntos durante 24 horas, que hasta ahora se ha considerado aceptable para el análisis de un ritmo circadiano típico. Sin embargo, el aumento en la frecuencia de muestreos permitiría un mayor acercamiento a la situación real que se da *in vivo*. Esto no resulta fácil cuando trabajamos con explantes, ya que, para cada nuevo punto de muestreo que se propone se necesita disponer de una gran cantidad de tejido adiposo.

Hasta ahora, esta técnica ha resultado ser realmente útil para demostrar la existencia de ritmos circadianos en el tejido adiposo humano, pero no aporta una visión real sobre las características del ritmo, concretamente sobre el periodo endógeno y la fase del tejido adiposo, sino que lo hace de forma aproximada. El uso de la técnica de luminiscencia, utilizada hasta ahora en tejido adiposo de modelos animales, pero no en humanos, ayudaría a alcanzar este conocimiento, sin embargo, no existe todavía ningún grupo que haya sido capaz de aplicar esta técnica al estudio del tejido adiposo humano.

Otra alternativa no invasiva al uso de explantes de TA, podría ser el uso de líneas celulares primarias comerciales obtenidas del tejido adiposo humano. De esta manera no tendríamos que obtener biopsias del sujeto, durante operaciones quirúrgicas. Aun así, no se sabe si podrían ser buenos modelos de estudio, ya que se desconoce si estas líneas celulares presentan o no ritmos circadianos.

También se ha demostrado que los genes reloj influyen sobre la expresión rítmica de ciertas hormonas secretadas por el tejido adiposo, sin embargo, hasta ahora no se han hecho estudios en el tejido adiposo humano sobre si existen ritmos circadianos en la eficacia de una hormona metabólicamente activa sobre el tejido adiposo y su función. El estudio de los ritmos diarios en la sensibilidad que presenta el tejido adiposo humano para la acción de la insulina, podría ser de gran ayuda en el conocimiento de la realidad circadiana de este tejido, y en su aplicación a la medicina, y su translación a la práctica clínica.

Si tenemos en cuenta la relevante contribución que representa el tejido adiposo sobre el metabolismo de los azúcares en el ser humano, el estudio de los ritmos circadianos de la sensibilidad la insulina por este tejido, nos permitiría aconsejar la ingesta de carbohidratos en aquellos momentos de mayor sensibilidad, y desaconsejar esta ingesta en los momentos de menor sensibilidad.

Es por ello que en la presente tesis doctoral nos propusimos alcanzar los siguientes objetivos.

## Objetivos específicos

**Objetivo 1:** Evaluar si existen ritmos circadianos en una línea celular primaria comercial de preadipocitos humanos (PT-5020: Human Subcutaneous Preadipocytes; Lonza Walkersville, Inc.), técnica no invasiva y que podría ser un modelo adecuado para el estudio de los genes reloj y su implicación en determinados procesos fisiológicos.

**Objetivo 2:** Desarrollar una técnica que permita analizar los ritmos circadianos en cultivos primarios del tejido adiposo humano subcutáneo y visceral. Esta técnica podría ser útil para: a) evaluar de manera continua y durante un mayor periodo de tiempo los ritmos circadianos; b) obtener ritmos circadianos precisos usando poca cantidad de tejido adiposo; y c) obtener un valor de la fase y el periodo de estos ritmos más cercano a la realidad.

**Subobjetivo 2.1:** Investigar si existe relación entre las características de los ritmos circadianos endógenos de adipocitos y preadipocitos, con las características de la población donante del tejido adiposo, como son la edad, el índice de masa corporal o los hábitos de sueño.

**Objetivo 3:** Determinar si este reloj circadiano presenta además un efecto metabólico en el tejido adiposo humano, concretamente para la sensibilidad a una hormona de importancia metabólica en obesidad y diabetes, como es la insulina.



## **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

---



En la presente tesis doctoral se ha analizado la expresión de los ritmos circadianos del tejido adiposo en cultivos *in vitro*, mediante tres aproximaciones diferentes según el objetivo planteado: para el objetivo 1, el estudio se realizó en una línea celular primaria comercial de preadipocitos humanos (PT-5020: Human Subcutaneous Preadipocytes); para el objetivo 2, en el que se pretendía aplicar una nueva técnica basada en luminiscencia, se utilizaron adipocitos y preadipocitos aislados de tejido adiposo de sujetos sometidos a cirugía por su obesidad extrema; para el objetivo 3, con el fin de determinar la sensibilidad del tejido adiposo a la insulina, se utilizaron explantes de tejido adiposo de sujetos sometidos a cirugía por su obesidad extrema (**Figura 7**).



A continuación se describen de manera detallada cada una de las técnicas empleadas para la consecución de los tres objetivos.

## **1 Cultivo celular, diferenciación y tratamientos**

Todo el trabajo relacionado con el cultivo del tejido adiposo, se realizó en cabinas de flujo laminar de seguridad biológica tipo 2 y en condiciones de esterilidad.

### ***Establecimiento del Cultivo Primario***

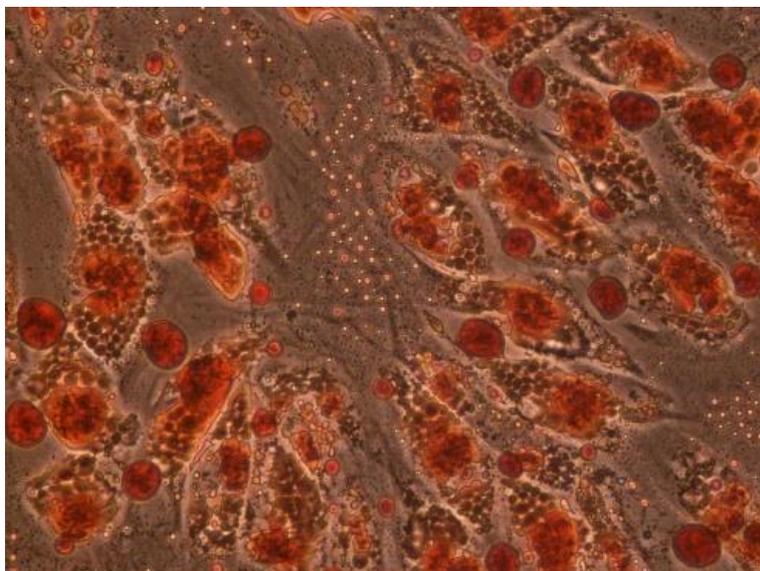
Tras las búsquedas bibliográficas que se realizaron mediante la consulta de la base informática PubMed (U.S. National Library of Medicine) de acceso a través de internet en la dirección URL [www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed) que accede a revistas de alto índice de impacto en el área en que se incluye este trabajo: obesidad, cultivos celulares, biología molecular, genes reloj, etc, las células seleccionadas para nuestro estudio fueron preadipocitos de tejido adiposo subcutáneo humano adquiridas en una casa comercial (PT-5020: Human Subcutaneous Preadipocytes (Lonza Walkersville, Inc.)). Para el establecimiento del cultivo se usó el medio de crecimiento específico de la misma casa comercial (PT-8202: PBM-2: Pre-adipocyte Basal Medium) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (SBF, por sus siglas en inglés), bajo las condiciones de 5% CO<sub>2</sub> y 37°C.

Una vez establecido el cultivo de preadipocitos, se llevó a cabo el proceso de diferenciación a adipocitos maduros. Dicho proceso se realizó en placas multipocillo (NUNC Corporation, United Kingdom). Al llegar a un 90% de la confluencia en la misma placa, se añadió un medio de diferenciación. Este medio de diferenciación consistió en el mismo medio utilizado para el crecimiento de las células (PBM-2) al que se le añadió una mezcla de factores de crecimiento de la misma casa comercial, los PGM-2 Single Quots (PT-9502, Lonza Walkersville, Inc.). Según las instrucciones del fabricante, el medio se se mantuvo sin cambiar durante todo el proceso de diferenciación, ya que se trata de un sistema complejo que permite el mantenimiento de

las células. A los 10 días desde el inicio del proceso de diferenciación se observó que los preadipocitos estaban completamente diferenciados a adipocitos maduros.

### ***Caracterización de adipocitos (análisis histológico)***

El fenotipo de los adipocitos se caracteriza por la acumulación intracelular de gran cantidad de gotitas de lípidos (triglicéridos intracelulares), por lo que, para comprobar la diferenciación de los preadipocitos a adipocitos maduros, se llevó a cabo la técnica de tinción de lípidos con Oil Red [82]. Para ello, primero se fijaron las células con formaldehído (expuestas durante 10 minutos), posteriormente se retiró el formaldehído, y se realizaron dos lavados con tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés) y se puso Oil Red hasta cubrir por completo el pocillo con las células durante 30 minutos. Por último, se retiró el exceso de Oil Red, se lavó de nuevo con PBS. Se comprobó que las células eran ya adipocitos maduros mediante observación en microscopio óptico por su acúmulo de gotas de lípidos teñidas de color rojo (**figura 8**).

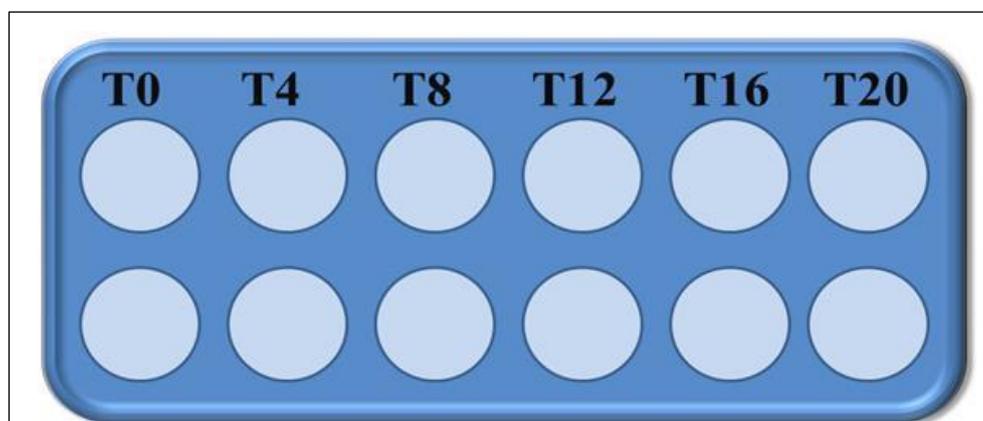


**Figura 8. Línea celular de preadipocitos humanos del TA subcutáneo diferenciados en adipocitos maduros adheridos a la placa de cultivo (40x). Fuente: Elaboración propia.**

### ***Sincronización del cultivo***

El diseño experimental en cronobiología se fundamenta en el hecho de que, en principio, todas las variables biológicas muestran ritmos. Cuando nos encontramos ante una variable rítmica, la influencia de los intervalos de muestreo es crucial. En el presente trabajo, una medida única nos serviría de muy poco, aunque siempre la realicemos a la misma hora. La determinación de una variable realizada en días diferentes a la misma hora o bien el mismo día con un intervalo de una hora entre un muestreo y otro nos dará valores diferentes. A medida que vamos aumentando la frecuencia de muestreo, nos vamos aproximando más a la situación real. Para un ritmo circadiano típico, se considera aceptable la determinación de la variable cada 4 horas (6 valores en 24 h).

En este sentido en el presente trabajo, una vez que tuvimos los adipocitos maduros en cultivo, se tomaron muestras cada 4 horas durante un ciclo de 24 horas y se conservaron en un congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis. Las horas seleccionadas para los distintos muestreos fueron 10:00h A.M (Tiempo 0), 14:00h P.M (Tiempo 4), 18:00h P.M (Tiempo 8), 22:00h P.M (Tiempo 12), 02:00h A.M (Tiempo 16) y 06:00h A.M (Tiempo 20). Para cada tiempo de muestreo, las células se cultivaron en pocillos independientes y por duplicado (**figura 9**).



**Figura 9.** Esquema de la placa multipocillo usada en el experimento.

Fuente: elaboración propia. T=tiempo.

## **2 Estudio de la expresión de genes reloj**

En general, para el análisis de la expresión de genes, se han de realizar los siguientes pasos: extracción del ARN (ácido ribonucleico), tratamiento con ADNasa (dexosirribonucleasa), retrotranscripción y por último la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).

### ***Extracción de ARN***

Las células fueron lisadas y el ARN total extraído, mediante la técnica de extracción de ARN TRIZOL® (Invitrogen, Paisley, UK) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posteriormente se procedió a la cuantificación del ARN total presente en cada muestra, así como su grado de pureza utilizando el espectrofotómetro Nanodrop ND1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). El ARN se cuantificó mediante la medida de la absorbancia a 260 nm. De manera que una absorbancia de una unidad a 260 nm corresponde a 40 µg de ARN por ml ( $A_{260} = 1$ , entonces la concentración es de 40 µg/ml). Para que esta relación sea válida, las medidas se han de realizar en agua MilliQ. Además, se comprobó la pureza del ARN mediante el cálculo de la relación entre la absorbancia a 260 y a 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ). Para que las muestras puedan ser analizadas, los valores de esta relación han de estar entre 1,6-2,1.

### ***Tratamiento con ADNasa***

Este proceso es recomendable para evitar posibles contaminaciones de ADN que pudieran interferir en el proceso de la RT-qPCR. Para ello se usó el kit DNA-free® de AMBION (Ambion Inc, Austin TX), siguiendo las instrucciones del fabricante, lo que permitió eliminar la posible contaminación de ADN hasta niveles no detectables por una PCR rutinaria.

***Retrotranscripción y PCR cuantitativa a tiempo real***

La retrotranscripción o transcripción inversa implica la síntesis de ADN a partir de ARN. Se llevó a cabo a partir de 250ng de ARN total por cada pocillo y el uso de iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, California), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Todos los cebadores, tanto de los genes reloj analizados *CLOCK* y *PER2*, como el de control interno (*S14*) se obtuvieron de la casa comercial Biologio BV (Nijmegen, UK). Se utilizó la herramienta bioinformática PRIMER3, de acceso libre a través de internet en la dirección URL <http://primer3.wi.mit.edu/> para el diseño de los primers.

La PCR cuantitativa a tiempo real se realizó usando SYBR green Master kit (Invitrogen, Paisley, UK), y el Sistema de Detección de Secuencia iQ5 Real-time PCR según el proveedor (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, California).

Todas las muestras se hicieron por duplicado y el ARN mensajero (ARNm) de los genes reloj y el ARN ribosómico del control (ARNr) se amplificó en pocillos separados siguiendo las siguientes condiciones de temperatura y tiempo:

- 1º) 95° C durante 10 minutos.
- 2º) 40 ciclos repetidos de las siguientes condiciones:
  - 95° C durante 15 segundos (desnaturalización)
  - 57° C durante 30 segundos (Alineamiento/Extensión)

Una vez finalizada la RT-qPCR, se calculó la cantidad relativa de los transcritos usando la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  de acuerdo al manual del proveedor, donde Ct se define como los valores del umbral del ciclo del proceso de PCR, al cual la fluorescencia es significativamente superior a la fluorescencia basal. El  $\Delta Ct$  es la diferencia entre el Ct

de cada uno de los genes reloj estudiados y el Ct del gen control (S14); y el  $\Delta\Delta\text{Ct}$  es la diferencia entre el  $\Delta\text{Ct}$  de la muestra de interés (por ejemplo, en la que medimos expresión de genes reloj) y el  $\Delta\text{Ct}$  de la muestra control/calibrador (por ejemplo, en la que medimos expresión de genes control o housekeeping, como el S14)[83]. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias, y se le asigna el valor de 1 al grupo control (S14).

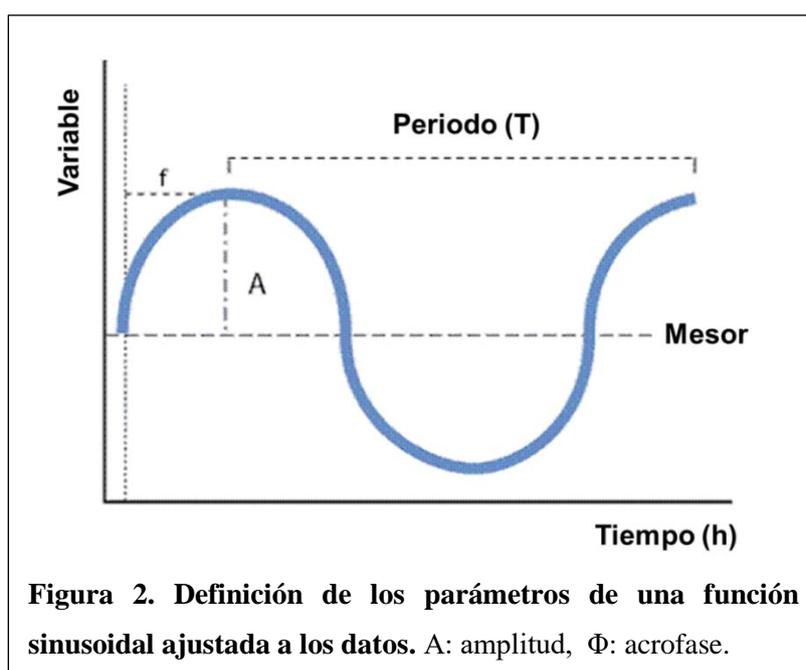
### 3 Análisis de los ritmos circadianos

El **método del Cosinor** es uno de los más utilizados en cronobiología médica para describir el comportamiento de variables rítmicas y se basa principalmente en el ajuste de los datos de una variable a una función coseno. Fue propuesto por Halberg y cols. (1972). Este método consiste en ajustar una serie temporal de N datos y (i),  $i = 1, 2, 3 \dots N$ , a una función coseno de tal forma que y (i) pueda ser expresada por  $y(i) = M + A \cdot \cos((360/T)t(i) + j)$ . Si a la función coseno le sumamos un valor constante, M (M= mesor, Mean Estimated Statistic Over- Rhythm; que aproximadamente suele coincidir con la media de los datos) obtendremos valores que se aproximan mucho más a los datos originales. En muchas ocasiones los datos de una variable se ajustan bien a una senoide. Ello permite obtener una serie de parámetros que describen objetivamente el ritmo de la variable. M es el valor medio de la función. A, es la amplitud o la diferencia entre el máximo (o mínimo) valor de la función y la media. T es el periodo del ciclo, este valor ha de ser previamente conocido para poder resolver la ecuación. J es el desplazamiento de fase, indica el tiempo que pasa desde  $t=0$  hasta el momento en que la función ajustada alcanza el valor máximo. Con este método pudieron medirse las siguientes variables (ya representadas anteriormente en la **figura 2**):

- Mesor (M): es el valor medio de un ritmo ajustado a la función sinusoidal.

- Amplitud (A): es el valor obtenido como la diferencia entre el valor máximo y el mínimo de un ritmo. Al usarse el método del cosinor, la amplitud es numéricamente igual a la diferencia encontrada entre el valor máximo o mínimo de la función sinusoidal y el mesor del ritmo ajustado.
- Amplitud relativa: se expresó como un porcentaje de los valores del mesor según la siguiente fórmula:  $\text{Amplitud Relativa} = (\text{Amplitud}/\text{Mesor}) \times 100$
- Acrofase ( $\Phi$  o  $f$ ): es la localización temporal del máximo valor de la función sinusoidal ajustada a los datos de una variable biológica. Como referencia para el cálculo de la acrofase se suele utilizar un momento definido por el investigador, habitualmente suele ser la media noche. Se mide en horas.
- Porcentaje del ritmo (PR: Percent Rhythm, por sus siglas en inglés): es el porcentaje de variabilidad considerado para una curva de coseno.

La significación de los ritmos se determinó por el rechazo de la hipótesis de amplitud cero con un umbral del 60%. De manera que aquellos genes con un porcentaje de ritmo igual o superior al 60% se considera que presentan ritmos circadianos en su expresión.



## 4 Muestras de tejido adiposo

Para alcanzar los objetivos 2 y 3 se utilizó tejido adiposo obtenido de cirugía de pacientes con obesidad severa, A continuación se describe los métodos que presentan en común los dos objetivos, posteriormente describiremos las metodologías en las que difieren, las específicas.

### ***PROTOCOLO COMÚN DE LOS DOS OBJETIVOS***

#### ***Obtención de muestras***

Las muestras de tejido adiposo se obtuvieron durante el proceso quirúrgico de bypass gástrico al que fueron sometidos los sujetos participantes, como se detalla más adelante en el **apartado 9** (Población de estudio). Las muestras de tejido adiposo subcutáneo se tomaron de la región abdominal-periumbilical y las de tejido adiposo visceral u omental de la región del epiplón. Para todos los pacientes, la toma de muestras fue siempre a la misma hora, entre las 11 horas y las 13 horas.

Inmediatamente después de la extracción, estas muestras se pusieron en tubos de 120 ml con medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 1 g/l de glucosa estéril y frío, y se transportaron al laboratorio durante los siguientes 30 minutos.

#### ***Establecimiento del cultivo in vitro***

Una vez en el laboratorio, se procedió a procesar el tejido adiposo.

Se procedió de la siguiente manera:

1º *Disección grosera*: se realizó poniendo el tejido en placas Petri estériles con un poco de medio de cultivo y separando los restos de piel, vasos sanguíneos y tejido conjuntivo con la ayuda de pinzas, y tijeras de disección.

2º *Disección fina*: se cortó el tejido en piezas de 2-3 mm de diámetro para conseguir aumentar la superficie de contacto del tejido con el medio de cultivo



El número total de células obtenidas, se evaluó mediante conteo en la cámara de Neubauer. Después, las células aisladas se pusieron en cultivo en placas de 6 pocillos (NUNC Corporation, United Kingdom) a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Cabe destacar que los adipocitos maduros se pusieron en placas de cultivo especiales para células en suspensión (Sarstedt AG & Co, Alemania), y evitar así su adherencia a la base de la placa.

### ***Sincronización de los adipocitos***

Con el fin de que las células en cultivo se encontraran en la misma fase, tanto los adipocitos como los preadipocitos se sincronizaron durante 2 horas, justo antes de iniciar el registro de bioluminiscencia, que se explicará en el siguiente apartado de este material y métodos.

Según el tipo celular se usaron agentes de sincronización distintos.

- Adipocitos maduros: se sincronizaron añadiendo medio de cultivo suplementado con 1 µl/ml de dexametasona a cada pocillo de la placa de cultivo.
- Preadipocitos: se sincronizaron con un pulso de SBF (50% de SBF, 50% de medio de cultivo) en la placa de cultivo.

Ambos agentes se han usado clásicamente en cultivos celulares como sincronizadores del sistema circadiano de los relojes periféricos [85].

## **6 Ensayo de la luciferasa**

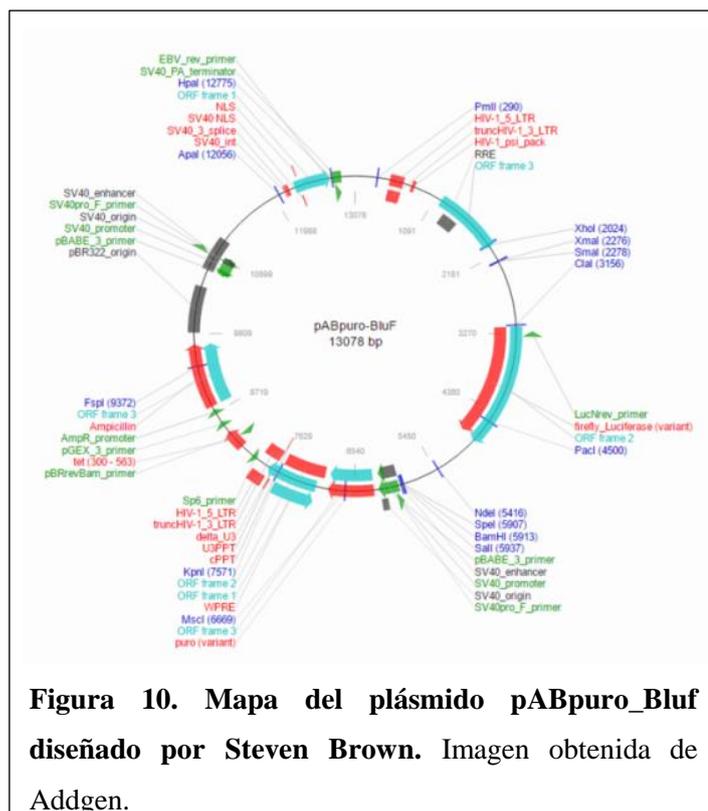
Para conseguir determinar la expresión de un gen reloj a tiempo real a lo largo de un periodo de tiempo, se usó un ensayo basado en la reacción de la bioluminiscencia. Este ensayo consiste en utilizar el gen *luc* de la luciferasa de luciérnaga para monitorizar la expresión génica a través del promotor del gen de interés. Este gen reportero de *luc* se

introduce en el ADN de la célula para ver la expresión génica mediante una propiedad fácil de medir: la bioluminiscencia[86]. Esta bioluminiscencia recogida a tiempo real, es directamente proporcional a la expresión del gen.

Para nuestro experimento en particular, antes debíamos obtener un lentivirus que contuviera este gen *luc* de expresión de la luciferasa, junto a la región promotora del gen reloj de interés, el *Bmal1* (cassete reportero *Bmal1:luc*), así como la capacidad para integrarlo en el genoma de nuestros adipocitos aislados.

### ***Generación de lentivirus***

Para la obtención de los lentivirus, se emplearon células humanas embrionarias de riñón (HEK293T), las cuales se mantuvieron en cultivo con DMEM suplementado con un 10% de SBF y una mezcla de antibióticos. Cuando alcanzaron entre un 50-80% de la confluencia, las células fueron transfectadas siguiendo las instrucciones del protocolo del fabricante (Xfect, Clontech) con 1 µg del cassette reportero *Bmal1:luc* contenido en el plásmido pABpuro-BluF (**figura 10**).



Este plásmido, que desarrolló por primera vez Steven Brown, se puede adquirir comercialmente (Addgene plasmid # 46824, [46]). Posteriormente, los virus se aislaron del sobrenadante del cultivo celular, y se concentraron mediante el protocolo de concentración Lenti-X (Clontech). Después fueron congelados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su futuro uso.

### ***Transducción de los adipocitos***

Transducción es el término genético que se utiliza para nombrar al proceso por el que se introduce material genético exógeno utilizando un virus como vector.

Por lo tanto, para transducir el inserto de interés desde el genoma lentiviral al genoma del adipocito, se usó  $8\text{ }\mu\text{g/mL}$  de Polybrene (107689, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) y  $6,5 \times 10^7$  de los virus transfectados con el reportero *Bmal1:luc*. Los virus se añadieron al medio de cultivo de los adipocitos maduros y los preadipocitos, y se dejaron entre 18-22 horas. Transcurridas el número de horas indicado, este medio se cambió por medio fresco.

Una vez que ya tuvimos el reportero *Bmal1:luc* insertado en el genoma de los adipocitos, y los adipocitos en cultivo, debíamos añadir el sustrato necesario para que finalmente se produjera la reacción de la bioluminiscencia (**figura 4**). Este sustrato es la luciferina que, en presencia de oxígeno, se oxida por medio de la luciferasa y se produce la bioluminiscencia.



**Figura 4. Reacción de la bioluminiscencia.** Fuente: elaboración propia.

Por lo tanto, después de eliminar los virus del sobrenadante, el medio de cultivo fresco se suplementó con 100 nM de D-luciferin sodium salt (L6882 Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri).

### ***Registro de la bioluminiscencia***

La bioluminiscencia emitida se midió en un lector de placas (BMG FLUOstar Galaxy) con incubadora (37 °C) cada 22 minutos durante un periodo de 3 días consecutivos ( $\approx$  72 horas).

## ***PROTOCOLO ESPECÍFICO DEL OBJETIVO 3***

### **7 Cultivo y sincronización de explantes del tejido adiposo**

Para el objetivo 3, con el fin de determinar la sensibilidad del tejido adiposo a la insulina, se utilizaron “explantes” de tejido adiposo de sujetos sometidos a cirugía por su obesidad

Para alcanzar el objetivo 3, una vez se había procesado el tejido (como se describe en el **apartado 4**), se llevó a cabo el establecimiento del cultivo de los explantes de TA subcutáneo y visceral en placas de 6 pocillos. Un explante se define como la parte viva de un organismo que se transfiere a un medio artificial para su cultivo *in vitro*. Los explantes del tejido adiposo son secciones de tejido adiposo de 2-3mm de diámetro que se cultivan como tal, como tejido, y no se digieren en adipocitos, como se hizo en el objetivo 2.

En cada pocillo se ponía una porción aproximadamente de 1500 mg con 2,5 ml de DMEM 4,5 g/l de glucosa suplementado con una mezcla de antibióticos (penicilina-estreptomicina), glutamina (GIBCO #10378-016), y un 10% de SBF. Para este

experimento, se empleaban sólo 4 pocillos de cada placa, dos para el cultivo del TA subcutáneo y dos para visceral.

Estas placas con los explantes se dejaban hasta el día siguiente a 37°C en una estufa con atmósfera humidificada de aire y CO<sub>2</sub> constante, durante el tiempo que se consideró como periodo de pre-incubación.

### ***Protocolo para el estudio de ritmos circadianos de la sensibilidad a insulina***

Para un ritmo circadiano típico hasta ahora se ha considerado aceptable determinar la variable cada 6 horas (obteniéndose 4 valores en 24 h). Sin embargo, en el presente estudio, y tras el periodo de pre-incubación, se tomaron muestras cada 4 horas durante un ciclo completo de 24 h (6 valores e incluso 7 valores para algunos sujetos participantes), lo que aumentaba la frecuencia de datos típica para evaluar un ritmo circadiano. Previamente al muestreo, los explantes fueron sometidos a una exposición con insulina durante 10 minutos (se explica más adelante).

Las horas seleccionadas para los muestreos, denominadas “tiempo circadiano” o CT (por sus siglas en inglés), fueron las 08:00 h A.M. ( *Circadian* time 0 o CT 0), 12:00 h P.M. (CT 4), 16:00 h P.M. (CT 8), 20:00 h P.M. (CT 12), 00:00 h A.M. (CT 16), 04:00 h A.M. (CT 20), e incluso en una subpoblación de 15 sujetos se tomó un séptimo valor a las 08:00 h A.M. (CT 24). Este valor fue útil para alcanzar el objetivo que se describe en el **apartado 8**. El CT0 (08:00 h) se eligió porque es el momento que coincide con la hora de despertar.

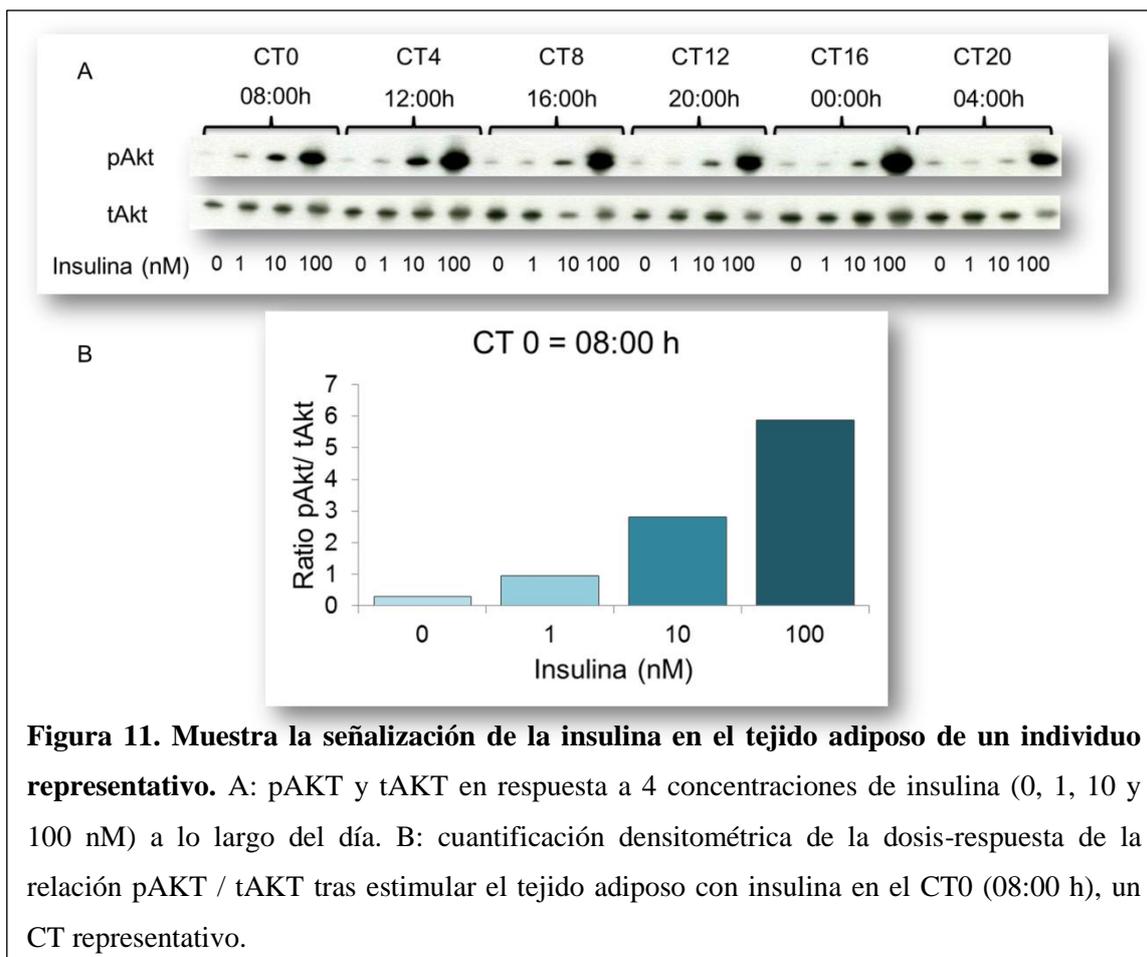
En resumen, teníamos un total de 6 placas de 6 pocillos, ocupando sólo 4 de ellos en cada una, en el interior de la incubadora.

## 8 Análisis de la señalización de la insulina

El objetivo principal de este estudio fue analizar la señalización de la insulina en los explantes del tejido adiposo a lo largo de 24 h y en respuesta a varias concentraciones de insulina (0, 1, 10 100 nM).

Para lograr este objetivo, se usó una gran muestra de TA de cada depósito (subcutáneo y visceral) por cada sujeto participante. Los explantes se distribuyeron en 6 partes iguales, una para cada uno de los 6 tiempos de ensayo (CT0, CT4, CT8, CT12, CT16, CT20), y se dispusieron en placas de 6 pocillos como previamente se ha explicado en el **apartado 7**.

La **figura 11** representa la señalización de la insulina en el TAS de un individuo representativo a lo largo de 24 h. Esta señalización se produjo en respuesta a diferentes concentraciones de insulina *in vitro*. En la **figura 11. A** se puede ver una imagen de western blot donde se aprecia la señal de pAKT y total AKT en respuesta a 4 concentraciones de insulina diferentes (0, 1, 10, 100 nM) a lo largo de las 24 h del día. La **figura 11. B** muestra, en un CT representativo, la cuantificación de la respuesta que se produjo entre la relación de ambas proteínas (pAKT/tAKT), a las dosis de insulina dadas. Esta cuantificación se realizó mediante densitometría, que es la técnica empleada para medir la densidad de un negro expuesto a la luz, como son las manchas del revelado de western blot.



Además, se estudió el punto de las 08:00 h (CT24) del día siguiente en una submuestra de 15 sujetos participantes. El objetivo fue determinar si, la sensibilidad a la insulina se veía afectada por la duración de la incubación *in vitro* del tejido adiposo, independientemente de la fase circadiana. Lo que se hizo fue comparar los valores obtenidos en los puntos CT0 con CT24.

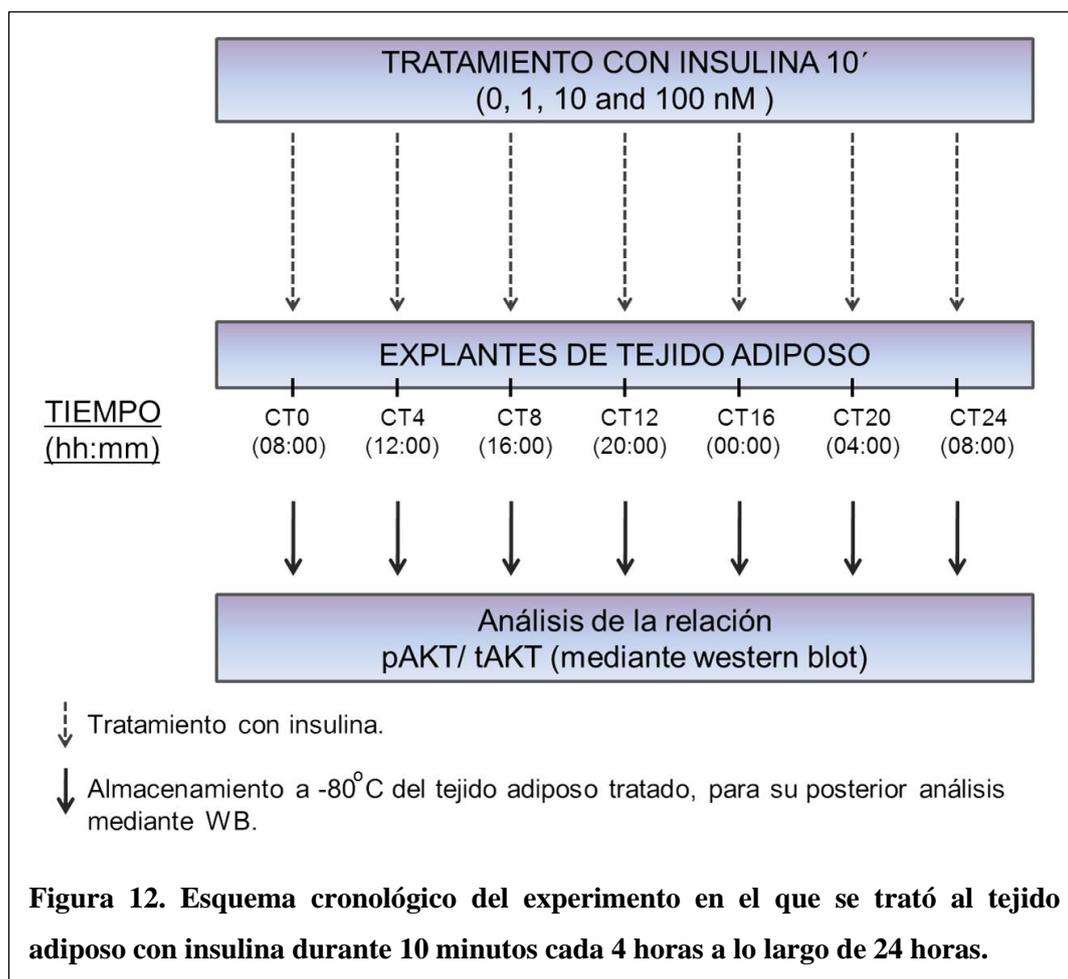
### ***Experimento de exposición a insulina***

A continuación, se explica el procedimiento experimental que se repitió en cada CT. Los explantes repartidos en las 6 placas de cultivo, que correspondía a cada uno de los 6 tiempos evaluados, se subdividieron entonces en 4 sub-partes para cada una de las 4 concentraciones de insulina. Cabe destacar, que se realizaron un total de 24 explantes

por depósito de grasa (subcutáneo y visceral), 48 en total por cada sujeto participante. En resumen, se hicieron 864 explantes entre todos los sujetos, llegando a alcanzarse casi los 1000 cuando se midió también un séptimo punto de tiempo, el CT24.

Además, las placas que correspondían a tiempos distintos, no tuvieron el mismo periodo de cultivo entre ellas, sino que este tiempo era 4 horas mayor cada vez, para cada placa.

El ensayo consistía en tratar a los explantes de TA durante 10 minutos con cuatro concentraciones de insulina (0, 1, 10, 100 nM). Estas concentraciones se prepararon en DMEM 1g/l de glucosa suplementando con insulina, según la concentración correspondiente. Transcurridos los 10 minutos de exposición, la reacción se paraba eliminando rápidamente el medio de cultivo y lavando con PBS. Inmediatamente se congelaban a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis mediante western blot (**figura 12**).



### ***Análisis de la acción de la insulina en el TA humano***

La acción de la insulina en el TA se determinó analizando el grado de fosforilación que presentaba la proteína AKT en los explantes cuando se estimulaban con insulina. El grado de fosforilación se calculó dividiendo el valor de pAKT entre el valor de tAKT (empleado como control de carga). Los valores de pAKT y tAKT se obtuvieron en primer lugar por WB, como se detalla más adelante, y más tarde se cuantificó la densidad de la mancha por densitometría. La densitometría se usa para evaluar la cantidad relativa de mancha y cuantifica el resultado en términos de densidad óptica (DO).

Por otro lado, la sensibilidad a la insulina se definió como el cambio relativo entre la fosforilación de AKT en presencia de insulina, y esta misma fosforilación sin ser estimulada con insulina. Un aumento en la relación o ratio pAKT/tAKT en presencia de insulina, comparado con el mismo en ausencia de insulina, indica que existe respuesta celular para una dosis dada de insulina.

Para comparar estos resultados entre sujetos diabéticos y no diabéticos se corrió otro gel de WB con muestras del mismo punto de tiempo. Se eligió el CT4 porque, como se verá en los resultados, coincide con el tiempo de mayor expresión del ritmo de la sensibilidad a la insulina. Esta comparación se hizo tanto en muestras no estimuladas como muestras estimuladas con insulina (10 nM) por cada uno de los sujetos. Todas ellas se pusieron en un mismo gel.

Este diseño experimental permitió determinar el efecto de los relojes periféricos en el TA en ausencia de la influencia del NSQ y de otros factores de confusión tales como el balance de nutrientes circulantes (por ejemplo, la glucosa, los ácidos grasos y los triglicéridos), el sistema nervioso autónomo, y hormonas como la insulina o los glucocorticoides).

***Análisis de proteínas mediante la técnica de western blot***

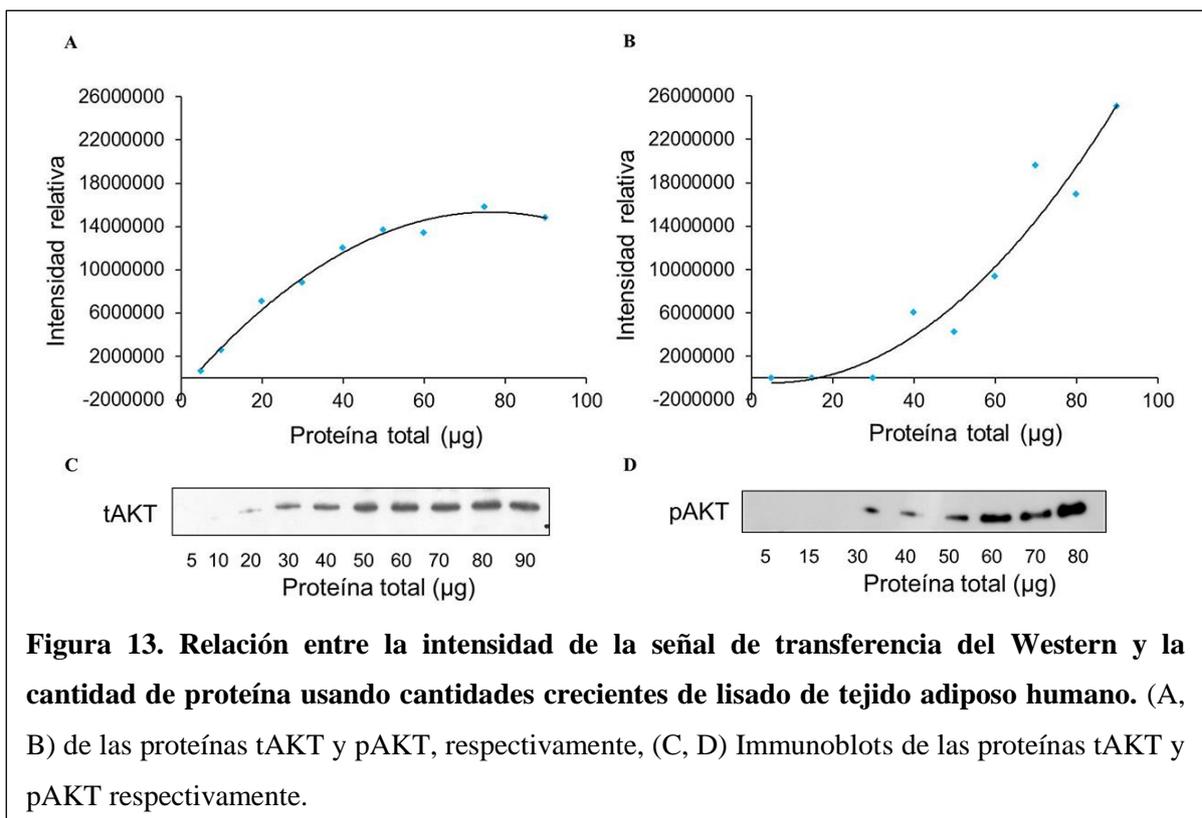
Los explantes se homogeneizaron en un tampón RIPA (sodium dodecyl sulfate o SDS al 0,1%, desoxicolato de sodio al 0,1%, Triton X-100 al 1% en PBS) y un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO y Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Posteriormente, los homogeneizados se sonicaron y se centrifugaron (20 min, 4°C, 7000 g).

Tras la centrifugación, se midió la concentración de proteína en los sobrenadantes usando el ensayo del ácido bicinchonínico (BCA). Se añadió el tampón de carga Laemmli (Bio-Rad Laboratories, Inc., US) y se calentaron las muestras a 95°C durante 5 min para conseguir la desnaturalización de las proteínas. Seguidamente, las muestras se separaron mediante SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, que luego se bloquearon en TBS-T (una solución salina tamponada con Tris, que contenía Tween al 0,1% y leche desnatada en polvo al 5%).

*Inmunotransferencia:* Cuando ya tuvimos toda la proteína en la membrana de nitrocelulosa, se realizó la inmunotransferencia, cuyo fin es el de detectar antígenos frente a la proteína de interés, pAKT y tAKT en nuestro caso, mediante anticuerpos específicos. Y posteriormente, mediante el uso de otro anticuerpo poder detectar la cantidad de proteína de interés que había en las muestras. Para ello, se usó una dilución 1: 2000 del Anticuerpo monoclonal anti-pAKT Ser473 de conejo (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts). Después de lavar las membranas, se incubaron con el anticuerpo anti-conejo de cabra conjugado con peróxido de rábano picante (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.) en TBS-T. La unión de anticuerpos se visualizó utilizando el sistema de detección de transferencia Western quimio-luminiscente Pierce (PerkinElmer, Madrid, España). Las membranas se volvieron a bloquear y se lavaron

con TBS-T. Finalmente, se trató con una dilución 1: 1000 de anticuerpo policlonal anti-tAKT de conejo (Cell Signaling Technology).

Para evaluar con qué cantidad de proteína se iba a trabajar para la consecución de estos western, se utilizaron cantidades crecientes de TA humano lisado. Los resultados se muestran en la **figura 13**. En ella se puede ver que las señales de transferencia del western son lineales hasta los 50  $\mu\text{g}$  aproximadamente, después el tAKT alcanza su punto de saturación, mientras que el pAKT continúa aumentando sin llegar a saturarse. Es por ello, que para permanecer dentro de la sección lineal de la curva de respuesta para pAKT y tAKT, todos los experimentos se realizaron con 30  $\mu\text{g}$  de proteína total.



### ***Densitometría***

Con el objetivo de cuantificar la cantidad de proteínas obtenidas, se realizó un análisis por densitometría de la densidad que tenían las bandas de pAKT y tAKT obtenidas en el WB. Esta densitometría para inmunotransferencias se realizó usando el programa Imagen J, versión 1.44 (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland). AKT total se utilizó como un control de carga de las proteínas, con el fin de normalizar cualquier variación en el contenido de proteína entre las muestras. Además, debido a que había demasiadas muestras para cada tejido y sujetos que se iban a correr en el mismo gel, se puso una muestra control del mismo tejido e individuo en cada gel. Esto se hizo para normalizar los valores de las muestras que se evaluaban en diferentes manchas.

## **9 Población de estudio de los objetivos 2 y 3**

Para los objetivos 2 y 3 se recopiló información sobre las características de la población de la cual se obtuvieron las porciones de TA empleadas en la presente tesis doctoral.

### ***Selección de los sujetos participantes en el estudio***

Para lograr estos dos objetivos, el tamaño de la muestra fue distinto (**Tabla 1**).

**Tabla 1. Tamaño muestral para los distintos objetivos de la presente tesis doctoral.**

<b>Objetivos</b>	<b>n</b>	<b>Edad media (años)</b>	<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>
2	16	46 ± 10	44 ± 11
3	18	46 ± 11	42 ± 6

Todas las características que aquí se recopilaron para todos los sujetos participantes en ambos estudios aparecen en una tabla adicional (ver **Anexo 1**)

Los sujetos participantes en el estudio eran pacientes que procedían del Servicio de Cirugía General del Hospital Universitario “Virgen de la Arrixaca”, que iban a someterse a cirugía de by-pass gástrico por su obesidad mórbida ( $IMC \geq 40 \text{ kg/m}^2$ ).

Los protocolos realizados en este trabajo fueron aprobados por el Comité de Bioética del Hospital Universitario “Virgen de la Arrixaca”. Además, todos ellos fueron debidamente informados de cuáles eran los objetivos del estudio, así como el modo en que ellos iban a contribuir en la consecución del mismo, y dieron su consentimiento informado tanto para la participación en el estudio, así como para la utilización de los resultados obtenidos, de acuerdo con los principios recogidos en la Declaración de Helsinki, y siguiendo las normas del Comité Ético de la Universidad de Murcia. Así mismo, se garantizó la total confidencialidad de todos los datos e informaciones relativas a los participantes, tal y como se observa en la Ley Orgánica para la Regulación del Tratamiento Automatizado de Datos de Carácter Personal (Ley Orgánica 5/1992).

### ***Estudio antropométrico y evaluación de la obesidad***

La evaluación de la obesidad de estos pacientes se llevó a cabo según los métodos establecidos por la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO).

#### ***Antropometría***

El peso se midió en una balanza digital, con el paciente portando ropa ligera y sin calzado, antes de cenar y con recto y vejiga evacuados, quitando manualmente una cantidad de 500 gramos antes de subir. La altura se midió con un estadiómetro tipo Harpenden (rango 0,70-2,05 m) (Holtain Ltd, Bryberian, Crymmich, Pembrokeshire,

UK), con el participante descalzo y erguido, y la cabeza alineada según el plano de Frankfurt (siguiendo la línea tragocomisural). A partir del peso y la talla de los pacientes se determinó su Índice de Masa Corporal (IMC) según la fórmula:  $IMC = \text{Peso (kg)} / \text{Altura}^2 \text{ (m)}$ .

### ***Porcentaje de grasa corporal***

El porcentaje de grasa corporal se evaluó mediante bioimpedancia, con un bioimpedanciómetro TANITA (TANITA Corporation of America, Inc, Arlington Heights, IL, USA) modelo TANITA SC-330 (**Figura 14**).



**Figura 14. Tanita modelo SC-330**

El analizador de la composición corporal TANITA® (Biológica Tecnológica Médica S.L.) analiza la bioimpedancia mediante el contacto de los pies con unos electrodos. La técnica de análisis por bioimpedancia se basa en el hecho de que los tejidos magros tienen un alto contenido en agua y electrolitos, y por tanto, funcionan muy bien como conductores eléctricos. En cambio, la materia grasa tiene un bajo contenido de agua corporal, y por lo tanto, no funciona como conductor de señales eléctricas. Así, es posible medir la resistencia al flujo de la corriente eléctrica

induciendo una señal eléctrica de baja energía (500 microamperios) y de alta frecuencia (50 kHz). Esta corriente pasa a través del electrodo situado en la parte anterior de la plataforma de la escala, mientras que el voltaje se mide en el electrodo posterior. La medida de la resistencia se relaciona directamente con el volumen del conductor, que se emplea para determinar el total de agua corporal, materia magra y finalmente, materia grasa del cuerpo. El porcentaje de grasa corporal se calcula mediante una ecuación que combina medidas de impedancia y peso con información de sexo, si son sujetos atléticos o estándar, la estatura y la edad.

Estas medidas se realizaron la tarde que el paciente ingresaba (12 horas antes de la intervención). Para asegurar una mejor fiabilidad de los datos, la medición se realizó con los individuos descalzos y cumpliendo las siguientes condiciones [87].

- No haber ingerido alcohol 48 horas antes de la prueba
- No haber realizado ejercicio intenso 12 horas antes de la prueba
- No haber comido ni bebido 4 horas antes de la prueba
- Haber orinado 30 minutos antes de la prueba
- No haber ingerido diuréticos 7 días antes de la prueba

Además del porcentaje de grasa corporal, la bioimpedancia da información de otros parámetros de composición corporal, como el contenido total de agua, el peso en kg de la masa grasa y el peso corporal libre de grasa. También calcula la tasa metabólica basal o el nivel de grasa visceral del individuo.

Para valorar el porcentaje de grasa corporal, además del estudio de bioimpedancia, se realizaron medidas de varios pliegues cutáneos. Estas medidas se hicieron con el sujeto de pie, en el plano lateral derecho del paciente, pinzando el pliegue cutáneo de grasa corporal con los dedos pulgar e índice de la mano izquierda. A

1 cm de la posición de los dedos se efectuó la medición con un plicómetro o compás de pliegues cutáneos tipo Harpenden metálico (Holtain Ltd, Bryberian, Crymmich, Pembrokeshire, UK) (**figura 15**), que ejerce una presión constante de 10 g/mm<sup>2</sup> en cualquier posición de apertura.

Una vez realizadas las diferentes medidas de los pliegues cutáneos, el porcentaje de grasa corporal se calculó según las siguientes ecuaciones:



A. Determinación de la densidad corporal (D) se realizó a partir de la ecuación de Durnin & Rahaman [88].

$$\text{Hombres: } D = 1,161 - 0,0632 \times X$$

$$\text{Mujeres: } D = 1,12581 - 0,072 \times X$$

Donde X corresponde al logaritmo decimal de la suma de los cuatro pliegues.

A partir de la ecuación anterior, se determina el porcentaje de grasa corporal según la ecuación de Siri [89], tal y como viene propuesta por la SEEDO:

B. El porcentaje de grasa corporal:

$$\% \text{Grasa Corporal} = ((4,95/D) - 4,5) \times 100$$

### ***Características del síndrome metabólico***

Para determinar las características del síndrome metabólico se realizaron diferentes medidas.

- *Cálculo de la distribución de la grasa corporal.* Mediante la medida de los siguientes perímetros:

- Circunferencia de la cintura: Se midió en la línea media entre el margen costal inferior y la cresta ilíaca [90].
- Circunferencia de la cadera: Se midió en el punto de mayor circunferencia a nivel de los glúteos [91].
- Circunferencia de muslo: Es el perímetro de la raíz del muslo, en sentido oblicuo y paralelo al pliegue inguinal [92].

Todas las medidas se realizaron con una cinta métrica flexible e inextensible. A partir de estas medidas se calcularon los índices de distribución:

- Índice cintura cadera (ICC) = circunferencia cintura / circunferencia cadera
- Índice cintura muslo (ICM) = circunferencia cintura / circunferencia muslo
- Índice de conicidad (IC) = circunferencia cintura / [0.109\*√(peso/altura)]

Según el perímetro de la cintura se puede dividir a la población en obesidad androide o visceral (Circunferencia de cintura > 94 cm. en hombres y 80 cm. en mujeres), u obesidad ginoide o glúteo-femoral (ICC < 94 en hombres y < 80 en mujeres). El IC [93] descrito por Valdez y cols., en 1993, considera la obesidad

abdominal como si se tratara de una progresión del cuerpo de una forma cilíndrica hacia una forma de doble cono, es decir, como dos conos con una base común a la altura de la cintura. Los valores de referencia varían entre 1,00 (cilindro perfecto) hasta 1,73 (doble cono perfecto).

También se midieron los diámetros sagital y coronal a nivel de la cresta ilíaca (L4-5) usando un sagitómetro abdominal tipo Holtain Kahn (**figura 16**).



**Figura 16. Sagitómetro abdominal tipo Holtain Kahn.**

Fuente: Elaboración propia

- *Determinaciones sanguíneas:* La misma mañana antes de la cirugía se recogieron muestras de sangre venosa con el paciente en ayunas 8 horas como mínimo siempre. Se recogieron en 2 tubos, uno con EDTA (anticoagulante) y el otro sin él, que fueron centrifugadas a una velocidad de 3600 gs durante 5 minutos, y obteniendo así muestras de suero y plasma también, que posteriormente fueron congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta ser analizadas.

El suero se utilizó para determinar los valores de glucosa, mientras que las demás determinaciones sanguíneas se llevaron a cabo a partir de las muestras de plasma.

Los parámetros incluidos en este estudio, así como los métodos para su determinación fueron los siguientes:

- Glucosa sérica: se midió por duplicado mediante el método de la glucosa oxidasa.
- Triglicéridos, colesterol total, HDL-colesterol y LDL-colesterol plasmáticos: se determinaron con kits comerciales (Roche Diagnostics MBH, Mannheim, Germany).

- *Presión Arterial*. El día antes de la intervención se midió a los pacientes tanto la presión arterial sistólica como la diastólica mediante un esfigmomanómetro de mercurio.

El score de SMet fue diagnosticado siguiendo los criterios de Zimmet y cols., descritos en 2005, con un valor máximo de 5 puntos [94].

## **10 Historia clínica y aspectos cronobiológicos de cada sujeto**

Además, de cada paciente, se recopiló información de relevancia clínica con respecto a la obesidad y aspectos cronobiológicos mediante cuestionarios, que se les realizaban el mismo día que la antropometría, es decir, la tarde previa a la cirugía.

### ***Cuestionarios***

Se realizaron teniendo en cuenta los datos básicos considerados por la SEEDO referentes a la evaluación y clasificación de la obesidad que deben constar en la historia clínica del paciente [95].

#### ***- Cuestionario general***

Los pacientes respondieron a las preguntas de un cuestionario en el que se evaluaron las siguientes características:

- Datos básicos generales (fecha de nacimiento, sexo, etc...)

- Hábitos fumadores y de bebida
- Antecedentes del peso (peso al nacer, mayor peso alcanzado, etc...)
- Antecedentes familiares del peso (abuelos, padres, hermanos, hijos e incluso pareja)
- Hábitos de actividad física diaria
- Antecedentes familiares
- Evaluación del estado depresivo del paciente
- Salud y enfermedad
- Diabetes Sí o No, así como tipo de tratamiento si lo hay
- Medicación crónica

- *Cuestionarios de hábitos de sueño:*

Los horarios habituales del sueño, así como los horarios de alimentación, fueron también evaluados por el mismo entrevistador, con preguntas que incluían:

- Hora habitual de ir a dormir y la hora de despertar
- Número de despertares durante la noche.
- Cuantas horas de sueño real tiene
- Calidad del sueño (dormir bien, regular ó mal)
- Hábitos de siesta sí o no
- Frecuencia y duración en minutos de la siesta

- *El horario de las comidas:*

Se le preguntó al paciente por la hora de inicio y fin de cada una de las comidas que realizaban al día, especialmente sobre las 3 principales del día, (desayuno, almuerzo, comida, merienda y cena).

## 11 Estadística

### *Ritmos circadianos en una línea celular primaria de adipocitos (PT-5020)*

Para comprobar que existían cambios en la expresión de los genes reloj debidos al transcurso del tiempo, se llevó a cabo un test ANOVA para muestras repetidas.

### *Ritmos circadianos en adipocitos primarios del TA humano*

Los datos en bruto de la bioluminiscencia, obtenidos tras 3 días de medición, se normalizaron restando a los mismos el valor del promedio de 24 horas. Con esos datos se determinó el periodo real de los adipocitos y preadipocitos, mediante una curva de ajuste al seno (GraphPad Prism 6, La Jolla, USA). Sólo aquellos datos cuya frecuencia fue menor de 0.3 se les consideró como rítmicos.

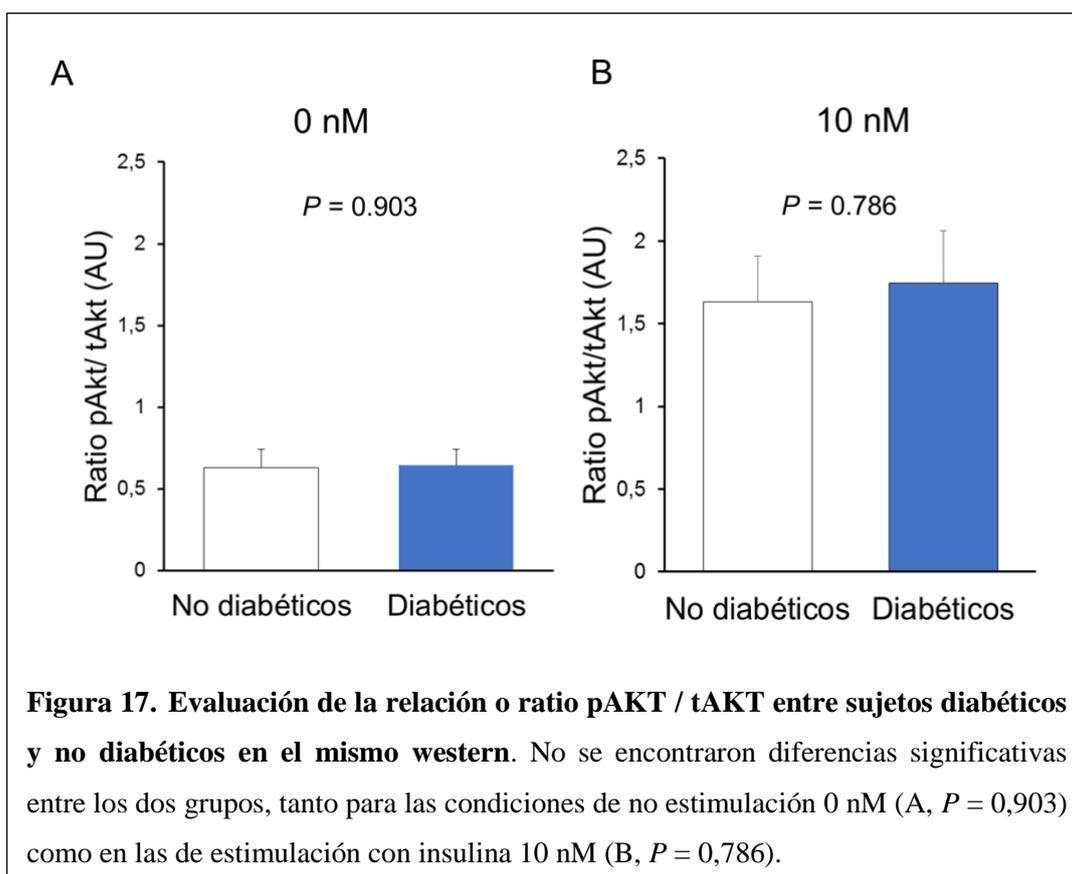
Para obtener los demás parámetros del ritmo como mesor, amplitud o acrofase se usó el método cosinor, explicado previamente (Ver **apartado 3**).

Las diferencias estadísticas para estos parámetros entre adipocitos y preadipocitos se analizaron mediante una prueba t de student. Las posibles asociaciones entre las características del ritmo con la edad, el grado de obesidad (IMC) o los hábitos de sueño de los sujetos estudiados se analizaron mediante un análisis de correlación con el coeficiente de Pearson.

### *Ritmos circadianos en la acción de una hormona en explantes de TA humano*

Las diferencias estadísticas en las características generales de la población diabética y no diabética se analizaron mediante la prueba t de student. Debido a que no hubo diferencias significativas entre los participantes diabéticos y no diabéticos para cada una de las características de los sujetos estudiadas y tampoco para la sensibilidad a la insulina del tejido adiposo ( $P = 0,786$ ) (**Figura 17**), todos los participantes fueron analizados juntos. Para investigar la presencia de un ritmo circadiano en la sensibilidad

a la insulina del TA, se utilizó una regresión periódica de mínimos cuadrados [96] para ajustar los datos a una función sinusoidal ( $T = 24h$ ). Las diferencias en la sensibilidad a la insulina entre el mediodía y la medianoche se analizaron con la prueba t-student pareada de dos colas.



Por otra parte, y con el fin de comprobar si hubo una oscilación circadiana real, o por el contrario, una tendencia lineal en la sensibilidad a la insulina a lo largo de 24 h, se realizó un modelo de regresión lineal para la relación de pAKT/tAKT. Para ello, se utilizaron todos los datos analizados (7 puntos). Éste análisis incluyó 3 factores fijos: 2 factores fijos para ajustar los datos a una ritmicidad de 24 h, el coseno y el seno, que juntos determinan la fase y la amplitud del ajuste, y 1 factor fijo para adaptarse a cualquier cambio lineal (JMP Pro 12, SAS software; SAS Institute, Cary NC, USA).

Para evaluar las posibles asociaciones entre las características del ritmo y las características de la población de estudio como la edad, el grado de obesidad (IMC), componentes del SMet, duración del sueño o momento de la ingesta de alimentos, se realizaron análisis de correlación con el coeficiente de correlación de Pearson.

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando IBM SPSS Statistics for Windows, Versión 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.). El nivel de significación para todas las pruebas estadísticas e hipótesis se estableció en  $P < 0,050$ .

## **12 Estudio bibliográfico**

La búsqueda de bibliografía se realizó consultando la base informática PubMed (U.S. National Library of Medicine) de acceso a través de Internet en la dirección URL [www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed) que accede a revistas de alto índice de impacto en el área en que se incluye esta tesis: obesidad, fisiología, metabolismo, biología molecular, etc.



## **IV. RESULTADOS**

---

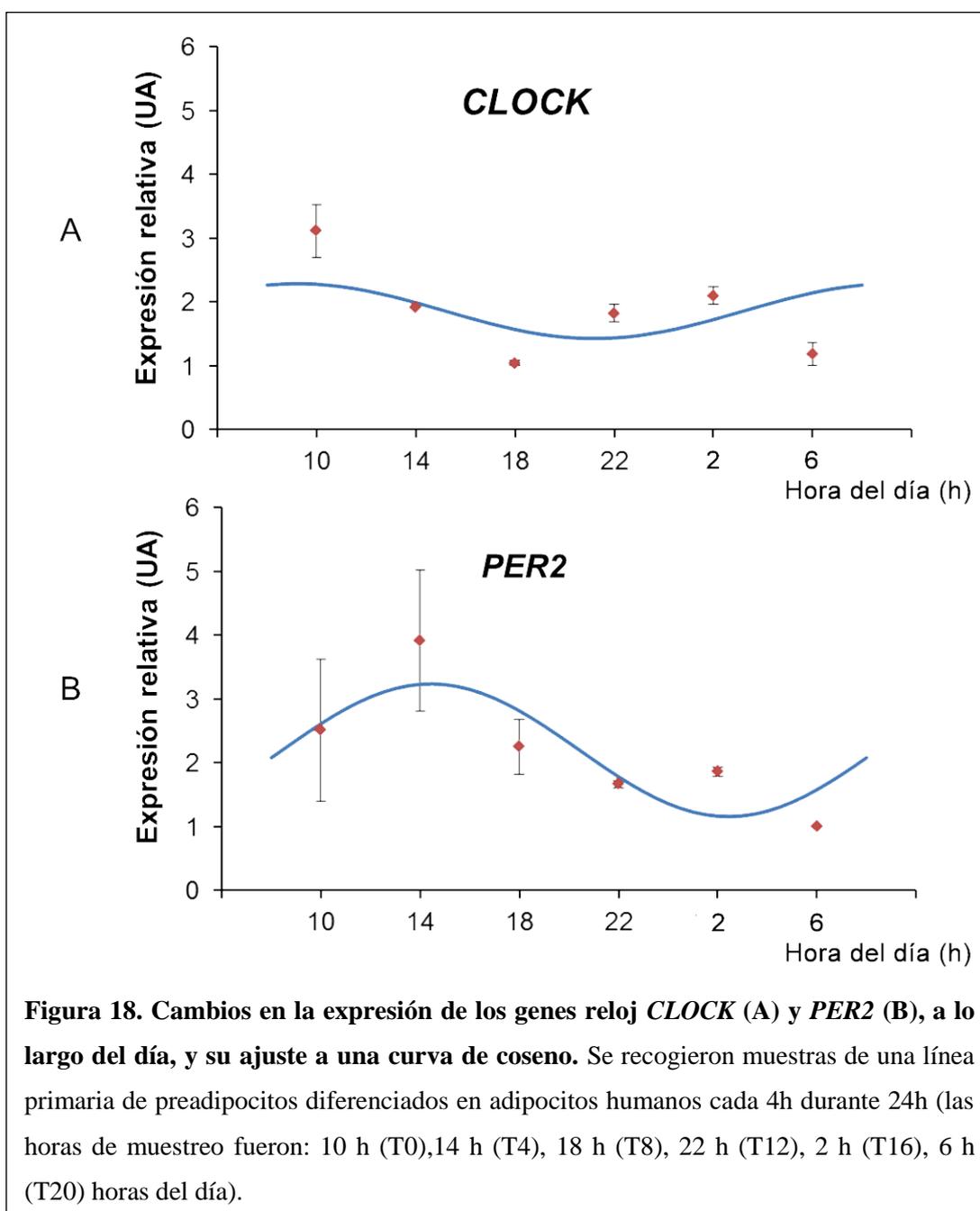


**1. Análisis de la presencia de ritmos circadianos en una línea celular  
primaria comercial de adipocitos humanos**



Con este trabajo fruto de esta tesis doctoral hemos demostrado la presencia de un reloj activo en una línea celular primaria comercial de tejido adiposo humano subcutáneo (PT-5020).

La **figura 18** muestra la expresión de los genes reloj estudiados, *CLOCK* (**fig. 18A**) y *PER2* (**fig. 18B**) a lo largo de las 24 horas del día. Nuestros resultados presentan un patrón circadiano diferente para cada uno de los dos genes estudiados en esta línea celular de adipocitos.



Un aspecto importante de la regulación de los genes *CLOCK* y *PER2* es que, por su papel dentro del sistema circadiano, sus ritmos de expresión deben ocurrir en una fase particular unos respecto a los otros. Como era de esperar, nuestros resultados indican que la expresión de ambos genes reloj se mostró en antifase uno con respecto al otro (**figura 18**). Mientras que la expresión del gen *CLOCK* (**fig. 18A**) aumentó por la mañana, el gen *PER2* (**fig. 18B**) presentó su máxima expresión por la tarde.

Los parámetros obtenidos tras el análisis cosinor tales como el mesor, la amplitud, la acrofase y el porcentaje de la varianza del ritmo, se muestran en la **tabla 2**. Nuestros datos indican que, de ambos genes estudiados, *PER2* fue el que mostró un ritmo circadiano robusto (PR= 66,58 %). Además, la expresión de *PER2* presentó una oscilación circadiana o amplitud de 1,04 (UA). El momento de mayor expresión del ritmo o acrofase (hh:mm) para este gen se produjo a las 14:42 h, alrededor del T4= 14h.

**TABLA 2. Parámetros del análisis cosinor para cada gen analizado.**

<b>Adipocitos humanos (línea celular primaria)</b>				
<b>Genes Reloj</b>	Mesor (UA)	Amplitud (UA)	Acrofase (h)	Porcentaje de ritmo (%)
<b><i>CLOCK</i></b>	1,86	0,43	9,20	20,35
<b><i>PER2</i></b>	2,20	1,04	14,43	<b>66,58</b>

Cuando se analizó la variación a lo largo del día de la expresión génica relativa (UA) del gen *CLOCK* mediante un test de ANOVA para muestras repetidas, se encontraron diferencias significativas ( $P= 0,020$ ), evidenciando la existencia de oscilaciones en su expresión a lo largo del día, aunque al no ajustarse de manera significativa a una curva coseno, no podemos afirmar la existencia de un ritmo circadiano.

**Resultados en relación al objetivo 1:** Los resultados del experimento muestran que esta línea celular primaria comercial de adipocitos humanos, presenta ritmos circadianos en el gen *PER2*, y oscilaciones diarias en el gen *CLOCK*. Este hallazgo abre una nueva puerta para el estudio del efecto de factores endocrinos, metabólicos, de sincronizadores como nutrientes, etc, sobre el tejido adiposo y su ritmo circadiano. Recomendamos que se estudie en estos casos el gen *PER2*.

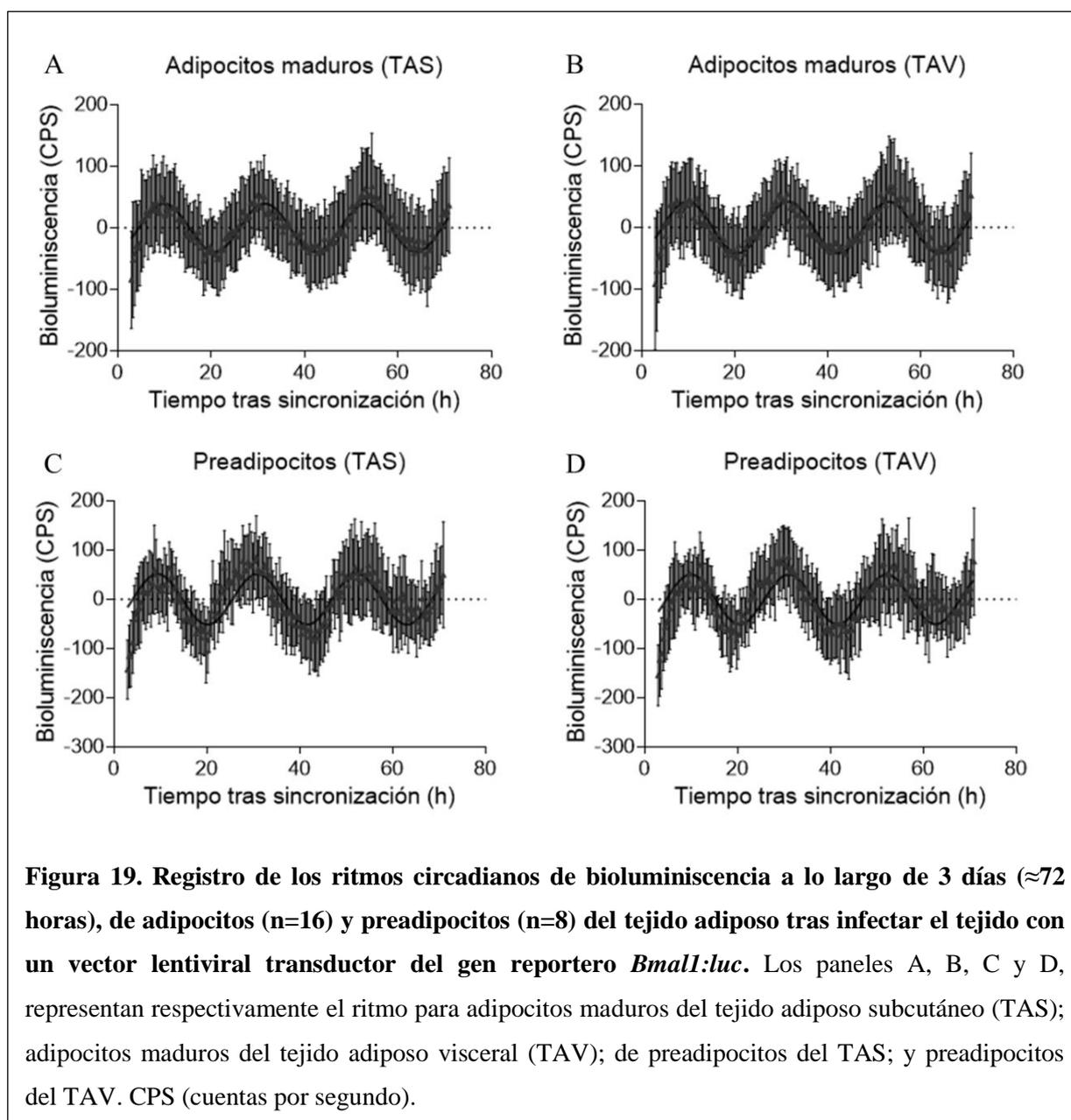


**2. Aplicación de la técnica de bioluminiscencia para evaluar los ritmos circadianos de adipocitos y preadipocitos primarios del tejido adiposo humano, subcutáneo y visceral**

**Subobjetivo:** Evaluar la relación de los ritmos circadianos observados, con las características de la población estudiada, como la edad, el índice de masa corporal o los hábitos de sueño.



En esta tesis doctoral, se ha analizado por primera vez 1) de manera continua (cada 22 minutos durante un periodo de 3 días consecutivos); 2) con poca cantidad de tejido (unos 4 gramos), los ritmos circadianos del reloj interno de adipocitos y preadipocitos primarios del TA humano. La detección del ritmo se consiguió mediante el uso de un gen reportero de bioluminiscencia unido al promotor del gen reloj *BMALI*. Tal y como muestra la **figura 19**, estas células exhibieron un ritmo robusto para el gen *BMALI*.



Para el estudio, con el fin de determinar el número de células vivas que existían en el cultivo tras la digestión con colagenasa del tejido adiposo del sujeto, se determinó el número de células/ml en cada pocillo, tanto en adipocitos primarios (media  $\pm$  DE) ( $2,65 \times 10^6 \pm 1,80 \times 10^6$  en TAS y  $2,34 \times 10^6 \pm 1,62 \times 10^6$  en TAV) como en preadipocitos ( $6,73 \times 10^6 \pm 2,70 \times 10^6$  en TAS y  $1,66 \times 10^7 \pm 9,24 \times 10^6$  TAV).

Además, con el fin de verificar que las condiciones del cultivo permanecieron constantes al inicio y al final de los tres días de experimento, se midieron sobre el medio de cultivo, los valores de osmolaridad y pH del primer y del tercer día (media  $\pm$  DE) (Inicial:  $344,56 \pm 8,85$  mmol/kg; Final:  $361,3 \pm 6,70$  mmol/kg) y pH (Inicial:  $7,16 \pm 0,24$ ; Final:  $7,5 \pm 0,41$ ).

Una vez detectado el ritmo por bioluminiscencia, los datos obtenidos se analizaron mediante el ajuste a una curva de coseno, que nos permitió conocer las características del ritmo tales como mesor, amplitud, acrofase y valor de significación ( $P$ ) que nos indica si el ritmo existe de manera estadísticamente significativa; por otro lado, para obtener el periodo se usó el análisis de los datos ajustados a una curva de seno. Los valores obtenidos para el ritmo de los adipocitos y los preadipocitos primarios, se muestran en la **tabla 3**.

Tras comparar las medias de estos parámetros en la población total estudiada mediante la prueba t-student, encontramos diferencias significativas entre los adipocitos maduros y los preadipocitos, para los valores de periodo, mesor y amplitud del ritmo. Estas diferencias se observaron tanto en el TAS como en el TAV (ver la **tabla 3**).

Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas para el momento en que se produjo la máxima expresión o acrofase (TAS  $P=0,692$ ; TAV  $P=0,919$ ) entre ambos tipos de células. En todos los casos analizados, esta acrofase ocurrió alrededor de las 10 h tras la sincronización de los cultivos celulares.

**Tabla 3. Estimación de los parámetros que caracterizan el ritmo de adipocitos maduros y preadipocitos primarios del TA humano.**

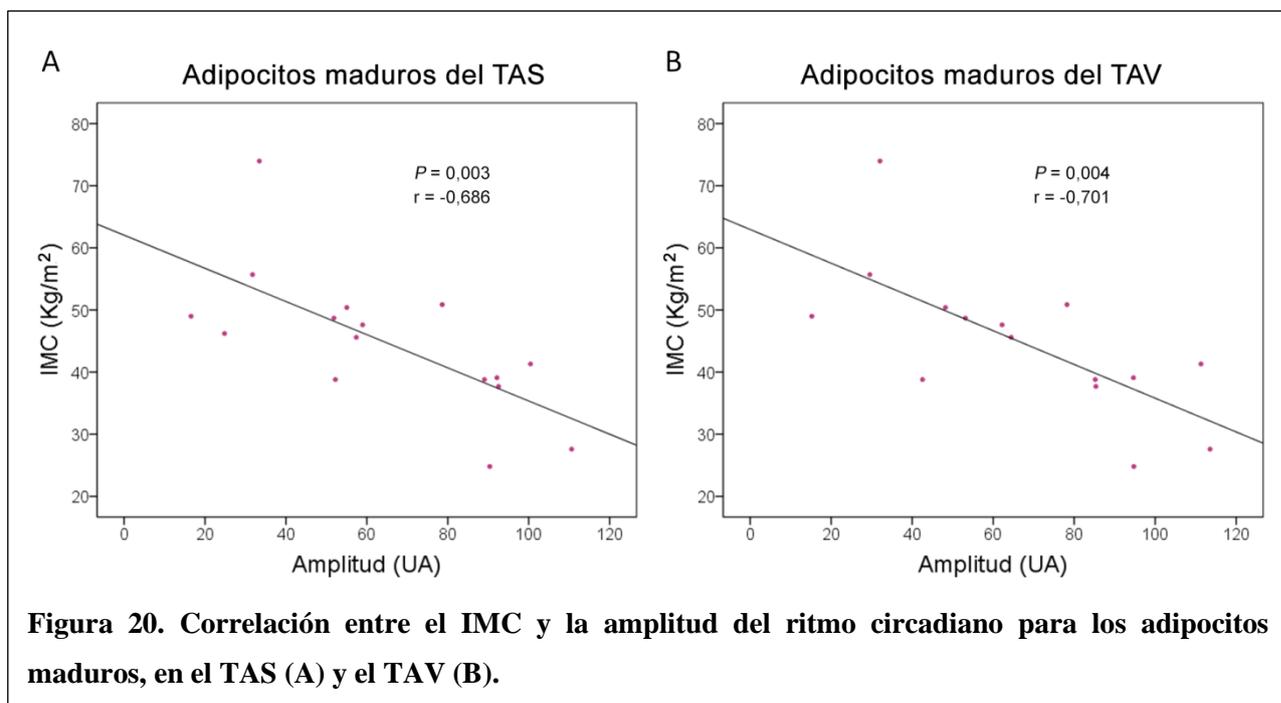
TAS		Periodo (T)	Mesor (UA)	Amplitud (UA)	Acrofase (hh:mm)	P del ritmo
Adipocitos (n=16)	Media	21,28	-11,51	64,73	10:20	< <b>0,001</b>
	DE	0,61	7,77	29,25	1:15	
Preadipocitos (n=8)	Media	20,64	-20,96	93,98	10:06	< <b>0,001</b>
	DE	0,88	14,14	31,25	1:15	
	P	<b>0,05</b>	<b>0,04</b>	<b>0,03</b>	0,69	
TAV		Periodo (T)	Mesor (UA)	Amplitud (UA)	Acrofase (hh:mm)	P del ritmo
Adipocitos (n=15)	Media	21,36	-11,53	67,35	10:22	< <b>0,001</b>
	DE	0,54	7,41	30,39	1:18	
Preadipocitos (n=8)	Media	20,51	-22,12	96,35	10:19	< <b>0,001</b>
	DE	0,93	15,88	30,71	1:17	
	P	<b>0,01</b>	<b>0,04</b>	<b>0,04</b>	0,92	

La acrofase se refiere a la hora de máxima expresión de *BMAL1* tras la sincronización de los cultivos celulares. UA (unidades arbitrarias); hh:mm (horas:minutos); DE (desviación estándar).

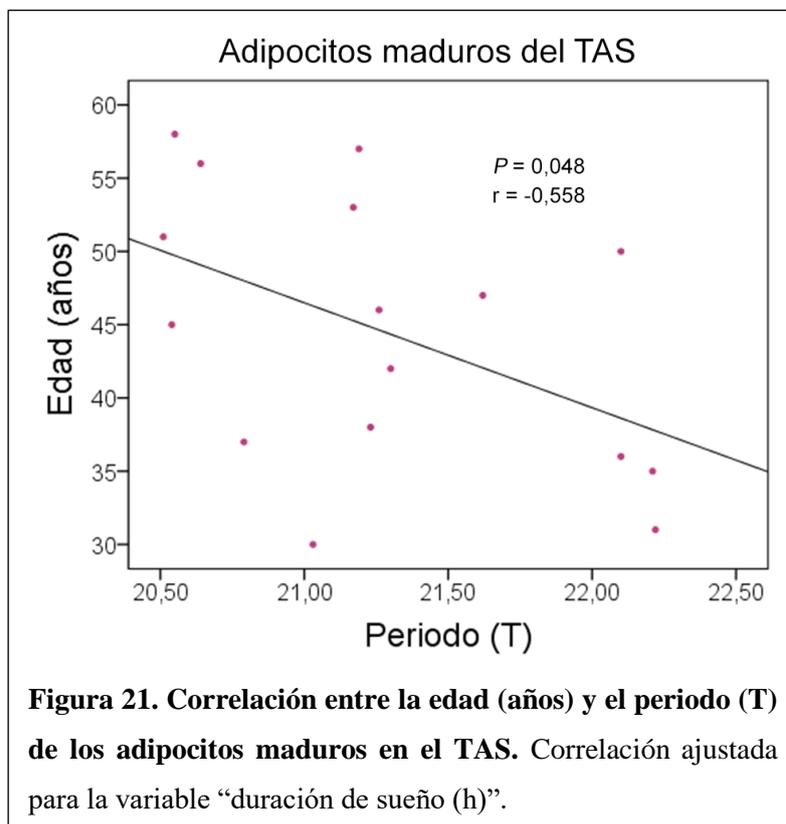
### Relación entre los parámetros del ritmo y las características de la población estudiada

Las características de la población estudiada para este objetivo se muestran en la **tabla 4** (ver **Anexo I**).

Cuando se compararon las variables que definen el ritmo con las características de la población estudiada, se encontró una correlación significativa entre el IMC y la amplitud del ritmo circadiano en adipocitos primarios maduros (**figura 20**). Esta correlación fue negativa para el TAS (**figura 20A**:  $P= 0,003$ ;  $r=-0,686$ ) y para el TAV (**figura 20B**:  $P= 0,004$ ;  $r=-0,701$ ), indicando que aquellos sujetos con un elevado IMC presentaron una menor amplitud del ritmo en adipocitos maduros del TA



Además, específicamente en adipocitos maduros del TAS, encontramos que la longitud del periodo tendía a ser menor al aumentar la edad de los sujetos ( $P = 0,064$ ;  $r = -0,474$ ). Sin embargo, tras ajustar por la variable “duración del sueño (h)”, esta correlación fue significativa ( $P = 0,048$ ;  $r = -0,558$ ) (**figura 21**).



**Resultados en relación al objetivo 2:** Los resultados del experimento muestran que la técnica de luminiscencia se puede aplicar en tejido adiposo humano procedente de cirugía, para el estudio de la ritmicidad circadiana de este tejido, y es útil tanto en tejido adiposo subcutáneo como en visceral, mostrando un ritmo robusto, con características marcadas, que pensamos será de gran ayuda para poder estudiar el efecto de nutrientes, hormonas, u otros factores metabólicos o sincronizadores.

Además los resultados muestran que con la edad se produce un acortamiento del periodo, y con la obesidad un aplanamiento del ritmo.



**3. Estudio de la presencia en el tejido adiposo humano de ritmos circadianos para la sensibilidad a la insulina**



### ***Análisis de los ritmos circadianos***

Los resultados de este experimento diseñado para dar respuesta al objetivo 3, muestran que los explantes de TA procedentes del depósito graso subcutáneo (TAS) obtenido de pacientes sometidos a cirugía, exhibieron ritmos circadianos robustos para la señalización de insulina. Esta ritmicidad se observó en los explantes que fueron estimulados con una concentración de insulina de 10 nM ( $P < 0,001$ ) (**figura 22**), así como en aquellos estimulados con 100 nM ( $P < 0,010$ ).

Es importante resaltar que estas oscilaciones diarias en los datos de sensibilidad a la insulina (determinada por el ratio pAKT/tAKT) se ajustaban de manera significativa a un periodo de 24 h ( $P = 0,029$ ).

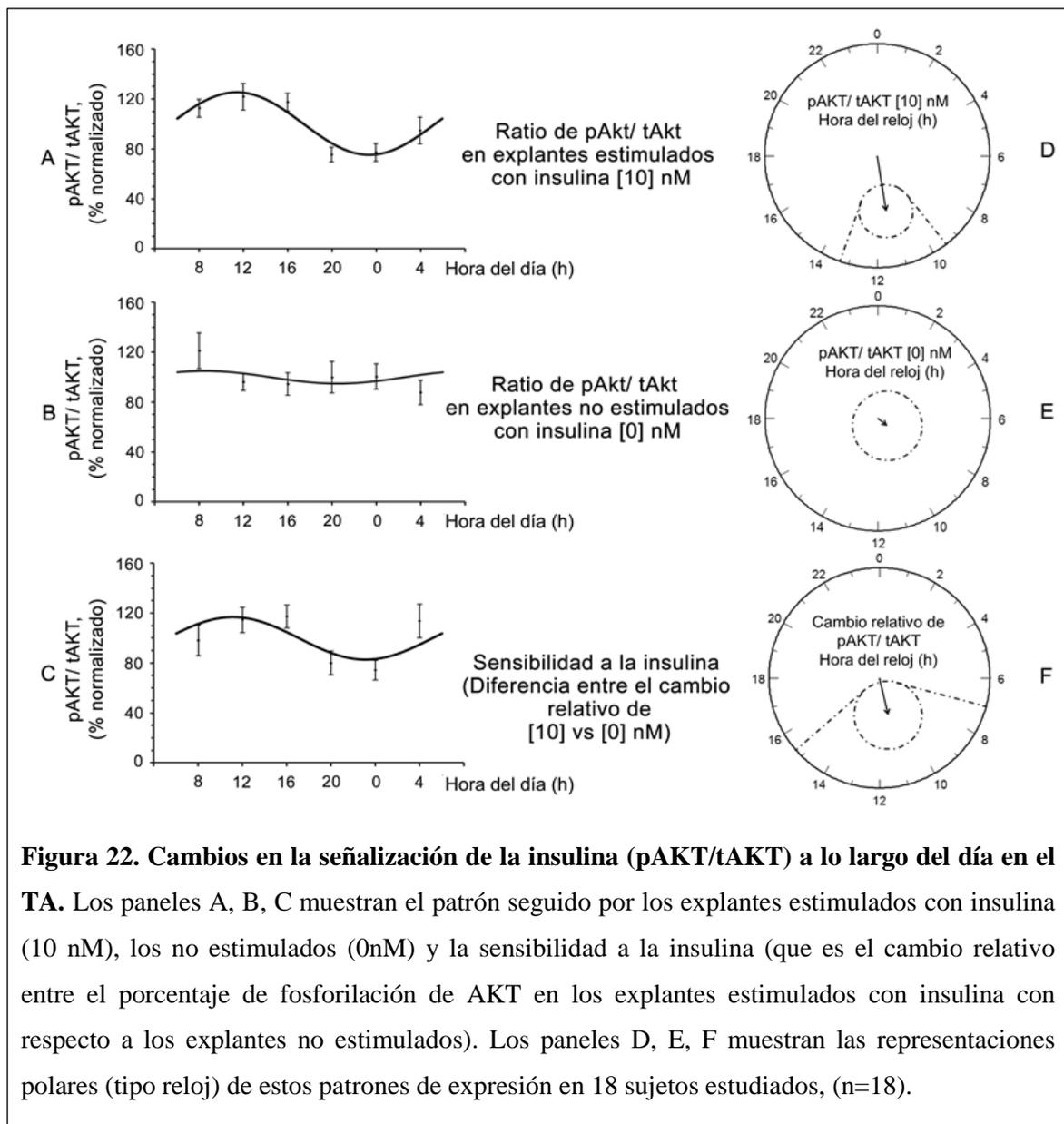
Además, estas variaciones a lo largo de las 24h del día fueron resultado de un ritmo circadiano interno, y no de una disminución de la viabilidad de los explantes con el paso de las horas, lo que se demostró gracias a los análisis estadísticos que mostraron que no había ningún cambio lineal significativo a lo largo de las 24 h ( $P = 0,40$ ).

Cabe destacar, que para representar el ritmo circadiano en la señalización de la insulina, se seleccionó la concentración de 10 nM. Esto fue así, porque con esta concentración se observaron mejores ritmos para el ratio de pAKT/tAKT en comparación con los observados con 1 nM y 100 nM.

Curiosamente, la sensibilidad a la insulina en el TAS alcanzó sus máximos valores (acrofase) alrededor del mediodía (**figura 22F**), siendo los valores de sensibilidad del tejido adiposo a la acción de la insulina 54% más altos que los observados hacia la medianoche ( $P = 0,009$ ) (**figura 22C**).

Además se estudiaron las características del ritmo de la sensibilidad a la insulina comparando la situación control, en ausencia de insulina, con la experimental, en presencia de insulina, siendo la amplitud del ritmo del: 17%; la acrofase, es decir la hora

de máxima sensibilidad a la insulina fue a las 11:06 h, y se obtuvo un valor  $P = 0,022$ . En la condición control sin insulina (0 nM), como era de esperar no hubo ritmo (Amplitud: 5%,  $P = 0,69$ ); y las características del ritmo obtenidas para la situación experimental en presencia de insulina (10 nM) fueron: Amplitud: 25%, Acrofase: 11:23 h,  $P < 0,001$ .

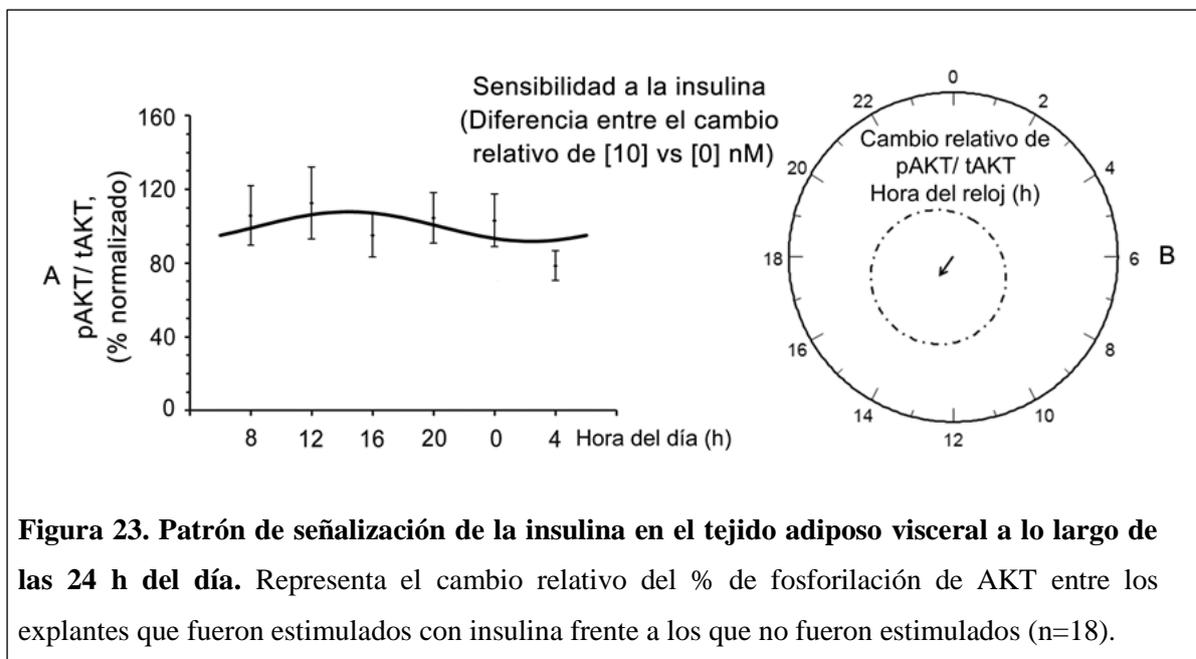


- *Representación del ritmo*

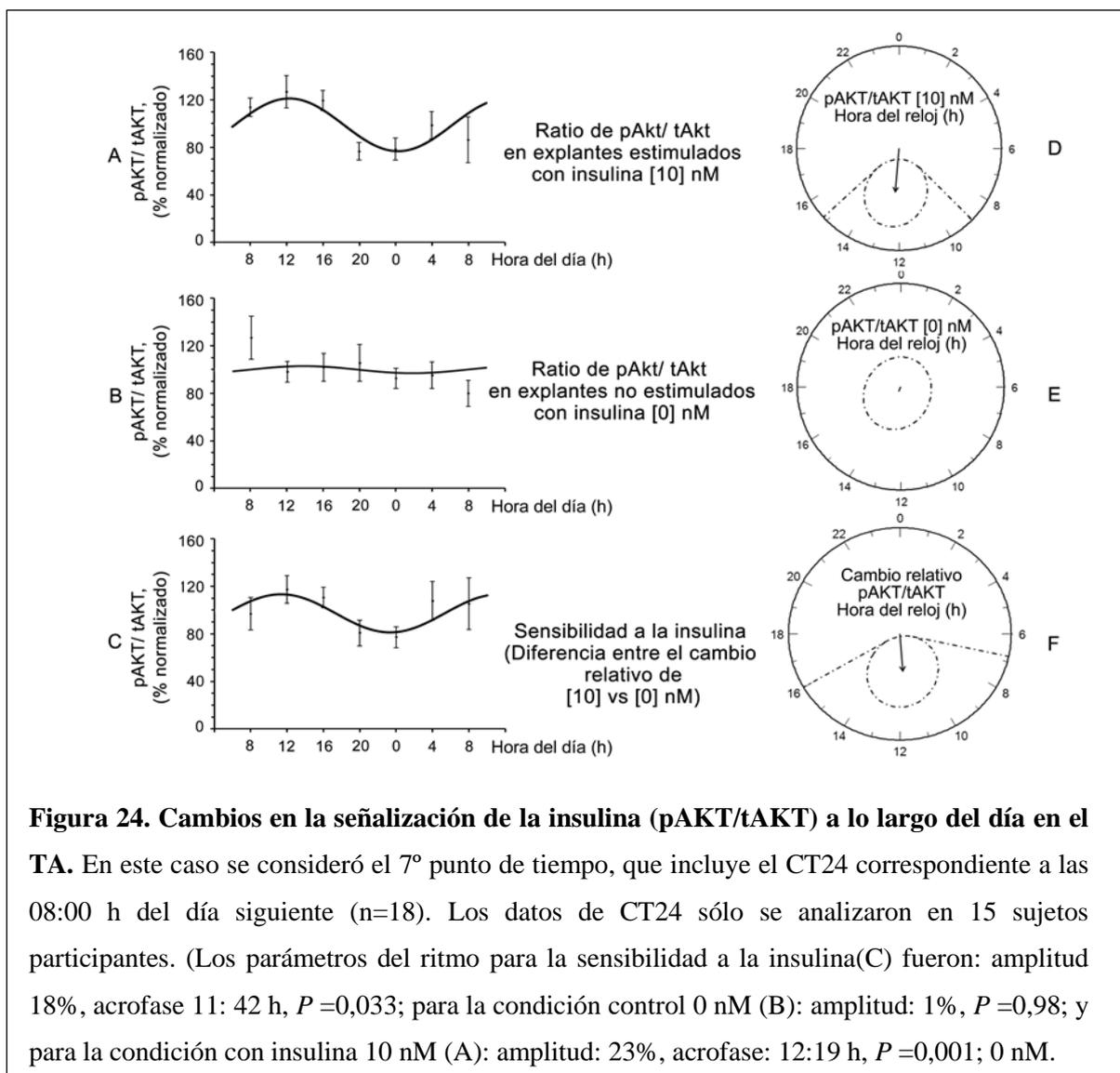
En las **figuras 22, 23 y 24**, se muestran dos tipos de gráficos para la representación del ritmo. A continuación, se explica de forma detallada cada uno de ellos:

- En el **gráfico lineal**, los puntos negros representan la media de los datos normalizados del ratio de pAKT/tAKT en cada uno de los tiempos en que se realizó el experimento de exposición a insulina, con su error estándar de la media (EEM) y la línea sólida corresponde al ajuste de esos datos a una curva sinusoidal.
- En la **representación de los diagramas polares**, los círculos muestran las 24 h del día y el radio apunta hacia su acrofase del ritmo, mientras que la longitud del vector representa la amplitud del ritmo y el tamaño es la mitad de lo que correspondería a la amplitud real. Las elipses punteadas muestran los límites de confianza del 95% para la longitud de los vectores, es decir la amplitud (si los límites de confianza incluyen el centro, el ritmo no se considera estadísticamente significativo). Mientras que las líneas discontinuas rectas son los intervalos de confianza correspondientes a las acrofases. Para ajustar los datos a una función sinusoidal, se utilizó una regresión periódica de mínimos cuadrados [96].

La **figura 23**, representa la falta de ritmos circadianos para la sensibilidad a la insulina en el TA visceral ( $P = 0,64$ ). Los parámetros del ritmo fueron (Amplitud: 8%,  $P = 0,64$ ).



Por otro lado, se comparó el CT0 con un séptimo punto temporal analizado (CT24= 08:00 h del día siguiente), en una submuestra de la población (n=15), y se encontró un patrón circadiano similar (**figura 24**). Además, no hubo diferencias significativas entre CT0 y CT24 ( $P = 0,49$ ), lo que demuestra que la sensibilidad a la insulina no se vio afectada por el tiempo que estuvieron los explantes en cultivo *in vitro*.



**Figura 24. Cambios en la señalización de la insulina (pAKT/tAKT) a lo largo del día en el TA.** En este caso se consideró el 7º punto de tiempo, que incluye el CT24 correspondiente a las 08:00 h del día siguiente (n=18). Los datos de CT24 sólo se analizaron en 15 sujetos participantes. (Los parámetros del ritmo para la sensibilidad a la insulina(C) fueron: amplitud 18%, acrofase 11: 42 h,  $P=0,033$ ; para la condición control 0 nM (B): amplitud: 1%,  $P=0,98$ ; y para la condición con insulina 10 nM (A): amplitud: 23%, acrofase: 12:19 h,  $P=0,001$ ; 0 nM.

### Relación entre los parámetros de ritmo y las características de la población.

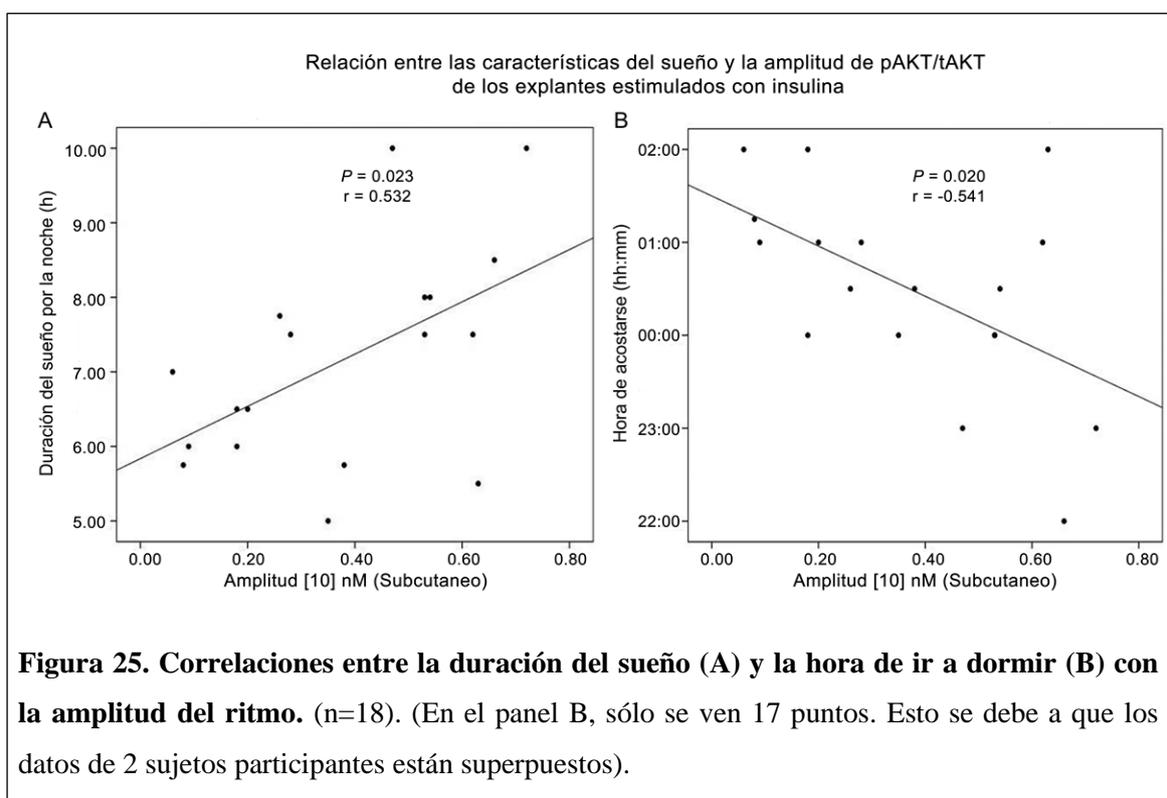
Las características de la población estudiada se representan en la **tabla 4** (ver **Anexo 1**).

Cuando se compararon los hábitos de sueño de la población estudiada con las características de los ritmos circadianos hallados, se obtuvieron los siguientes resultados:

Por un lado, se observó que la amplitud del ritmo circadiano de la fosforilación de AKT en el TAS, se correlacionó significativamente con la duración del sueño

( $r=0,532$ ;  $P=0,023$ ). Esta correlación fue positiva, lo que significa que una mayor amplitud del ritmo se relacionaba con una duración de sueño más larga (**figura 25A**).

Por otro lado, se encontró una correlación significativa y negativa entre la amplitud y la hora de ir a dormir del sujeto ( $r=-0,541$ ;  $P=0,020$ ). En este caso, lo que vimos fue que se produjo una mayor amplitud del ritmo cuanto más temprana era su hora habitual de ir a la cama (**figura 25B**).



Sin embargo, no se encontraron correlaciones significativas entre la amplitud del ritmo circadiano y otras características de los sujetos participantes como la edad, el IMC o la obesidad abdominal ( $P > 0,050$ ).

**Resultados en relación al objetivo 3:** Los resultados del experimento muestran la existencia de un ritmo circadiano para la sensibilidad a la insulina del tejido adiposo, siendo ésta un 54% mayor al mediodía que a media noche. Además, los ritmos de aquellos individuos que durmieron poco, o se acostaron más tarde en su vida habitual, estuvieron más aplanados.



## **V. DISCUSIÓN**

---



## **1 Sobre la existencia de ritmos circadianos en una línea celular primaria comercial de adipocitos humanos.**

En el presente trabajo se muestra la existencia de genes reloj en una línea celular primaria de TAS humano comercial (PT-5020). Estos resultados concuerdan con otros estudios llevados a cabo en explantes de TA humano en los que también se ha observado la presencia de estos ritmos circadianos en genes reloj [1]. Nuestros resultados corroboran la teoría de que los genes reloj no sólo se expresan en el NSQ (reloj central), sino que también lo hacen en tejidos periféricos como el TA, que existen incluso sin la influencia del reloj central, como se ha observado en estudios previos también realizados fuera del organismo, en condiciones *in vitro* [16-18].

Nuestro grupo de investigación demostró por primera vez la existencia de estos genes reloj en explantes de TA humano [30]. Un punto a tener en cuenta para el estudio de los ritmos circadianos en TA humano es la heterogeneidad celular. En dicho tejido predominan los adipocitos y preadipocitos, sin embargo, en personas obesas con morbilidades se ha observado una alta proporción de macrófagos debido que a que el tejido está inflamado de forma crónica [97, 98]. Esto nos hace pensar qué células son realmente las que muestran ritmicidad circadiana en modelos de estudio como las biopsias o los explantes del TA [36]. En este sentido, estudios sobre la ritmicidad circadiana en células adiposas como las 3T3-L1 de ratón [29, 99], o derivadas de células madre del TA (ASCs) [100], han proporcionado un fuerte apoyo a la presencia de un reloj circadiano en el interior de los adipocitos, que son el principal tipo de células metabólicas en el tejido adiposo [36]. Nuestros resultados en líneas celulares de adipocitos de TAS humano, sugieren que los adipocitos contribuyen de forma importante a la ritmicidad circadiana de los genes reloj observada previamente en

explantes de TA humano de sujetos obesos [1], y de mujeres pre y postmenopáusicas [101].

Por otro lado, se ha observado que no todos los genes reloj se expresan en la misma fase [35, 102]. De hecho, se sabe que los genes reloj considerados elementos positivos (*CLOCK* y *BMAL1*), se expresan en antifase respecto a los elementos negativos (*PER1-3* y *CRY1-2*). En este estudio, como era de esperar, observamos que la expresión de los genes reloj (*CLOCK*: positivo y *PER2*: negativo) en la línea celular primaria de adipocitos humanos se encuentra en antifase, tal y como se observó en estudios previos de nuestro grupo de investigación en explantes de TA humano [1]. Este hecho demuestra la naturaleza periódica de este tejido, observada también en modelos experimentales de ratón (estudio realizado por Zvonic y cols. en 2006 [19]). Por otro lado, en la línea celular estudiada observamos que *PER2* mostró mayor amplitud en su ritmo que el *CLOCK*. Estos resultados coinciden con los hallados en un estudio previo realizado en explantes de TA humano, donde el valor de la amplitud de *PER2* fue hasta 5 veces mayor que *CLOCK* [35].

Cuando realizamos el análisis relativo de los parámetros del ritmo teniendo en cuenta las horas reales del día a las que se llevaron a cabo los distintos experimentos, se observó que la acrofase de *PER2* ocurrió aproximadamente a las 14 horas (T4). Curiosamente ese fue también el momento de mayor expresión para este gen en explantes del TA humano en un estudio previo de nuestro grupo de investigación [33]. La oscilación circadiana o amplitud del gen *CLOCK*, fue menos robusta que la de *PER2*. Estos resultados concuerdan con los encontrados en otros estudios realizados en mucosa oral y piel de humanos [103], e incluso en otros mamíferos [104]. Sin embargo, cuando realizamos un test ANOVA de muestras repetidas con los valores de expresión de *CLOCK* en nuestra línea celular, encontramos diferencias significativas, lo que

sugiere que, existen cambios diarios en su expresión, aunque al no ser significativo por el método cosinor, no podemos demostrar que éste es un ritmo de naturaleza circadiana.

Cabe destacar, que en este experimento, las células analizadas no fueron sincronizadas con agentes sincronizadores inmediatamente antes de comenzar el muestreo. En este sentido, son varios los estudios que en las últimas décadas se han llevado a cabo sobre la regulación de la ritmicidad circadiana en los relojes periféricos, mediante el uso de sincronizadores. Los pulsos con suero [47, 99] y el uso de glucocorticoides como la dexametasona [28, 35, 105] u otros [85] han demostrado que son agentes capaces de modificar la fase sobre los genes analizados e incluso generar ritmos circadianos. Aun así, no está del todo claro cuál o cuáles son las señales transductoras que ponen en hora a los tejidos periféricos. Esta cuestión junto con lo observado en este trabajo con respecto a la hora de máxima expresión del gen *PER2*, confirma la necesidad de seguir investigando sobre la regulación de la fase de los relojes periféricos con nuevos diseños experimentales.

La técnica de análisis de la expresión de los genes reloj mediante la cuantificación de ARNm, presenta una limitación cuando se trabaja con cultivos *in vitro* de células del TA. Esto es debido a la particular naturaleza del adipocito blanco, cuyo citoplasma está ampliamente ocupado por una gran vacuola lipídica, y eso dificulta la extracción en muchas ocasiones. La extracción del ARNm de la línea celular utilizada en este trabajo, se realizó cuando los preadipocitos estaban totalmente diferenciados en adipocitos.

En resumen, tras los resultados obtenidos, podemos concluir que se demuestra que esta línea celular primaria de adipocitos humanos podría ser un modelo útil para el estudio de los genes reloj en el TA humano. Queda claro, que es necesario continuar investigando con ella, por ejemplo, con el uso de nuevas estrategias experimentales, como sería la monitorización continua a tiempo real de la expresión génica mediante bioluminiscencia. Se podría conseguir con ello, una información más precisa sobre la fase y el periodo de esta línea celular, mejorando así su potencialidad como recurso útil en el estudio de los aspectos cronobiológicos del TA humano *in vitro*.

## **2 Sobre la aplicación de la técnica de bioluminiscencia para evaluar los ritmos circadianos de adipocitos y preadipocitos primarios del tejido adiposo humano subcutáneo y visceral.**

Gracias a la utilización de la técnica de la bioluminiscencia, se han analizado por primera los ritmos circadianos en adipocitos y preadipocitos primarios del TA humano, subcutáneo y visceral, a tiempo real y durante tres días consecutivos. Ambos tipos celulares han mostrado un ritmo robusto para el gen reloj *BMALI*. Esta técnica, por tanto, nos ha permitido monitorizar *in vitro* la expresión de un gen reloj en células vivas procedentes directamente del tejido extraído como biopsia de una cirugía. Además, gracias a ella, hemos podido corroborar nuevamente la presencia de un reloj circadiano activo en el TA humano. De hecho, esta técnica ha demostrado ser útil para analizar la expresión génica a tiempo real en otros tejidos humanos, como fibroblastos primarios de piel [46], células primarias tiroideas [106], o en células de los islotes del páncreas [51]. Además, se ha empleado con éxito en explantes de otros mamíferos [107, 108], así como en otras líneas celulares inmortalizadas de humanos [52, 109], o de ratón [110]. Sin embargo, hasta nuestros hallazgos, no se había utilizado en tejido adiposo humano.

Cabe destacar que los sujetos de estudio eran personas con obesidad. Como se ha demostrado previamente, el TA de personas obesas con morbilidades puede tener un aumento anormal en la cantidad de macrófagos que puede llegar a influir en los ritmos circadianos del propio tejido [64, 65]. Es por ello que, al experimentar con explantes en estudios anteriores, nuestro grupo de investigación debía tener en cuenta la naturaleza heterogénea celular del TA. Gracias a la técnica de la bioluminiscencia estas dudas desaparecen ya que, aunque el TA procede de sujetos obesos, hemos encontrado unos ritmos circadianos robustos tanto en los adipocitos maduros como en preadipocitos (células aisladas del tejido) para el gen reloj *BMALI*. Este hecho, junto con la

demostración de los ritmos circadianos en la línea primaria de adipocitos (objetivo 1), refuerza la idea de que los adipocitos y preadipocitos contribuyen de manera importante a los ritmos circadianos exhibidos previamente en explantes de TA humano [1, 101].

Anterior a esta técnica, nuestro grupo de investigación analizó los ritmos circadianos de varios genes reloj, genes de glucocorticoides, así como de ciertas adipoquinas [31, 32] mediante la técnica de “Cultivo de biopsias realizadas en un solo punto (explantes de TA)”. Mediante esta técnica, tras la obtención de una sola biopsia, se obtenían explantes que se ponían en cultivo. Una vez establecido el cultivo, los explantes se recogían y congelaban a distintas horas del día para el posterior análisis de la expresión génica (mediante PCR cuantitativa) a intervalos de 4-6 horas durante un periodo de 24 horas. Aun así, esta técnica de cultivo presentó desventajas.

Una de ellas, fue el número de experimentos que se podían realizar. Éste dependía del tamaño de la biopsia obtenida durante la cirugía, pero como se mencionó anteriormente, el tamaño mínimo de la biopsia para obtener un ritmo circadiano fiable con esta técnica era de 12 gramos. En cambio, la técnica de la bioluminiscencia permite utilizar una biopsia de un tamaño menor. Específicamente en nuestro experimento solamente usamos 4 gramos de TA, para obtener los adipocitos aislados y los preadipocitos, que posteriormente fueron usados para el análisis de los ritmos circadianos.

Otra desventaja de la técnica anterior (“Cultivo de biopsias realizadas en un solo punto (explantes de TA)”), que se solventa con la técnica de la bioluminiscencia, es que aquella resultaba invasiva para las células del cultivo primario. Con la nueva técnica no es necesario congelar las muestras para su análisis posterior, sino que los resultados se registran a tiempo real, y las células permanecen vivas durante el proceso. Por otro lado,

cabe destacar, que la amplitud del ritmo de bioluminiscencia en nuestras células no disminuyó durante los tres días de medición, tal y como ya se observó en estudios anteriores [111, 112], en los que esta medición se realizó durante más de tres días seguidos. En nuestros resultados, este hecho pudo estar determinado por las condiciones de los cultivos, las cuales permanecieron estables durante los días de medición, tanto en pH como osmolaridad.

La dificultad que supone extrapolar los resultados obtenidos del cultivo *in vitro* a las características fisiológicas que se dan *in vivo*, es otra desventaja que nos encontramos con la técnica de cultivos de explantes usada previamente. Sin embargo, es una técnica ideal para el estudio del carácter circadiano del tejido adiposo, ya que se estudia fuera del organismo y demuestra que los ritmos son propios del tejido, ya que existen al menos tres días a pesar de no presentar el efecto del NSQ.

Además, el análisis de la expresión génica a tiempo real mediante el uso de reporteros de bioluminiscencia, ha permitido una estimación precisa del periodo y la acrofase del ritmo de los adipocitos y preadipocitos del TA humano. En cuanto a la estimación de la fase, esta técnica ofrece una gran ventaja respecto a las usadas previamente. La técnica del cultivo de biopsias únicas, tras el cual se recolectaban muestras independientes de esa única biopsia para el análisis del ritmo, ofrecían un total de 4-6 datos en 24 horas [1, 28, 31, 32, 35]. Con la nueva técnica, en cambio, hemos obtenido unos 200 datos en tres días de registro de bioluminiscencia (cada 22 minutos). Por tanto, hemos conseguido un mayor conjunto de datos para un mismo intervalo de tiempo, así que el cálculo de la fase y el periodo obtenidos, es más preciso y acorde a la realidad que se produce *in vivo*.

Cuando se analizaron las características que definen los ritmos circadianos, encontramos que el momento de máxima expresión o acrofase para el gen *BMAL1*, en adipocitos maduros y preadipocitos, fue aproximadamente alrededor de las 10:00 h. Nuestros datos coinciden con resultados obtenidos para este mismo gen en explantes de TA humano [60]. Por otro lado, nuestros resultados muestran que el periodo del ritmo del gen *BMAL1*, del TA de obesos mórbidos, fue aproximadamente de 21 horas. Estos mismos resultados se han encontrado para otro gen reloj (*PER1*) en una línea celular humana de neuroblastoma, un tipo de cáncer del tejido nervioso [109]. En cambio, otros estudios en tejido sanos han mostrado que la longitud del periodo del gen *BMAL1* fue de aproximadamente de 24-25 horas. Es el caso de los estudios realizados en células pancreáticas de sujetos que sufrieron muerte cerebral (periodo de *BMAL1*: 23,9 horas) [51], en fibroblastos primarios humanos procedentes en su mayoría de sujetos sanos (periodo de *BMAL1*: 24,5 horas) [46] o en otras líneas celulares de adipocitos inmortalizadas, procedentes de ratón (periodo de *Bmal1*: 25,0 horas) [110]. En general, estos datos sugieren que la longitud del periodo depende del estado fisiopatológico del sujeto estudiado, y su acortamiento en este estudio se deba a que los pacientes estudiados presentan obesidad severa.

En este sentido, también encontramos una correlación significativa e inversa entre la edad y el periodo de los adipocitos del TAS, tras asumir que todos los sujetos dormían el mismo número de horas al día. Observamos que el periodo en los adipocitos del TAS se acortaba cuanto mayor era la edad de los sujetos. Estos hallazgos coinciden con los de otros mamíferos [113, 114], aunque en mamíferos se ha demostrado que es el periodo del reloj central o NSQ el que se asocia de manera inversa con la edad, mientras que no se ha encontrado esta asociación en los relojes periféricos [115], Esto sugiere que el acortamiento del periodo podría ocurrir en tejidos periféricos con funciones

metabólicas más importantes, como es el TA, o quizás que el acortamiento observado en este estudio se deba a factores relacionados con la obesidad. Por lo tanto, se deberían realizar estudios posteriores en cultivo del TA *in vitro* de animales de experimentación, con esta misma técnica para resolver esta aparente contradicción.

Aun así, nuestros resultados coinciden con los estudios clínicos y epidemiológicos que demuestran que en humanos el funcionamiento del sistema circadiano varía en función de la edad: durante el envejecimiento normal, la función del reloj se atenúa, con consecuencias tanto para la salud como para la calidad de vida [53]. De hecho, un ritmo circadiano en edades avanzadas se caracteriza por ejemplo, por poseer una acrofase avanzada o una disminución de la amplitud [116, 117].

Cabe destacar, que se observaron diferencias significativas en la amplitud del ritmo entre los adipocitos maduros y los preadipocitos. Concretamente, los preadipocitos presentaron valores más elevados de amplitud que los adipocitos maduros, contribuyendo así con una mayor robustez a la ritmicidad circadiana del TA que los adipocitos maduros. Sin embargo, un trabajo previo realizado en la línea celular de ratón 3T3-L1 y en condiciones similares de cultivo, mostró que fueron los adipocitos los que presentaron valores más altos de amplitud que los preadipocitos [28].

Por último, nuestros resultados muestran una correlación significativa entre la obesidad (IMC) y la amplitud del ritmo, de manera que cuanto mayor es el grado de obesidad, medido mediante el IMC, menor es la amplitud del ritmo en adipocitos tanto del TAS como del TAV. Nuestro grupo de investigación demostró resultados similares cuando se estudió el ritmo circadiano de adiponectina, en explantes de tejido adiposo humano, con una disminución de la amplitud del ritmo circadiano de adiponectina conforme aumentaba el IMC de los pacientes estudiados [32] .

En resumen, el uso de la técnica de bioluminiscencia por transducción viral es una técnica útil para medir ritmos circadianos continuos en el cultivo primario de adipocitos y preadipocitos humanos, así como para conocer su implicación en determinados procesos fisiológicos, gracias a la posibilidad de compararlos con las características de la población estudiada.

### **3. Sobre el estudio de la presencia de ritmos circadianos intrínsecos para la sensibilidad a la insulina en el tejido adiposo humano**

Los resultados del presente trabajo permiten afirmar por primera vez que el TA humano presenta un ritmo circadiano robusto, que contribuye a la eficacia de una hormona en su papel funcional en dicho tejido.

La sensibilidad a la insulina en el TAS humano muestra un ritmo circadiano que alcanza su acrofase alrededor del mediodía, siendo la sensibilidad del tejido adiposo a la insulina, hasta un 54% más alta a las 12 del mediodía que hacia la medianoche (12 de la noche). Cabe destacar, que la amplitud de este ritmo se correlacionó positivamente con la duración del sueño y negativamente con el momento de acostarse *in vivo*, de tal manera que en los pacientes cuya duración del sueño fue mayor, la amplitud del ritmo era mayor, mientras que aquellos que se acostaban tarde presentaron una amplitud para la sensibilidad a la insulina menor, que los que se acostaban pronto.

Una consideración importante es que este ritmo persiste *in vitro* durante al menos 2 días después de la cirugía. Además, lo más interesante es que este ritmo es circadiano, ya que además de tener un patrón que se ajusta al coseno, existe a pesar de no presentar la influencia del NSQ, ya que los explantes tienen el ritmo marcado en la placa de cultivo. Tampoco tienen ya el efecto sincronizador procedente de otros factores neurohumorales o incluso de la propia circulación variable de los nutrientes, cuando el paciente come o está en ayunas [22]. La importancia de este estudio reside pues en que se ha hecho *in vitro*. Si se hubieran realizado biopsias seriadas, no podríamos distinguir si el ritmo es circadiano, es decir como consecuencia de un reloj propio del tejido adiposo, o si por el contrario está marcado por el reloj central, o por los hábitos propios del sujeto, como hora de la comida, etc.

Los resultados observados en el TAS confirman que el reloj circadiano presente en el interior del adipocito desempeña un papel fundamental en la sensibilidad a la insulina a lo largo del día [22].

En humanos se ha observado que, tras realizar una comida o administrar una carga oral o intravenosa de glucosa, los picos de glucosa en plasma son notablemente más altos por la noche que por la mañana [75-77, 118, 119]. Además, la sensibilidad a la insulina es más alta por la mañana que por la noche [74, 118]. Nuestros resultados *in vitro* nos pueden ayudar a comprender lo que ocurre *in vivo*.

Shapiro y cols., [120] llevaron a cabo un estudio *in vivo* en el que se realizaba una infusión de glucosa intravenosa a velocidad constante durante 24-30 horas. Demostraron que la glucosa circulante en plasma aumentaba a medida que avanzaba la noche, alcanzando valores máximos en torno a la media noche (con un rango de entre las 00: 45-03: 50 h). Estos resultados dan sentido a los nuestros, en los que vemos que los valores mínimos de sensibilidad a la insulina se obtuvieron a media noche.

La adiponectina, una citoquina que se produce únicamente en el TA, parece tener un papel protector frente a la resistencia a la insulina [121]. Su mayor grado de expresión en el TAS se alcanza por la mañana, alrededor de las 10:00h [32, 60], lo cual concuerda con nuestros resultados en los que se demuestra que la sensibilidad a la insulina alcanza su máximo (acrofase) alrededor del mediodía. Estudios realizados en condiciones similares a las nuestras (con explantes de TA de obesos extremos), demuestran que la adiponectina está regulada por el reloj circadiano [122] y que su ritmicidad no se debe al ciclo de ingesta/ayuno [123].

Una aportación importante de este estudio es que el ritmo diario en la señalización a la insulina parece ser intrínseco del TA, y que no depende de los ritmos diarios de los valores de nutrientes circulantes en el organismo. De hecho, nuestros

resultados demuestran que los ritmos diarios de tolerancia a la glucosa se deben principalmente al sistema circadiano y no a la conducta [119]. Además, los datos obtenidos en este estudio podrían explicar, en parte, las observaciones que han relacionado comer en desajuste con el reloj biológico (como cenar tarde o cuando se trabaja a turnos) y un mayor riesgo de diabetes [124-126].

El ritmo circadiano intrínseco que presenta el TAS podría ser útil para explicar el ritmo diario de sensibilidad sistémica a la insulina. Esta contribución puede resultar particularmente relevante para personas con obesidad extrema, cuyo TA representa más de un 40% de su peso corporal, como es el caso de los sujetos participantes en este estudio. Además del TA, existen otros factores que pueden influir en la sensibilidad sistémica a la insulina, como son: el músculo esquelético, que representa aproximadamente un 45% de la masa corporal total, la absorción gastrointestinal, la producción de glucosa en el hígado y las rutas metabólicas de la glucosa no dependientes de insulina, entre otros [118, 119]. Sin embargo, es ahora cuando se está descubriendo la función de estos relojes moleculares en humanos [79, 127].

Otro resultado importante de este estudio es que la amplitud del ritmo circadiano en el TA subcutáneo se correlacionó positivamente con la duración del sueño *in vivo* y negativamente con el momento de acostarse *in vivo*. En los últimos años, se han acumulado evidencias que apoyan que los trastornos del sueño son factores de riesgo independientes para desarrollar resistencia a la insulina. Algunos trastornos del sueño son el sueño insuficiente, la mala calidad del sueño y el síndrome de apnea del sueño [128, 129]. Varios estudios independientes muestran de manera consistente que las alteraciones del sueño producen una disminución de la sensibilidad a la insulina.

En este aspecto, ha sido especialmente relevante un estudio *in vitro* realizado con adipocitos del TAS humano, en el que la restricción del sueño dio como resultado

un estado de resistencia a la insulina. La sensibilidad a la insulina, fue determinada mediante la fosforilación de AKT en respuesta a insulina, y los resultados mostraron que esta fosforilación fue un 30% más baja durante la restricción del sueño que durante un sueño normal [73].

Se han llevado a cabo experimentos similares, pero en otro tipo de osciladores periféricos humanos como fibroblastos de la piel, islotes pancreáticos o miotubos del músculo esquelético, entre otros. Al igual que en nuestro estudio, sus resultados han mostrado que existe correlación entre las propiedades del ritmo analizadas *in vitro* y el fenotipo de los sujetos participantes observado *in vivo* (cronotipo, obesidad, alteraciones metabólicas...) [48, 53]. Esto sugiere por tanto, que los osciladores moleculares son plásticos, es decir, pueden cambiar sus propiedades de acuerdo con su entorno [130]. Una hipótesis alternativa es que las propiedades del reloj circadiano pueden estar influyendo de manera activa en estos fenotipos.

La limitación que encontramos en este experimento es que, al haberlo realizado en una muestra de población de obesos extremos, no es posible extrapolar los resultados obtenidos a la población normopeso. Sin embargo, es muy difícil llevar a cabo este estudio en sujetos con un peso normal, ya que para realizar los experimentos se han utilizado unos 1000 explantes, lo que requiere una gran cantidad de TA. Además, para obtener las biopsias de TA visceral se requiere acceso a la cavidad peritoneal, lo que también dificulta la obtención de estas muestras en sujetos con normopeso.

En definitiva, este experimento pone de manifiesto la gran importancia que tienen los estudios de los ritmos circadianos en células primarias humanas para las enfermedades metabólicas. Los experimentos realizados *in vitro* son útiles porque, aunque no capturan el aspecto multifactorial del ambiente *in vivo*, permiten el análisis de la función del reloj circadiano en ausencia de influencias del NSQ y otros factores de confusión, reflejando por lo tanto, las características propias de los relojes moleculares [79].



## **VI. CONCLUSIONES**

---



1. La línea celular primaria de adipocitos humanos PT-5020 presenta ritmicidad circadiana para el gen reloj *PER2*, y por lo tanto puede ser un modelo adecuado para el análisis de los ritmos circadianos en el tejido adiposo.
2. El uso de un reportero de bioluminiscencia por transducción viral es una técnica útil para medir ritmos circadianos de manera continua en el cultivo de adipocitos primarios humanos; para conocer las características del ritmo, tanto el periodo como la fase, así como para conocer su implicación en determinados procesos fisiológicos.
3. La sensibilidad a la insulina en el tejido adiposo subcutáneo humano exhibe un ritmo circadiano endógeno, siendo máxima esta sensibilidad al mediodía y mínima a medianoche. Además, este ritmo mejora cuando se siguen hábitos de sueño adecuados. Estos resultados pueden ayudar a comprender mejor las complejas relaciones entre el reloj circadiano, el metabolismo de la glucosa y la obesidad en humanos.



## **VII. BIBLIOGRAFÍA**

---



1. Gomez-Santos, C., et al., *Circadian rhythm of clock genes in human adipose explants*. Obesity (Silver Spring), 2009. **17**(8): p. 1481-5.
2. Gomez-Abellan, P., et al., [*Chronobiological aspects of obesity and metabolic syndrome*]. Endocrinol Nutr, 2012. **59**(1): p. 50-61.
3. Van Cauter, E. and F.W. Turek, *The endocrine system*. Handbook of Physiology, ed. M. BS2000, New York: Oxford University Press.
4. Reppert, S.M. and D.R. Weaver, *Coordination of circadian timing in mammals*. Nature, 2002. **418**(6901): p. 935-41.
5. Takahashi, J., F.W. Turek, and R. Moore, *Handbook of Behavioral Neurobiology*2001, New York: Kluwer Academic/Plenum.
6. Klein, D., R. Moore, and S.M. Reppert, *Suprachiasmatic Nucleus: The Mind's Clock*1991, New York: Oxford University press.
7. Weaver, D.R., *The suprachiasmatic nucleus: a 25-year retrospective*. J Biol Rhythms, 1998. **13**(2): p. 100-12.
8. Albrecht, U. and G. Eichele, *The mammalian circadian clock*. Curr Opin Genet Dev, 2003. **13**(3): p. 271-7.
9. Gekakis, N., et al., *Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism*. Science, 1998. **280**(5369): p. 1564-9.
10. Darlington, T.K., et al., *Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors per and tim*. Science, 1998. **280**(5369): p. 1599-603.
11. Shearman, L.P., et al., *Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock*. Science, 2000. **288**(5468): p. 1013-9.
12. Griffin, E.A., Jr., D. Staknis, and C.J. Weitz, *Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock*. Science, 1999. **286**(5440): p. 768-71.
13. Lowrey, P.L., et al., *Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau*. Science, 2000. **288**(5465): p. 483-92.
14. Godinho, S.I., et al., *The after-hours mutant reveals a role for Fbxl3 in determining mammalian circadian period*. Science, 2007. **316**(5826): p. 897-900.
15. Gallego, M. and D.M. Virshup, *Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(2): p. 139-48.
16. Panda, S., et al., *Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock*. Cell, 2002. **109**(3): p. 307-20.
17. Storch, K.F., et al., *Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart*. Nature, 2002. **417**(6884): p. 78-83.
18. Yoo, S.H., et al., *PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in*

- mouse peripheral tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(15): p. 5339-46.
19. Zvonic, S., et al., *Characterization of peripheral circadian clocks in adipose tissues*. Diabetes, 2006. **55**(4): p. 962-70.
  20. Ando, H., et al., *Rhythmic messenger ribonucleic acid expression of clock genes and adipocytokines in mouse visceral adipose tissue*. Endocrinology, 2005. **146**(12): p. 5631-6.
  21. T, A., S. S, and T. M, *Characteristics of circadian gene expressions in mice white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes*. J. Health Sci., 2005. **51**: p. 21-32.
  22. Bray, M.S. and M.E. Young, *Circadian rhythms in the development of obesity: potential role for the circadian clock within the adipocyte*. Obes Rev, 2007. **8**(2): p. 169-81.
  23. Goh, B.C., et al., *Food entrainment of circadian gene expression altered in PPARalpha-/- brown fat and heart*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **360**(4): p. 828-33.
  24. Prunet-Marcassus, B., et al., *Melatonin reduces body weight gain in Sprague Dawley rats with diet-induced obesity*. Endocrinology, 2003. **144**(12): p. 5347-52.
  25. Kohsaka, A., et al., *High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice*. Cell Metab, 2007. **6**(5): p. 414-21.
  26. Yanagihara, H., et al., *High-fat feeding exerts minimal effects on rhythmic mRNA expression of clock genes in mouse peripheral tissues*. Chronobiol Int, 2006. **23**(5): p. 905-14.
  27. Turek, F.W., et al., *Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice*. Science, 2005. **308**(5724): p. 1043-5.
  28. Barnea, M., Z. Madar, and O. Froy, *Dexamethasone induces high-amplitude rhythms in preadipocytes, but hinders circadian expression in differentiated adipocytes*. Chronobiol Int, 2013. **30**(6): p. 837-42.
  29. Wu, X., et al., *Induction of circadian gene expression in human subcutaneous adipose-derived stem cells*. Obesity (Silver Spring), 2007. **15**(11): p. 2560-70.
  30. Gomez-Abellan, P., et al., *Clock genes are implicated in the human metabolic syndrome*. Int J Obes (Lond), 2008. **32**(1): p. 121-8.
  31. Hernandez-Morante, J.J., et al., *Expression of cortisol metabolism-related genes shows circadian rhythmic patterns in human adipose tissue*. Int J Obes (Lond), 2009. **33**(4): p. 473-80.
  32. Gomez-Abellan, P., et al., *Circadian expression of adiponectin and its receptors in human adipose tissue*. Endocrinology, 2010. **151**(1): p. 115-22.
  33. Garaulet, M. and J.A. Madrid, *Methods for monitoring the functional status of the circadian system in dietary surveys studies: application*

- criteria and interpretation of results.* Nutr Hosp, 2015. **31 Suppl 3**: p. 279-89.
34. Gomez Abellan, P., et al., *Site-specific circadian expression of leptin and its receptor in human adipose tissue.* Nutr Hosp, 2011. **26(6)**: p. 1394-401.
  35. Gomez-Abellan, P., et al., *Glucocorticoids affect 24 h clock genes expression in human adipose tissue explant cultures.* PLoS One, 2012. **7(12)**: p. e50435.
  36. Johnston, J.D., *Adipose circadian rhythms: translating cellular and animal studies to human physiology.* Mol Cell Endocrinol, 2012. **349(1)**: p. 45-50.
  37. Wu, X., et al., *Expression profile of mRNAs encoding core circadian regulatory proteins in human subcutaneous adipose tissue: correlation with age and body mass index.* Int J Obes (Lond), 2009. **33(9)**: p. 971-7.
  38. Boivin, D.B., et al., *Circadian clock genes oscillate in human peripheral blood mononuclear cells.* Blood, 2003. **102(12)**: p. 4143-5.
  39. Fukuya, H., et al., *Circadian expression of clock genes in human peripheral leukocytes.* Biochem Biophys Res Commun, 2007. **354(4)**: p. 924-8.
  40. Akashi, M., et al., *Noninvasive method for assessing the human circadian clock using hair follicle cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107(35)**: p. 15643-8.
  41. Archer, S.N., et al., *Inter-individual differences in habitual sleep timing and entrained phase of endogenous circadian rhythms of BMAL1, PER2 and PER3 mRNA in human leukocytes.* Sleep, 2008. **31(5)**: p. 608-17.
  42. Loboda, A., et al., *Diurnal variation of the human adipose transcriptome and the link to metabolic disease.* BMC Med Genomics, 2009. **2**: p. 7.
  43. Khan, S., et al., *Dietary long-chain n-3 PUFAs increase LPL gene expression in adipose tissue of subjects with an atherogenic lipoprotein phenotype.* J Lipid Res, 2002. **43(6)**: p. 979-85.
  44. Otway, D.T., et al., *Rhythmic diurnal gene expression in human adipose tissue from individuals who are lean, overweight, and type 2 diabetic.* Diabetes, 2011. **60(5)**: p. 1577-81.
  45. Despres, J.P. and I. Lemieux, *Abdominal obesity and metabolic syndrome.* Nature, 2006. **444(7121)**: p. 881-7.
  46. Brown, S.A., et al., *The period length of fibroblast circadian gene expression varies widely among human individuals.* PLoS Biol, 2005. **3(10)**: p. e338.

47. Balsalobre, A., F. Damiola, and U. Schibler, *A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells*. Cell, 1998. **93**(6): p. 929-37.
48. Brown, S.A., et al., *Molecular insights into human daily behavior*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(5): p. 1602-7.
49. Lee, S.K., et al., *Extracellular low pH affects circadian rhythm expression in human primary fibroblasts*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **416**(3-4): p. 337-42.
50. Hasan, S., et al., *Assessment of circadian rhythms in humans: comparison of real-time fibroblast reporter imaging with plasma melatonin*. FASEB J, 2012. **26**(6): p. 2414-23.
51. Pulimeno, P., et al., *Autonomous and self-sustained circadian oscillators displayed in human islet cells*. Diabetologia, 2013. **56**(3): p. 497-507.
52. Yoshikawa, A., et al., *Establishment of human cell lines showing circadian rhythms of bioluminescence*. Neurosci Lett, 2008. **446**(1): p. 40-4.
53. Pagnani, L., et al., *The physiological period length of the human circadian clock in vivo is directly proportional to period in human fibroblasts*. PLoS One, 2010. **5**(10): p. e13376.
54. Cinti, S., *The adipose organ*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2005. **73**(1): p. 9-15.
55. Trujillo, M.E. and P.E. Scherer, *Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease*. Endocr Rev, 2006. **27**(7): p. 762-78.
56. Galic, S., J.S. Oakhill, and G.R. Steinberg, *Adipose tissue as an endocrine organ*. Mol Cell Endocrinol, 2010. **316**(2): p. 129-39.
57. Sinha, A., et al., *Effects of insulin on body composition in patients with insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes*. Diabet Med, 1996. **13**(1): p. 40-6.
58. Gavrilu, A., et al., *Diurnal and ultradian dynamics of serum adiponectin in healthy men: comparison with leptin, circulating soluble leptin receptor, and cortisol patterns*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(6): p. 2838-43.
59. Scheer, F.A., et al., *Impact of the human circadian system, exercise, and their interaction on cardiovascular function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(47): p. 20541-6.
60. Garaulet, M., et al., *An approximation to the temporal order in endogenous circadian rhythms of genes implicated in human adipose tissue metabolism*. J Cell Physiol, 2011. **226**(8): p. 2075-80.
61. Garaulet, M. and J.A. Madrid, *Chronobiology, genetics and metabolic syndrome*. Curr Opin Lipidol, 2009. **20**(2): p. 127-34.

62. Sanchez-Munoz, F., et al., [*Adipocitokines, adipose tissue and its relationship with immune system cells*]. *Gac Med Mex*, 2005. **141**(6): p. 505-12.
63. Caspar-Bauguil, S., et al., *Adipose tissues as an ancestral immune organ: site-specific change in obesity*. *FEBS Lett*, 2005. **579**(17): p. 3487-92.
64. Johnston, J.D., G. Frost, and D.T. Otway, *Adipose tissue, adipocytes and the circadian timing system*. *Obes Rev*, 2009. **10 Suppl 2**: p. 52-60.
65. Gimble, J.M., et al., *Prospective influences of circadian clocks in adipose tissue and metabolism*. *Nat Rev Endocrinol*, 2011. **7**(2): p. 98-107.
66. Forest, C., et al., *What induces watts in WAT?* *Adipocyte*, 2016. **5**(2): p. 136-52.
67. Boss, O. and S.R. Farmer, *Recruitment of brown adipose tissue as a therapy for obesity-associated diseases*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2012. **3**: p. 14.
68. Deveaud, C., et al., *Regional differences in oxidative capacity of rat white adipose tissue are linked to the mitochondrial content of mature adipocytes*. *Mol Cell Biochem*, 2004. **267**(1-2): p. 157-66.
69. Shi, H., et al., *The effect of fat removal on glucose tolerance is depot specific in male and female mice*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007. **293**(4): p. E1012-20.
70. Virtanen, K.A., et al., *Glucose uptake and perfusion in subcutaneous and visceral adipose tissue during insulin stimulation in nonobese and obese humans*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. **87**(8): p. 3902-10.
71. DeFronzo, R.A., R.C. Bonadonna, and E. Ferrannini, *Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview*. *Diabetes Care*, 1992. **15**(3): p. 318-68.
72. Carey, D.G., et al., *Abdominal fat and insulin resistance in normal and overweight women: Direct measurements reveal a strong relationship in subjects at both low and high risk of NIDDM*. *Diabetes*, 1996. **45**(5): p. 633-8.
73. Broussard, J.L., et al., *Impaired insulin signaling in human adipocytes after experimental sleep restriction: a randomized, crossover study*. *Ann Intern Med*, 2012. **157**(8): p. 549-57.
74. Van Cauter, E., et al., *Modulation of glucose regulation and insulin secretion by circadian rhythmicity and sleep*. *J Clin Invest*, 1991. **88**(3): p. 934-42.
75. Carroll, K.F. and P.J. Nestel, *Diurnal variation in glucose tolerance and in insulin secretion in man*. *Diabetes*, 1973. **22**(5): p. 333-48.

76. Service, F.J., et al., *Effects of size, time of day and sequence of meal ingestion on carbohydrate tolerance in normal subjects*. Diabetologia, 1983. **25**(4): p. 316-21.
77. Saad, A., et al., *Diurnal pattern to insulin secretion and insulin action in healthy individuals*. Diabetes, 2012. **61**(11): p. 2691-700.
78. Lamia, K.A., K.F. Storch, and C.J. Weitz, *Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(39): p. 15172-7.
79. Saini, C., S.A. Brown, and C. Dibner, *Human peripheral clocks: applications for studying circadian phenotypes in physiology and pathophysiology*. Front Neurol, 2015. **6**: p. 95.
80. Sadacca, L.A., et al., *An intrinsic circadian clock of the pancreas is required for normal insulin release and glucose homeostasis in mice*. Diabetologia, 2011. **54**(1): p. 120-4.
81. van der Spek, R., et al., *Circadian rhythms in white adipose tissue*. Prog Brain Res, 2012. **199**: p. 183-201.
82. Ramirez-Zacarias, J.L., F. Castro-Munozledo, and W. Kuri-Harcuch, *Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O*. Histochemistry, 1992. **97**(6): p. 493-7.
83. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
84. Rodbell, M., *Metabolism of Isolated Fat Cells. I. Effects of Hormones on Glucose Metabolism and Lipolysis*. J Biol Chem, 1964. **239**: p. 375-80.
85. Balsalobre, A., L. Marcacci, and U. Schibler, *Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts*. Curr Biol, 2000. **10**(20): p. 1291-4.
86. Perrin, L., et al., *Human skeletal myotubes display a cell-autonomous circadian clock implicated in basal myokine secretion*. Mol Metab, 2015. **4**(11): p. 834-45.
87. Nunez, C., et al., *Bioimpedance analysis: evaluation of leg-to-leg system based on pressure contact footpad electrodes*. Med Sci Sports Exerc, 1997. **29**(4): p. 524-31.
88. Durnin, J.V. and M.M. Rahaman, *The assessment of the amount of fat in the human body from measurements of skinfold thickness*. Br J Nutr, 1967. **21**(3): p. 681-9.
89. Siri, W.E., *Body composition from fluid spaces and density: analysis of methods. 1961*. Nutrition, 1993. **9**(5): p. 480-91; discussion 480, 492.

90. JC, S., et al., *Measurements of regional distribution of adipose tissue*. Obesity in Europe 88. Proceedings of the 1st European Congress on Obesity., ed. B. P and R. S1988, Estocolmo.
91. Ferrario, M., M.A. Carpenter, and L.E. Chambless, *Reliability of body fat distribution measurements. The ARIC Study baseline cohort results. Atherosclerosis Risk in Communities Study*. Int J Obes Relat Metab Disord, 1995. **19**(7): p. 449-57.
92. Vague, J., *The degree of masculine differentiation of obesities: a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease*. Am J Clin Nutr, 1956. **4**(1): p. 20-34.
93. Valdez, R., et al., *A new index of abdominal adiposity as an indicator of risk for cardiovascular disease. A cross-population study*. Int J Obes Relat Metab Disord, 1993. **17**(2): p. 77-82.
94. Alberti, K.G., P. Zimmet, and J. Shaw, *Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation*. Diabet Med, 2006. **23**(5): p. 469-80.
95. [SEEDO'2000 consensus for the evaluation of overweight and obesity and the establishment of criteria for therapeutic intervention. Sociedad Espanola para el Estudio de la Obesidad]. Med Clin (Barc), 2000. **115**(15): p. 587-97.
96. Batschelet, E. and E. Batschelet, *Circular statistics in biology*. Vol. 111. 1981: Academic press London.
97. Wang, P., et al., *The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue*. J Cell Physiol, 2008. **216**(1): p. 3-13.
98. Rutkowski, J.M., K.E. Davis, and P.E. Scherer, *Mechanisms of obesity and related pathologies: the macro- and microcirculation of adipose tissue*. FEBS J, 2009. **276**(20): p. 5738-46.
99. Otway, D.T., G. Frost, and J.D. Johnston, *Circadian rhythmicity in murine pre-adipocyte and adipocyte cells*. Chronobiol Int, 2009. **26**(7): p. 1340-54.
100. Huang, T.S., et al., *Induction of circadian rhythm in cultured human mesenchymal stem cells by serum shock and cAMP analogs in vitro*. Chronobiol Int, 2009. **26**(2): p. 242-57.
101. Gomez-Santos, C., et al., *Profile of adipose tissue gene expression in premenopausal and postmenopausal women: site-specific differences*. Menopause, 2011. **18**(6): p. 675-84.
102. Leibetseder, V., et al., *Clock genes display rhythmic expression in human hearts*. Chronobiol Int, 2009. **26**(4): p. 621-36.
103. Bjarnason, G.A., et al., *Circadian expression of clock genes in human oral mucosa and skin: association with specific cell-cycle phases*. Am J Pathol, 2001. **158**(5): p. 1793-801.

104. Takata, M., et al., *Daily expression of mRNAs for the mammalian Clock genes Per2 and clock in mouse suprachiasmatic nuclei and liver and human peripheral blood mononuclear cells*. Jpn J Pharmacol, 2002. **90**(3): p. 263-9.
105. Balsalobre, A., et al., *Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling*. Science, 2000. **289**(5488): p. 2344-7.
106. Mannic, T., et al., *Circadian clock characteristics are altered in human thyroid malignant nodules*. J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(11): p. 4446-56.
107. Baeza-Raja, B., et al., *p75 neurotrophin receptor is a clock gene that regulates oscillatory components of circadian and metabolic networks*. J Neurosci, 2013. **33**(25): p. 10221-34.
108. Branecky, K.L., K.D. Niswender, and J.S. Pendergast, *Disruption of Daily Rhythms by High-Fat Diet Is Reversible*. PLoS One, 2015. **10**(9): p. e0137970.
109. Maronde, E. and D. Motzkus, *Oscillation of human period 1 (hPER1) reporter gene activity in human neuroblastoma cells in vivo*. Chronobiol Int, 2003. **20**(4): p. 671-81.
110. Ramanathan, C., et al., *Cell type-specific functions of period genes revealed by novel adipocyte and hepatocyte circadian clock models*. PLoS Genet, 2014. **10**(4): p. e1004244.
111. Nagoshi, E., et al., *Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells*. Cell, 2004. **119**(5): p. 693-705.
112. Welsh, D.K., et al., *Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression*. Curr Biol, 2004. **14**(24): p. 2289-95.
113. Morin, L.P., *Age-Related Changes in Hamster Circadian Period, Entrainment, and Rhythm Splitting*. Journal of Biological Rhythms, 1988. **3**: p. 11.
114. Davidson, A.J., et al., *Resetting of central and peripheral circadian oscillators in aged rats*. Neurobiol Aging, 2008. **29**(3): p. 471-7.
115. Yamazaki, S., et al., *Effects of aging on central and peripheral mammalian clocks*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(16): p. 10801-6.
116. Hofman, M.A. and D.F. Swaab, *Living by the clock: the circadian pacemaker in older people*. Ageing Res Rev, 2006. **5**(1): p. 33-51.
117. Garaulet, M., J.M. Ordovas, and J.A. Madrid, *The chronobiology, etiology and pathophysiology of obesity*. Int J Obes (Lond), 2010. **34**(12): p. 1667-83.

118. Yoshino, J., et al., *Diurnal variation in insulin sensitivity of glucose metabolism is associated with diurnal variations in whole-body and cellular fatty acid metabolism in metabolically normal women.* J Clin Endocrinol Metab, 2014. **99**(9): p. E1666-70.
119. Morris, C.J., et al., *Endogenous circadian system and circadian misalignment impact glucose tolerance via separate mechanisms in humans.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(17): p. E2225-34.
120. Shapiro, E.T., et al., *Oscillations in insulin secretion during constant glucose infusion in normal man: relationship to changes in plasma glucose.* J Clin Endocrinol Metab, 1988. **67**(2): p. 307-14.
121. Mardh, P.A., S. Collen, and K.E. Andersson, *Studies on cinoxacin. 1. In vitro activity of cinoxacin, as compared to nalidixic acid, against urinary tract pathogens.* J Antimicrob Chemother, 1977. **3**(5): p. 411-6.
122. Barnea, M., et al., *The circadian clock machinery controls adiponectin expression.* Mol Cell Endocrinol, 2015. **399**: p. 284-7.
123. Scheer, F.A., et al., *Day/night variations of high-molecular-weight adiponectin and lipocalin-2 in healthy men studied under fed and fasted conditions.* Diabetologia, 2010. **53**(11): p. 2401-5.
124. Jakubowicz, D., et al., *High caloric intake at breakfast vs. dinner differentially influences weight loss of overweight and obese women.* Obesity (Silver Spring), 2013. **21**(12): p. 2504-12.
125. Nakajima, K. and K. Suwa, *Association of hyperglycemia in a general Japanese population with late-night-dinner eating alone, but not breakfast skipping alone.* J Diabetes Metab Disord, 2015. **14**: p. 16.
126. Scheer, F.A., et al., *Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(11): p. 4453-8.
127. Harfmann, B.D., E.A. Schroder, and K.A. Esser, *Circadian rhythms, the molecular clock, and skeletal muscle.* J Biol Rhythms, 2015. **30**(2): p. 84-94.
128. Van Cauter, E., *Sleep disturbances and insulin resistance.* Diabet Med, 2011. **28**(12): p. 1455-62.
129. Anothaisintawee, T., et al., *Sleep disturbances compared to traditional risk factors for diabetes development: Systematic review and meta-analysis.* Sleep Med Rev, 2016. **30**: p. 11-24.
130. Scheer, F.A., et al., *Plasticity of the intrinsic period of the human circadian timing system.* PLoS One, 2007. **2**(8): p. e721.



## **VIII. ANEXOS**

---



## 8. 1. Tablas.

**Tabla 4. Características generales de las poblaciones estudiadas para la consecución de los objetivos 2 y 3.**

	Objetivo 2		Objetivo 3	
	Población total (n=16)		Población total (n=18)	
	Media	DE	Media	DE
Edad (años)	44	9	46	11
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	45	11	42	6
<b>Antropometría</b>				
Pliegue bicipital (cm)	37,5	8,6	31,73	8,24
Pliegue tricpital (cm)	39	8,06	40,5	5,81
Pliegue subscapular (cm)	38,12	10,12	38,19	6,80
Pliegue suprailíaco (cm)	37,22	8,17	36,94	6,08
Grasa corporal total (pliegues; %)	33,43	3,57	33,27	2,00
Grasa corporal total (impedancia; %)	46,01	9,94	41,06	8,87
Circunferencia de la cadera (cm)	134,91	18,72	130,53	13,81
Circunferencia del muslo (cm)	77,73	11,03	74,94	10,52
RCC	0,99	0,06	0,98	0,11
RCM	1,76	0,25	1,73	0,28
Diámetro abdominal sagital (cm)	37,45	7,15	42,29	6,28
Diámetro abdominal coronal (cm)	38,87	6,59	46,06	4,94
<b>Características del Síndrome Metabólico</b>				
Circunferencia de la cintura(cm)	133,45	19,55	126,57	15,32
Triglicéridos (mmol/L)	1,49	0,59	1,51	0,82
Glucosa (mmol/L)	5,77	1,08	6,43	1,87
HDL-c (mmol/L)	1,36	0,59	1,26	0,46
Presión sanguínea diastólica (mmHg)	78,13	6,79	82,78	6,18
Presión sanguínea sistólica (mmHg)	127,06	16,15	138,22	15,16
Score del SMet	3,75	0,89	3,18	1,38
<b>Otras determinaciones</b>				
Colesterol Total (mmol/L)	4,36	1,00	4,23	1,24
AST (IU/L)	25,00	18,07	19,00	8,65
ALT (IU/L)	26,80	19,67	29,00	16,91
<b>Características del sueño</b>				
Inicio del sueño (hh:mm)	0:56	1:06	0:29	1:05
Duración del sueño (h)	5,86	1,11	7,15	1,44
<b>Horario de las comidas</b>				
Inicio del desayuno (hh:mm)	8:52	1:24	8:51	1:03
Inicio de la comida (hh:mm)	14:50	0:31	14:40	0:36
Inicio de la cena (hh:mm)	21:10	0:41	21:43	0:49

Los datos se representan como Media y DE. IMC: índice de masa corporal, RCC: relación cintura / cadera; RCM: Relación cintura / muslo; SMet: Síndrome metabólico; AST: aspartato transaminasa (también conocida como transaminasa glutámico-oxaloacética); ALT: Alanina transaminasa (también conocida como glutamato-piruvato transaminasa).



## 8. 2. Producción científica

La presente tesis doctoral ha dado lugar a la siguiente publicación:

- Autores (p.o. de firma): **Carrasco-Benso MP**, Rivero-Gutierrez B, Lopez-Minguez J, Anzola A, Diez-Noguera A, Madrid JA, Lujan JA, Martínez-Augustin O, Scheer FA, Garaulet M.  
Título: Human adipose tissue expresses intrinsic circadian rhythm in insulin sensitivity.  
Revista: FASEB J. 2016 Sep; doi: 10.1096/fj.201600269RR. Epub 2016 Jun 2.  
Clave: A Volumen: 30(9) Páginas, inicial: 3117 final:3123  
Fecha: 2016

Otra publicación que el autor ha realizado durante el período pre-doctoral en colaboración con el grupo de María Jesús Moreno Aliaga de la Universidad de Navarra y que no se ha incluido en la presente Tesis Doctoral:

- Autores (p.o. de firma): López-Yoldi, M., Stanhope, K. L., Garaulet, M., Chen, X. G., Marcos-Gómez, B., **Carrasco-Benso, M. P.**, Santa Maria, E. M., Escoté, X., Lee, V., Nunez, M. V., Medici, V., Martínez-Ansó, E., Sáinz, N., Huerta, A. E., Laiglesia, L. M., Prieto, J. Martínez, J. A., Bustos, M., Havel, P. J., Moreno-Aliaga, M. J.  
Título: Role of cardiostrophin-1 (CT-1) in the regulation of metabolic circadian rhythms and adipose core clock genes in mice and characterization of 24-h circulating CT-1 profiles in normal-weight and overweight/obese subjects.  
Revista: FASEB J. 2017 Apr; doi: 10.1096/fj.201600396RR. Epub 2017 Jan 17.  
Clave: A Volumen: 31(4) Páginas, inicial: 1639 final: 1649  
Fecha: 2017

## Contribuciones a congresos internacionales

- Autores: **Carrasco-Benso MP**, Rivero-Gutierrez B, Lopez-Minguez J, Anzola A, Diez-Noguera A, Madrid JA, Lujan JA, Martínez-Augustin O, Scheer FA, Garaulet M.  
Título: HUMAN ADIPOSE TISSUE EXPRESSES INTRINSIC CIRCADIAN RHYTHM IN INSULIN SENSITIVITY  
Tipo de participación: Comunicación en póster  
Congreso: Sleep 2016  
Lugar celebración: Denver  
Fecha: 2016

Otras contribuciones a congresos internacionales realizadas durante el periodo pre-doctoral, no incluidas en la presente Tesis Doctoral:

- Autores: **Carrasco-Benso MP**, Gómez-Abellán P, Sáez Belmonte F, Garaulet M, Fox Caroline S.  
Título: THE MEASUREMENT OF HOUNSFIELD UNITS ON COMPUTED TOMOGRAPHY IMAGES AS A METHOD TO ASSESS FAT QUALITY.  
Tipo de participación: Comunicación en póster  
Congreso: IUNS 20th International Congress of Nutrition  
Lugar celebración: Granada (Spain)  
Fecha: 2013
- Autores: : Prieto-Hontoria PL, **Carrasco-Benso MP**, Gómez-Santos C, Gómez-Abellán P, Garaulet M  
Título: SEMAPHORIN 3C DISPLAYS CIRCADIAN EXPRESSION IN HUMAN ADIPOSE TISSUE: A CROSS SECTIONAL STUDY IN PRE- AND POST-MENOPAUSAL WOMEN.  
Tipo de participación: Presentación Oral (por el primer autor).  
Congreso: XXI Congreso Chileno de Nutrición  
Lugar celebración: Chile  
Fecha: 2015

### **Contribuciones a congresos nacionales**

- Autores: **Carrasco-Benso MP**, Rivero-Gutierrez B, Lopez-Minguez J, Anzola A, Diez-Noguera A, Madrid JA, Lujan JA, Martínez-Augustin O, Scheer FA, Garaulet M.  
Título: ACOSTARSE TARDE Y DORMIR POCO DISMINUYE LA AMPLITUD DEL RITMO DE SENSIBILIDAD A INSULINA EN TEJIDO ADIPOSO  
Tipo de participación: Comunicación en póster  
Congreso: VII Seminario sobre alimentación y estilos de vida saludables.  
Lugar de celebración: Palma de Mallorca  
Fecha: Julio 2016
- Autores: **Carrasco-Benso MP**, Rivero-Gutierrez B, Lopez-Minguez J, Anzola A, Diez-Noguera A, Madrid JA, Lujan JA, Martínez-Augustin O, Scheer FA, Garaulet M.  
Título: RITMOS CIRCADIANOS DE LA SENSIBILIDAD A LA INSULINA EN EL TEJIDO ADIPOSO HUMANO: EFECTO DEL SUEÑO  
Tipo de participación: Comunicación oral  
Congreso: XVII Reunión de la Sociedad Española de Nutrición.  
Lugar de celebración: Santiago de Compostela  
Fecha: Noviembre 2016

- Autores: **Carrasco-Benso MP**, Kolbe Isa, López-Mínguez J, Luján JA, Oster H, Garaulet M.  
Título: ANÁLISIS DE LOS RITMOS CIRCADIANOS EN ADIPOCITOS MADUROS Y PREADIPOCITOS AISLADOS DEL TEJIDO ADIPOSO HUMANO MEDIANTE BIOLUMINISCENCIA.  
Tipo de participación: Comunicación en póster  
Congreso: XIII Congreso de la SEEDO y XIX Congreso de la SECO (II Congreso de Obesidad y complicaciones metabólicas).  
Lugar de celebración: Sevilla  
Fecha: Marzo 2017

### **Otros méritos relevantes:**

Premio a la mejor comunicación Oral en el XVII Congreso de la Sociedad Española de Nutrición en Santiago de Compostela. Noviembre 2016.



Artículo científico

**Human adipose tissue expresses intrinsic circadian rhythm in insulin sensitivity**

**Maria P. Carrasco-Benso**, Belen Rivero-Gutierrez, Jesus Lopez-Minguez, Andrea Anzola, Antoni Diez-Noguera, Juan A. Madrid, Juan A. Lujan, Olga Martínez-Augustín, Frank A. J. L. Scheer, and Marta Garaulet.

*The FASEB Journal (USA). 2016 Sep;30(9):3117-23*

*(Índice de impacto= 5,299)*



**Human adipose tissue expresses intrinsic circadian rhythm in insulin sensitivity**

**Maria P. Carrasco-Benso**, Belen Rivero-Gutierrez, Jesus Lopez-Minguez, Andrea Anzola, Antoni Diez-Noguera, Juan A. Madrid, Juan A. Lujan, Olga Martínez-Augustín, Frank A. J. L. Scheer, and Marta Garaulet.

*The FASEB Journal (USA). 2016 Sep;30(9):3117-23*

**RESUMEN**

En humanos, la sensibilidad a la insulina varía según la hora del día, con valores que disminuyen por la noche. Los mecanismos responsables de la variación diurna en la sensibilidad a la insulina no están claros. Se investigó si el tejido adiposo humano (TA) expresa ritmos circadianos en la sensibilidad a la insulina que podrían contribuir a este fenómeno. Las biopsias de TA subcutáneo y visceral se obtuvieron de participantes obesos extremos (índice de masa corporal,  $41,8 \pm 6,3$  kg / m<sup>2</sup>;  $46,6 \pm 11$  años) durante una cirugía de bypass gástrico por su obesidad extrema. Para evaluar el ritmo de la señalización de insulina, la fosforilación de AKT se determinó *in vitro* cada 4 h durante 24 h en respuesta a diferentes concentraciones de insulina (0, 1, 10 y 100 nM). Los datos revelaron que el TA subcutáneo exhibió ritmos circadianos robustos para la señalización de la insulina ( $P < 0.00001$ ). La sensibilidad a la insulina alcanzó su máximo (acrofase) alrededor del mediodía, siendo un 54% más alta que a media noche ( $P = 0.009$ ). La amplitud del ritmo se correlacionó positivamente con la duración del sueño *in vivo* ( $r = 0,53$ ,  $P = 0,023$ ) y negativamente con la hora de inicio del sueño *in vivo* ( $r = 20,54$ ;  $P = 0,020$ ). No se detectaron ritmos circadianos para la sensibilidad a la insulina en el TA visceral ( $P = 0,643$ ). Aquí, se demuestra la relevancia de la hora del día en la que el TA es más sensible a los efectos de la insulina. El TA subcutáneo presenta un ritmo circadiano endógeno en la sensibilidad a la insulina que podría proporcionar un mecanismo subyacente para el ritmo diario en la sensibilidad sistémica a la insulina.

**ABSTRACT**

In humans, insulin sensitivity varies according to time of day, with decreased values in the evening and at night. Mechanisms responsible for the diurnal variation in insulin sensitivity are unclear. We investigated whether human adipose tissue (AT) expresses intrinsic circadian rhythms in insulin sensitivity that could contribute to this phenomenon. Subcutaneous and visceral AT biopsies were obtained from extreme obese participants (body mass index,  $41.8 \pm 6.3 \text{ kg/m}^2$ ;  $46 \pm 11 \text{ y}$ ) during gastric-bypass surgery. To assess the rhythm in insulin signaling, AKT phosphorylation was determined every 4 h over 24 h *in vitro* in response to different insulin concentrations (0, 1, 10, and 100 nM). Data revealed that subcutaneous AT exhibited robust circadian rhythms in insulin signaling ( $P < 0.00001$ ). Insulin sensitivity reached its maximum (acrophase) around noon, being 54% higher than during midnight ( $P = 0.009$ ). The amplitude of the rhythm was positively correlated with *in vivo* sleep duration ( $r = 0.53$ ;  $P = 0.023$ ) and negatively correlated with *in vivo* bedtime ( $r = -0.54$ ;  $P = 0.020$ ). No circadian rhythms were detected in visceral AT ( $P = 0.643$ ). Here, we demonstrate the relevance of the time of the day for how sensitive AT is to the effects of insulin. Subcutaneous AT shows an endogenous circadian rhythm in insulin sensitivity that could provide an underlying mechanism for the daily rhythm in systemic insulin sensitivity.



