



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Dpto. de Biotecnología

Ritmos circadianos en la movilización de grasa en tejido adiposo humano: efectos de la ingesta restringida en el tiempo y la hora de ingesta

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Biomédica

AUTOR/A: González Alvarado, Elena

Tutor/a: Sirera Pérez, Rafael

Cotutor/a externo: GARAULET AZA, MARTA

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



Ritmos circadianos en la movilización de grasa en tejido adiposo humano: efectos de la ingesta restringida en el tiempo y la hora de ingesta

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

ALUMNO/A: ELENA GONZÁLEZ ALVARADO

TUTOR/A: DR. RAFAEL SIRERA PÉREZ

COTUTOR/A: DRA. MARTA GARAULET AZA

Curso Académico: 2021-22

VALENCIA, 02/06/2022

Listado de abreviaturas

AdPLA – Fosfolipasa A₂ específica de adipocitos

ATGL – Lipasa adipocítica de triacilglicéridos

AUC – Área bajo la curva

cAMP – Adenosín monofosfato cíclico

CGI-58 – *Comparative gene identification-58*

cGMP – guanosín monofosfato cíclico

DAG – diacilglicérido

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

GOS2 – *G0/S2 switch protein 2*

HSL – Lipasa sensible a hormonas

ICC – Índice cintura-cadera

IMC – Índice de masa corporal

MAG – Monoacilglicerol

MAGL – Monoacilglicerol lipasa

MetS- Síndrome metabólico

PBS – Tampón fosfato salino

PKA – Protein kinasa A

PLIN1 – Perilipina 1

PSG – Penicilina-estreptomocina-glutamina

SBF – Suero bovino fetal

SEM – Error estándar de la media

TA – Tejido adiposo

TAG – Triacilglicérido

TRE – *Time restricted eating*

UCP1 - *Uncoupling protein 1*

ZT – *Zeitgeber Time*

Índice

1. Introducción.....	1
2. Objetivos.....	8
3. Materiales y métodos.....	9
4. Resultados y discusión de los resultados	16
5. Conclusiones	22
6. Referencias Bibliográficas	23
7. Anexos.....	28

1. Introducción

Obesidad

La obesidad se ha convertido en uno de los principales problemas de salud que afectan a la sociedad actual. Es una enfermedad multifactorial producida tanto por factores genéticos como ambientales.¹ La Organización Mundial de la Salud la define como “una acumulación excesiva o anormal de grasa que supone un riesgo para la salud”. Los cambios de alimentación y de conductas, como la tendencia a la ingesta de alimentos hipercalóricos con peor calidad nutricional y la adquisición de un estilo de vida más sedentario, han conducido a la sociedad a un aumento de peso. Estos factores combinados han provocado que desde 1975 la tasa de obesidad mundial casi se haya triplicado.²

Así, en el año 2016, un 38.9% (1.900 millones de personas) de adultos en el mundo tenían sobrepeso, de los cuales 650 millones de personas (13.1% de la población mundial) presentaba obesidad. El 20.6% de niños de entre 5 y 9 años (131 millones de personas) presentaban sobrepeso en dicho año, suponiendo un 9% los niños que presentaban obesidad. El porcentaje de personas con sobrepeso y obesidad se mantiene relativamente estable en la adolescencia, siendo 17.3% (207 millones de personas) los adolescentes en el mundo con sobrepeso y 5.6% los adolescentes con obesidad. Con relación a los niños menores de 5 años, se estima que unos 40 millones presentaban sobrepeso u obesidad, representando el 5.9% de la población comprendida en esas edades (Figura 1).³

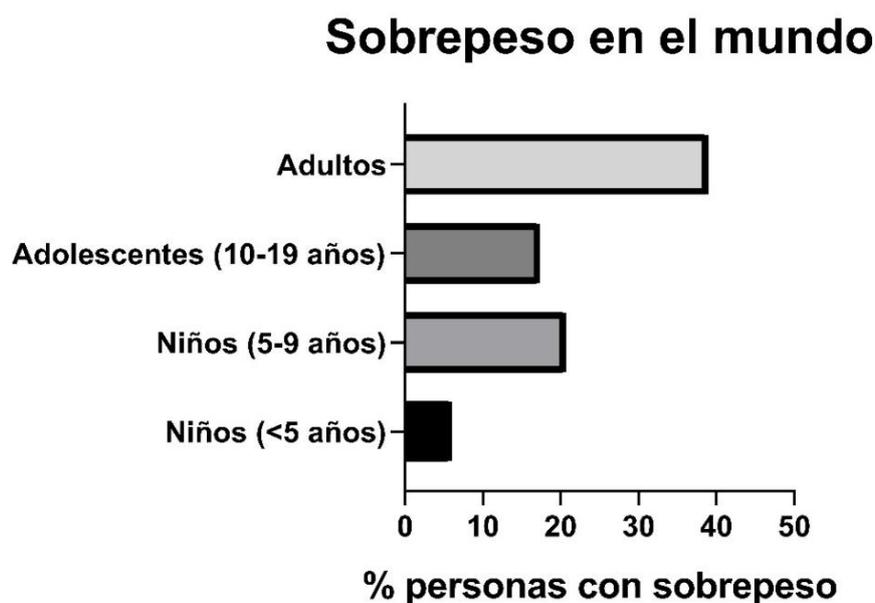


Figura 1. Porcentaje de individuos en el mundo que presentan sobrepeso, distribuidos por edad (2016). Adaptado de FOOD SECURITY AND NUTRITION IN THE WORLD THE STATE OF. Published online 2019. Accessed May 25, 2022. www.fao.org/publications

Entre los años 2000 y 2016 el porcentaje de obesidad aumentó considerablemente, llegando a duplicarse en niños y adolescentes. Estos datos evidencian el alarmante crecimiento de la tasa de obesidad y se estima que continuarán aumentando en los próximos años.³

La obesidad conlleva una serie de riesgos de padecer patologías tales como enfermedades cardiovasculares, diabetes, hipercolesterolemia, enfermedades musculoesqueléticas tales como la artrosis, etc.²

Tejido adiposo

El tejido adiposo (TA) es un tejido conectivo que está compuesto principalmente por un tipo celular denominado adipocitos, los cuales se diferencian en 3 tipos: blancos, marrones y beige. Los adipocitos blancos están especializados en el almacén de grasa en forma de triacilglicéridos (TAG), por este motivo cuentan con una gran gota lipídica que ocupa casi todo el citoplasma. En periodos de demanda energética, estos TAG son hidrolizados en ácidos grasos no esterificados y glicerol, mediante un proceso denominado lipólisis, proveyendo de energía al organismo. Los adipocitos marrones tienen en su citoplasma varias gotas de grasa pequeñas y cuentan con numerosas mitocondrias, ya que este tipo de adipocitos está especializado en la termogénesis gracias a una proteína denominada UCP1 o termogenina, que le permite disipar energía mediante la oxidación de los ácidos grasos generando calor. Más recientemente se ha descrito un tercer tipo de adipocitos denominados 'beige', o también denominados 'brite' (que significa *brown in white*), el cual es un tipo celular similar a los adipocitos marrones. Como ellos, poseen varias gotas lipídicas y numerosas mitocondrias, y expresan la proteína termogenina, y por lo tanto pueden realizar termogénesis. Sin embargo, este tipo celular está localizado dentro del tejido adiposo blanco.⁴⁻⁷ Además, según su localización, los depósitos de grasa se pueden clasificar en tejido adiposo visceral (se encuentra asociado a los órganos internos) y tejido adiposo subcutáneo (se localiza bajo la piel).⁸

Además de los adipocitos, el TA contiene otros tipos celulares como los preadipocitos, células inmunitarias como macrófagos o linfocitos, células vasculares, células endoteliales, fibroblastos y otros.⁹

La función principal del TA es el almacenamiento de energía en forma de lípidos. Asimismo, los adipocitos secretan una serie de péptidos denominados adipoquinas que pueden actuar de manera autocrina, paracrina o endocrina y permiten al TA participar en el balance energético del organismo, ya sea regulando la ingesta o el gasto energético. Esta función endocrina del TA también se relaciona con la respuesta inmune y la función reproductiva.^{4,7} Otra función del TA

es cohesionar y mantener en su lugar a los órganos internos y protegerlos al servir como amortiguador mecánico y térmico.^{8,10}

Lipolisis

La lipolisis, o división de los TAG en ácidos grasos no esterificados y glicerol para su posterior utilización como energía, consta de tres etapas, actuando enzimas específicas en cada una de ellas. La conversión de TAG a diacilglicéridos (DAG) está catalizada por la lipasa adipocítica de triacilglicéridos (ATGL), la transformación de DAG a monoacilglicéridos (MAG) la lleva a cabo la lipasa sensible a hormonas (HSL) y la última etapa que corresponde a la hidrólisis de MAG en glicerol y ácidos grasos libres la realiza la enzima monoacilglicerol lipasa (MAGL).¹¹

Si la proporción entre la síntesis y la hidrólisis de TAG no está equilibrada puede resultar en el desarrollo de obesidad en el caso de que exista una mayor síntesis de TAG que hidrólisis, o en la pérdida de peso en el caso contrario, es decir que haya una mayor hidrólisis de TAG que síntesis,¹² que es lo que se espera que ocurra cuando un individuo sigue una dieta hipocalórica o realiza un mayor gasto energético por actividad.

Hay numerosos factores que influyen en la actividad basal de la lipolisis, entre los que podemos encontrar el sexo, la genética, la edad, la actividad física, etc. y otros factores que contribuyen a su regulación como las catecolaminas, péptidos natriuréticos, hormonas o factores autocrinos y paracrinos, entre otros.¹³

Se han descrito diferentes rutas para la activación de la lipolisis: dependientes de AMP cíclico (cAMP), dependientes de GMP cíclico (cGMP), dependientes de MAP kinasas, etc. La mayoría de las rutas confluyen en la formación de cAMP. El cAMP es un segundo mensajero que se une a la protein kinasa A (PKA), que se encuentra en su forma inactiva en el citosol, dando lugar a una molécula de PKA activa que a continuación fosforila a la perilipina 1 (PLIN1). Esta es una proteína que se encuentra en la superficie de la gota lipídica y dificulta la actuación de las enzimas lipolíticas, ya que obstaculiza su acceso a la superficie de la gota lipídica y secuestra a la proteína CGI-58, coactivador de la ATGL. La proteína GOS2 se encuentra unida a la lipasa ATGL en el estado basal inhibiendo su actividad. Cuando PLIN1 es fosforilada se disocia de CGI-58 y este último se une a ATGL, potenciando su actividad hidrolítica. Además, GOS2 también se disocia de ATGL incrementado aún más su actividad lipolítica. PKA también fosforila a HSL, favoreciendo su traslocación del citoplasma a la superficie de la gota lipídica favoreciendo el acceso a su sustrato (**Figura 2**).¹²⁻¹⁶

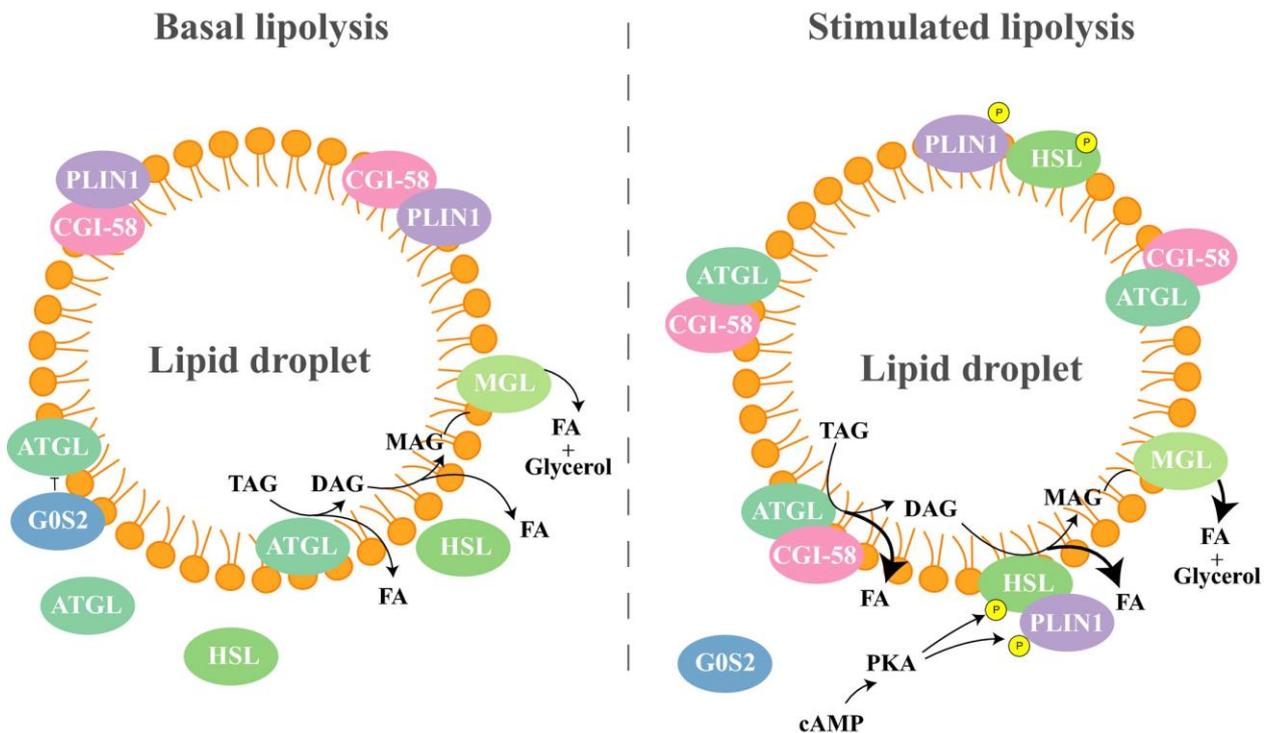


Figura 2. La cascada lipolítica en el estado basal y tras una estimulo pro-lipolítico. Las flechas más gruesas indican una mayor cantidad o actividad. ATGL, lipasa de triacilglicéridos; cAMP, AMP cíclico; CGI-58, comparative gene identification-58; FA, ácido graso; G0S2, G0/S2 switch protein 2; HSL, lipasa sensible a hormonas; MGL, monoacilglicerol lipasa; PKA, protein kinase A; PLIN1, perilipina 1. De Chen S, Huang X. Cytosolic lipolysis in non-adipose tissues: energy provision and beyond. The FEBS Journal. Published online 2021. doi:10.1111/FEBS.16161

Cuando este proceso ocurre, da lugar a la movilización de TAG en el tejido adiposo y la consecuente pérdida de grasa, que resulta fundamental en el proceso de pérdida de peso.¹³

Ritmos circadianos

Muchos procesos biológicos presentan variaciones a lo largo del día que tienen lugar de forma periódica dando lugar a ciclos de aproximadamente 24 horas, que además son ritmos endógenos, es decir, propios de los relojes internos, y que no derivan de las actividades o de los cambios ambientales. A estos ritmos se les denomina 'ritmos circadianos'. La regulación de estos ciclos o ritmos circadianos está llevada a cabo por los relojes circadianos, los cuales son mecanismos moleculares endógenos que le permiten al cuerpo, mediante una serie de *feedbacks* negativos y positivos de transcripción y traducción, realizar ciclos de aproximadamente 24 horas. Esto nos permite mantener los ritmos fisiológicos aunque no haya estímulos externos para sincronizarlos. El principal sincronizador de los ritmos circadianos son los ciclos de luz y oscuridad, que sincronizan el reloj central. Las horas de las comidas se consideran un factor sincronizador importante de los relojes periféricos presentes en órganos y tejidos relacionados con la alimentación, entre ellos el TA.^{17,18}

Estudios previos han demostrado que existen ritmos circadianos en la expresión génica y el metabolismo en el tejido adiposo.¹⁹⁻²¹ Nuestro grupo de investigación demostró que la HSL presenta un ritmo circadiano en el tejido adiposo *ex vivo*, es decir un ritmo de 24h endógeno, ya que permanece incluso fuera del organismo cuando no hay influencia del reloj central y que por tanto, está producido por el propio reloj del TA.²² Estudios en modelos animales han mostrado que la movilización de grasa del TA se asocia con la amplitud del ritmo de HSL.²³ Además, otros estudios en animales muestran que la lipólisis aumenta en la fase de reposo del animal.²⁴ Sin embargo, todavía no se conoce en TA humano si existe un ritmo circadiano en la lipólisis, es decir, en la movilización de ácidos grasos.

El ritmo circadiano de la HSL alcanza su máximo (acrofase) aproximadamente a medianoche. Además, la amplitud este ritmo presenta una correlación positiva con la duración del ayuno nocturno, es decir, a mayor duración del ayuno nocturno, mayor amplitud del ritmo, lo que supondría una mayor movilización de grasa. Por otro lado, la amplitud del ritmo de HSL en humanos también presenta una correlación negativa con la hora de la última ingesta, lo que quiere decir que los sujetos que cenaban más temprano (antes de las 22:00 h aproximadamente), mostraban una mayor amplitud en el ritmo de esta enzima, lo que sugiere una mayor movilización de grasa.²²

Los horarios de ingesta y obesidad

Las intervenciones dietéticas son uno de los principales tratamientos en la pérdida de peso. En los últimos años, las terapias basadas en el cambio de hora de la ingesta, por ejemplo, adelantar la hora de la cena o de la comida principal del día, se han propuesto como herramientas eficaces para el adelgazamiento.

Se ha observado que el horario de la ingesta es un factor que influye en el metabolismo. En un estudio llevado a cabo por Jakubowicz *et al.*²⁵ en mujeres con sobrepeso u obesidad, los autores concluyeron que las personas que ingerían una mayor proporción de sus calorías diarias en el desayuno en comparación con aquellos que ingerían una mayor proporción de su ingesta diaria en la cena, perdían más peso y conseguían disminuir las concentraciones de glucosa en sangre y de insulina, así como de ghrelina (hormona estimuladora del hambre) con mayor eficacia. Otro estudio determinó que los individuos que son comedores tardíos (comen más tarde de la media de la población, por ejemplo, en este estudio llevado a cabo en España fue a las 15:00h aproximadamente) pierden menos peso durante el tratamiento de pérdida de peso que aquellos que son comedores tempranos (comen antes de la media). En ambos estudios tanto las calorías

consumidas como el ejercicio físico realizado eran similares, siendo la principal diferencia la hora de ingesta.²⁶

Una desincronización de nuestro horario de ingesta con los periodos de luz-oscuridad, ocasionada principalmente por una disponibilidad de alimento las 24 horas del día y el trabajo por turnos, puede provocar un desajuste de nuestros relojes internos (cronodisrupción), causando una alteración en los ritmos circadianos de numerosos procesos fisiológicos.^{27,28} La cronodisrupción, por tanto, parece estar relacionada con el desarrollo de obesidad, intolerancia a la glucosa, eventos cardiovasculares y diversas alteraciones metabólicas.^{28,29}

De esta manera podemos concluir que no solo el exceso de calorías consumidas contribuye a la obesidad, si no que el espacio temporal en el que se ingieren dichas calorías podría también estar contribuyendo al desarrollo de obesidad.

Unido a estos conceptos aparece la idea del ayuno como un mecanismo beneficioso para la salud, ya que en animales de experimentación se ha observado que una restricción calórica severa además de reducir el peso corporal parecía alargar la esperanza de vida.³⁰⁻³² Además, también se han descrito otros efectos como la disminución de grasa visceral, reducción de la glucosa en sangre, reducción de la presión sanguínea, etc.^{30,31} La restricción calórica también es capaz de inducir la autofagia, reciclando moléculas y orgánulos dañados, necesario en condiciones de restricción energética para poder abastecer al organismo de material necesario para obtener energía y generar nuevas biomoléculas.³³

Recientemente ha crecido el interés por las terapias que incluyen una restricción energética intermitente, en las que destacan dos categorías: ayuno intermitente y *time restricted eating*.^{34,35}

El ayuno intermitente consiste en periodos de ingesta *ad libitum* interrumpidos por periodos de entre 16 y 48 horas con ingesta nula o limitada. Hay varios tipos: el ayuno en días alternos, donde se alternan días de ayuno con días de ingesta *ad libitum*; el ayuno en días alternos modificado, en el que se alternan días con restricción calórica superior al 75% con días de ingesta *ad libitum*, o el ayuno periódico que consiste en ayunar 1 o 2 días a la semana y el resto de ingesta *ad libitum*.^{36,37}

La ingesta restringida en el tiempo o *time restricted eating* (TRE) consiste en limitar la ingesta a un determinado periodo del día, normalmente de 8 horas o menos, repitiendo el mismo patrón todos los días de la semana, reduciendo los periodos de ingesta y ajustándolos al día biológico, y sin necesidad de una restricción calórica, es decir, esta dieta permite una ingesta *ad libitum*.^{34,35}

Estudios recientes sugieren que una dieta TRE podría dar lugar a una reducción del peso corporal sin necesidad de contar las calorías.^{34,38,39} La reducción de peso en parte podría deberse a que los participantes tienden reducir de forma involuntaria las calorías ingeridas al día tras reducir el periodo de ingesta.^{34,38} Este tipo de dieta también parece tener mejor adherencia que las dietas de restricción calórica ya que la cantidad de calorías a ingerir no está limitada.^{34,39}

Por este motivo, resulta interesante analizar los efectos de un popular tipo de intervención dietética como es el TRE sobre la lipólisis y dilucidar si la hora del periodo de ingesta influye en el proceso lipolítico en explantes de TA *ex vivo*.

2. Objetivos

Para este trabajo se han planteado una serie de objetivos:

1. Estudiar si la lipolisis presenta un ritmo circadiano en el tejido adiposo, es decir, si observamos variaciones a lo largo del día en la función lipolítica *ex vivo* en explantes de tejido adiposo.
2. Analizar si el grado de lipolisis durante las 24 horas del día aumenta cuando se simula un ayuno completo (24 horas de ayuno) con respecto al control, que simula la ingesta habitual de un individuo en la que se come durante el día (16h) y se ayuna mientras se duerme (8h).
3. Determinar si en una simulación de TRE en tejido adiposo en cultivo ocurren cambios en el grado de lipolisis en función del horario de ingesta, si esta se hace por la mañana y se ayuna el resto del día o si se hace por la tarde-noche y se ayuna el resto del día.

La hipótesis que se propone con respecto al objetivo 1, basándonos en la evidencia previa, es que la lipolisis presenta un ritmo circadiano, alcanzando su máximo (acrofase) por la noche. La hipótesis 2 es que la lipolisis es mayor en un ayuno completo respecto al control. La hipótesis 3 es que, al comparar las condiciones de TRE entre ellas y con el control, la ingesta por la mañana será la que presente un grado de lipolisis más alto.

3. Materiales y métodos

Participantes

El TA subcutáneo se obtuvo de individuos con obesidad (7 mujeres y 3 hombres), edad 42 ± 4 años y un índice de masa corporal (IMC) de 40 ± 2 que fueron intervenidos mediante una cirugía de *bypass* gástrico por laparoscopia en el Hospital Quirónsalud (Murcia, España). Las características de la población se encuentran representadas en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Características generales de los participantes y sus hábitos de vida. Los datos están representados como media + SEM.

Características	Población total (n = 10)	
	Media	SEM
Edad (años)	41	4
IMC (kg/m ²)	38	2
Antropometría		
Circunferencia de la cadera (cm)	130	3
Índice Cintura-Cadera (ICC)	0,88	0,02
Diámetro abdominal sagital (DAS) (cm)	43	1
Diámetro coronal (DC) (cm)	29	2
Síndrome metabólico (MetS)		
Circunferencia de la cintura (cm)	114	5
Glucosa (mg/dl)	119,33	16,57
Presión arterial sistólica (mmHg)	112	5
Presión arterial diastólica (mmHg)	79	7
Sueño		
Comienzo del sueño (hh:mm)	0:09	0:47
Final del sueño (hh:mm)	8:07	0:58
Duración del sueño (hh:mm)	7:58	0:31
Hora de ingesta		
Hora del desayuno (hh:mm)	8:25	0:30
Hora de la comida (hh:mm)	14:40	0:20
Hora de la cena (hh:mm)	20:47	0:14

En el mismo día de la cirugía se obtuvieron las medidas antropométricas de los sujetos. El peso y la grasa corporal (%) se obtuvo mediante impedancia bioeléctrica empleando un equipo TANITA MC-580 (Tanita Corporation of America, EEUU). La altura se midió usando un estadiómetro digital Harpenden (escala 0.7-2.05) con el sujeto de pie y la cabeza en el plano de Frankfurt. A partir de estos datos se obtuvo el Índice de Masa Corporal (IMC) según la fórmula: peso corporal (kg)/altura² (m²). La distribución de la grasa corporal se determinó según el Índice Cintura-Cadera (ICC) tras medir la circunferencia de la cintura a la altura del ombligo y la circunferencia de la cadera como la circunferencia más grande medida sobre el trocánter mayor.

El consentimiento informado escrito se obtuvo siguiendo la Declaración de Helsinki, que recoge los principios para la experimentación médica en humanos, y fueron aprobados por el Comité de Ética de Investigación de la Universidad de Murcia (Murcia, España).

Estilo de vida

El mismo día de la cirugía se realizan varios cuestionarios a los participantes, los cuales incluyen diversas preguntas relacionadas con su hora habitual de irse a la cama, la hora a la que se duermen y se despiertan, y la hora de las tres comidas principales del día (desayuno, merienda y cena).

Procedimiento experimental

Tras la cirugía, la cual tiene lugar por la tarde, las biopsias de TA subcutáneo se colocan en una duquesita con Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) sin rojo fenol con 4.5 g/l de glucosa (D1145; GIBCO, EEUU), suplementado con 10% suero bovino fetal (SBF) (10270-106; GIBCO, EEUU), una mezcla de penicilina-estreptomicina (P0781; Sigma-Aldrich, EEUU) y glutamina (G7513; Sigma-Aldrich, EEUU) (**PSG**) y piruvato (S8736; Sigma-Aldrich, EEUU). En adelante nos referiremos a este medio como medio *feeding*, el cual se va a emplear en los periodos de ingesta. El tejido es trasladado inmediatamente al laboratorio donde se limpia, eliminando los vasos sanguíneos y el cartílago, y se lava en PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline; L0615; Biowest, Francia). A continuación, se corta en pequeñas porciones de diámetro aproximado de 1 mm a los que llamaremos explantes. En una báscula digital se pesan 400 mg de explantes. En una placa de 12 pocillos se colocan 400 mg en cada pocillo hasta rellenar un total 4 pocillos, correspondientes a cada condición ('Control', 'AM', 'PM' y '*fasting*'), tal y como se representa en la **Figura 3**. A estos pocillos se les añade 500 µl de medio *feeding*.

Este procedimiento se repite hasta obtener 7 placas iguales.

Zeitgeber es un término alemán que se refiere a una señal o estímulo capaz de sincronizar de los ritmos circadianos. *Zeitgeber time* es una medida de tiempo de los ciclos de 24 horas, siendo el ZT0 el inicio del ciclo que coincide con alguna señal sincronizadora.^{40,41} En este caso, el ZT0 establecido sería la hora a la que se añade el medio *feeding* tras un ayuno nocturno en la

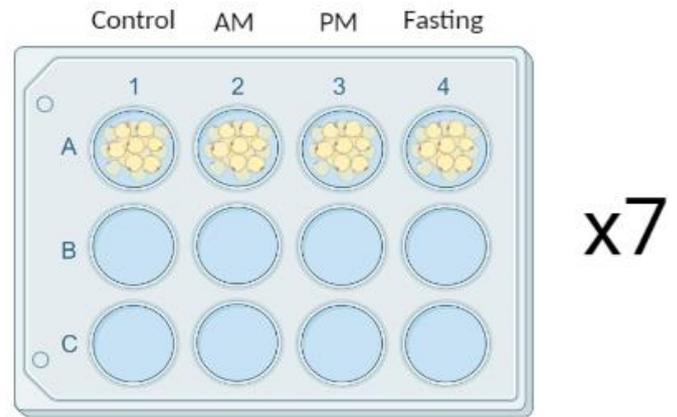


Figura 3. Esquema representativo de las 7 placas de 12 pocillos en las que se lleva a cabo el cultivo de los explantes.

condición control (08:00h), y se emplea la misma hora como ZT0 en el resto de las condiciones. El tejido y el medio de cultivo van a ser recogidos para posteriores análisis en diferentes puntos de tiempo o *Zeitgeber time* (ZTs), en intervalos de 4 horas durante las 24 horas posteriores: ZT0 (08:00h), ZT4 (12:00h), ZT8 (16:00h), ZT12 (20:00h), ZT16 (00:00h), ZT20 (04:00h) y ZT24 (08:00h). Cada placa corresponde a un ZT, por este motivo necesitamos 7 placas.

Las 7 placas se colocan en un incubador a 37°C y 7.5% CO₂. A las 00:00h se cambia el medio por DMEM sin rojo fenol ni glucosa, suplementado con PSG, que en adelante llamaremos medio *fasting*, que será el medio en el cual se encontrarán los explantes durante los periodos de ayuno, y se colocan de nuevo en el incubador, con esto se pretende simular un ayuno nocturno.

En el Día 1 comienzan los tratamientos descritos a continuación y se aplican a las 7 placas siguiendo el protocolo que se muestra en las **Figuras 4, 5, 6 y 7**.

A las 06:00h se cambia el medio *fasting* por medio de sincronización, compuesto por DMEM sin glucosa ni rojo fenol (A1443001, GIBCO, EEUU) suplementado con PSG al que se adiciona 1 µM de dexametasona (D4902, Sigma-Aldrich, EEUU), la cual se emplea para sincronizar los relojes circadianos de todos los explantes.^{42,43} Tras 1 hora de incubación el medio de sincronización es retirado, los explantes se lavan con PBS y se vuelve a añadir medio *fasting*.

Además, tal y como se ha representado en la **Figura 3**, en cada placa se simulan las diferentes condiciones que se pretenden estudiar (cada protocolo descrito a continuación se repite dos días, para que haya más de un día de tratamiento agudo y aseguremos que las muestras que recogemos realmente plasman el efecto del tratamiento):

- **Control:** simula una ingesta continua de 8:00h a 00:00h y un ayuno nocturno de 8 horas, tal y como sería en la sociedad actual con disponibilidad de comida a cualquier hora del día (**Figura 4**).

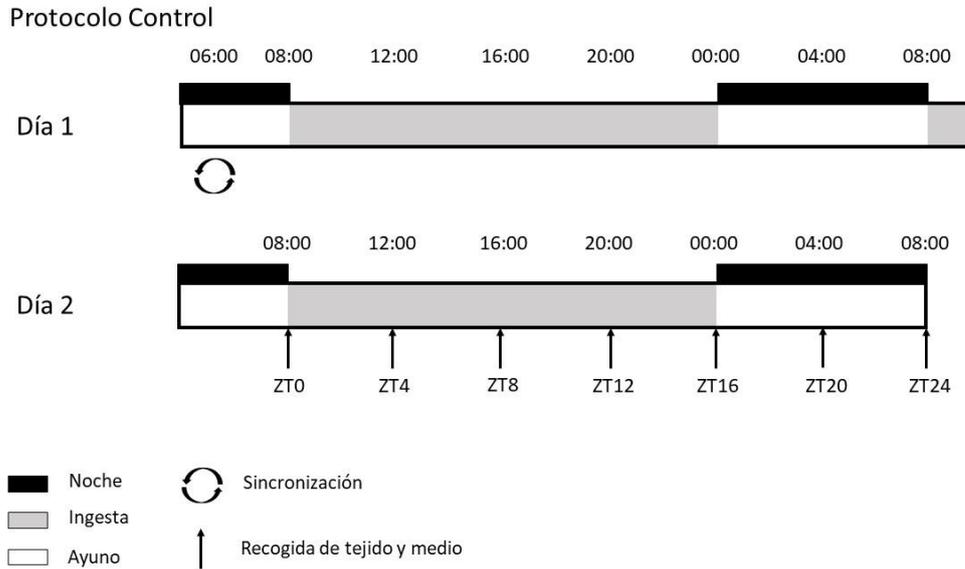


Figura 4. Esquema del protocolo del patrón de ayuno-ingesta y de la recogida de muestras seguido en la condición control.

- **AM:** simula una dieta TRE 20:4 (20 horas de ayuno y 4 horas de ingesta), cuya ventana de ingesta se sitúa de 8:00h a 12:00h (**Figura 5**).

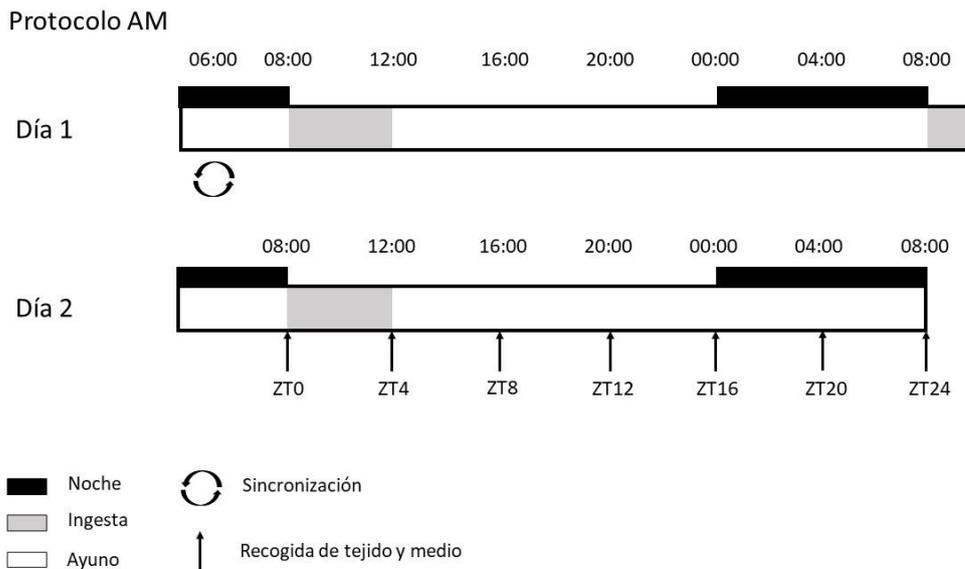


Figura 5. Esquema del protocolo del patrón de ayuno-ingesta y de la recogida de muestras seguido en la condición AM.

- **PM**: simula una dieta TRE 20:4, cuya ventana de ingesta se sitúa de 16:00h a 20:00h (Figura 6).

Protocolo PM

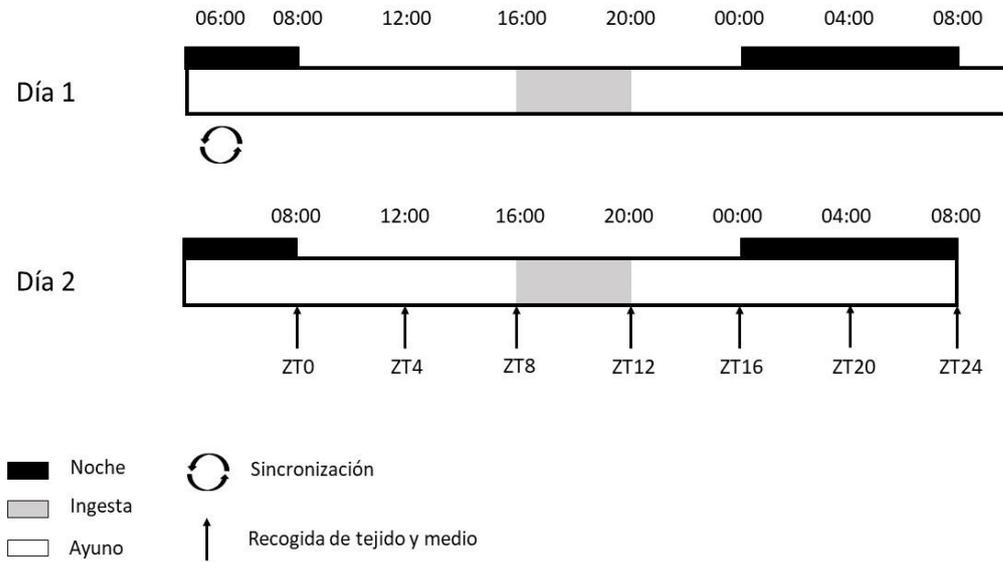


Figura 6. Esquema del protocolo del patrón de ayuno-ingesta y de la recogida de muestras seguido en la condición PM.

- **Fasting**: simula un ayuno completo (24 horas al día), no presenta ninguna ventana de ingesta (Figura 7).

Protocolo Fasting

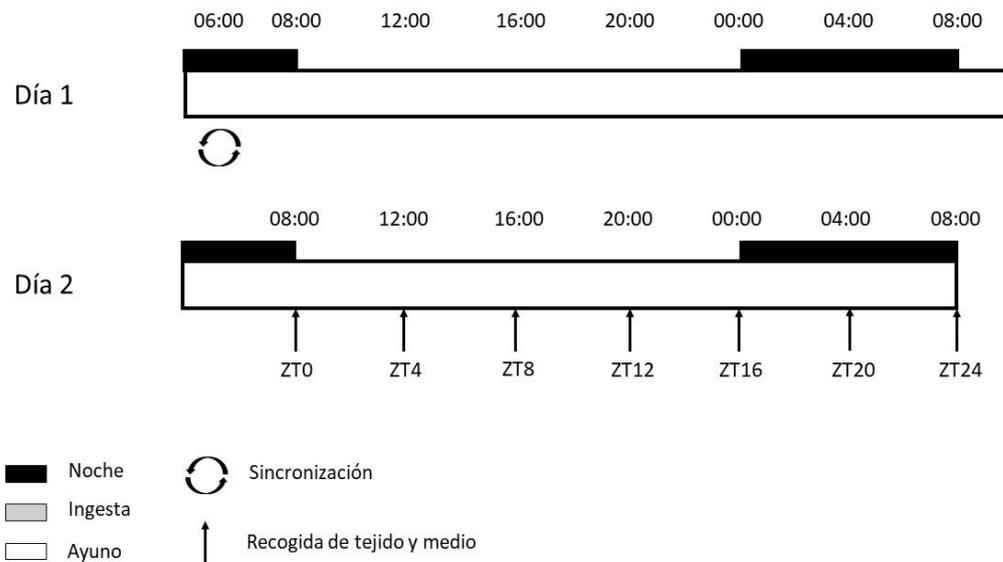


Figura 7. Esquema del protocolo del patrón de ayuno-ingesta y de la recogida de muestras seguido en la condición fasting.

Una vez finaliza el ayuno nocturno al que están sometidas las cuatro condiciones, a las 08:00h se cambia el medio de las condiciones control y AM por medio *feeding* para iniciar sus respectivos periodos de ingesta. A las 12:00h se cambia el medio de la condición AM por medio *fasting*, ya que a esta hora finaliza su ingesta, y se refresca el medio de la condición control. A las 16:00h se cambia el medio de la condición PM por medio *feeding*, iniciando sus 4 horas de ingesta, y se refresca de nuevo el medio de la condición control. A las 20:00h se cambia el medio de la condición PM por medio *fasting* y se refresca el medio de la condición control. A las 00:00h se cambia el medio de la condición control por medio *fasting*.

En el Día 2 se cambia el medio de cultivo siguiendo el mismo patrón de ingesta-ayuno. En este día, cada 4 horas, es decir, en cada ZT, se introduce el TA de cada pocillo en un criotubo, que son inmediatamente sumergidos en nitrógeno líquido para detener los procesos celulares, y el medio de cultivo se recoge en eppendorfs, y se almacenan ambos a -80°C para su posterior análisis.

En la **Tabla 2** encontramos un resumen de todos los medios de cultivo empleados.

Tabla 2. Descripción de los medios de cultivo empleados durante el procedimiento experimental.

Medio	Descripción
Medio <i>feeding</i>	DMEM sin rojo fenol + 4.5 g/l glucosa + 10% SBF + PSG + piruvato
Medio <i>fasting</i>	DMEM sin rojo fenol + PSG
Medio sincronización	DMEM sin rojo fenol + PSG + 1 μ M dexametasona

Todo el trabajo relacionado con el cultivo de TA se realizó en una cabina de flujo laminar de bioseguridad tipo 2 y en condiciones estériles.

Determinación de glicerol liberado

Para cuantificar la lipólisis se va a analizar la cantidad de glicerol liberado al medio de cultivo, puesto que este es uno de los productos finales de la lipólisis. El glicerol apenas es reutilizado por el TA, así que su detección es una estimación fiable de la actividad lipolítica.⁴⁴ La determinación de glicerol en el medio se llevó a cabo mediante un ensayo de fluorescencia descrito en la sección **Anexos**. La fluorescencia se determinó empleando un lector de placas (CLARIOstar Plus, BMG LABTECH, Alemania) a las longitudes de onda excitación/emisión de 530/590 nm.

Análisis estadístico

Para determinar la existencia de un ritmo circadiano en la liberación de glicerol se empleó el software CircWave (v1.4, desarrollado por R.A. Hut; <https://www.euclock.org>) para realizar un análisis cosinor, que ajusta los datos introducidos a una onda sinusoidal. Cuando los valores reales de glicerol se acercan a la curva de cosinor, se considera que el ritmo es significativo ($P < 0.05$)

Para el resto de los análisis estadísticos descritos a continuación, así como para la representación gráfica de los datos se empleó el *software* GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad, EEUU).

Para determinar las diferencias en el grado de lipólisis de las 24 horas del día entre las diferentes condiciones se calculó el área bajo la curva (AUC) de glicerol liberado. Para contrastar si la distribución de los datos sigue un patrón de normalidad se realizó una prueba de Shapiro-Wilk. Como el valor P fue >0.05 , se consideró que los datos siguieron un patrón normal. La homogeneidad de las varianzas se determinó mediante una prueba de Bartlett. Al ser las varianzas homogéneas, los datos se analizaron empleando un ANOVA de un factor, en caso de significancia se empleó una prueba de Bonferroni para evaluar diferencias entre las distintas condiciones.

Se consideró estadísticamente significativo un P -valor inferior a 0.05. Todos los datos están expresados como media \pm error estándar de la media (SEM).

Contribución personal al proyecto

Con respecto a mi aportación a este proyecto, he colaborado en el diseño del procedimiento experimental de este estudio. También he participado en la fase experimental, realizando el cultivo del tejido. Los ensayos de fluorescencia han sido realizados por mí, así como el posterior tratamiento de los datos y análisis estadístico.

4. Resultados y discusión de los resultados

4.1. Existencia de un ritmo circadiano en la lipólisis del tejido adiposo humano

Nuestros resultados muestran la existencia de ritmos circadianos en la actividad lipolítica del tejido adiposo subcutáneo humano en las condiciones control, AM y PM.

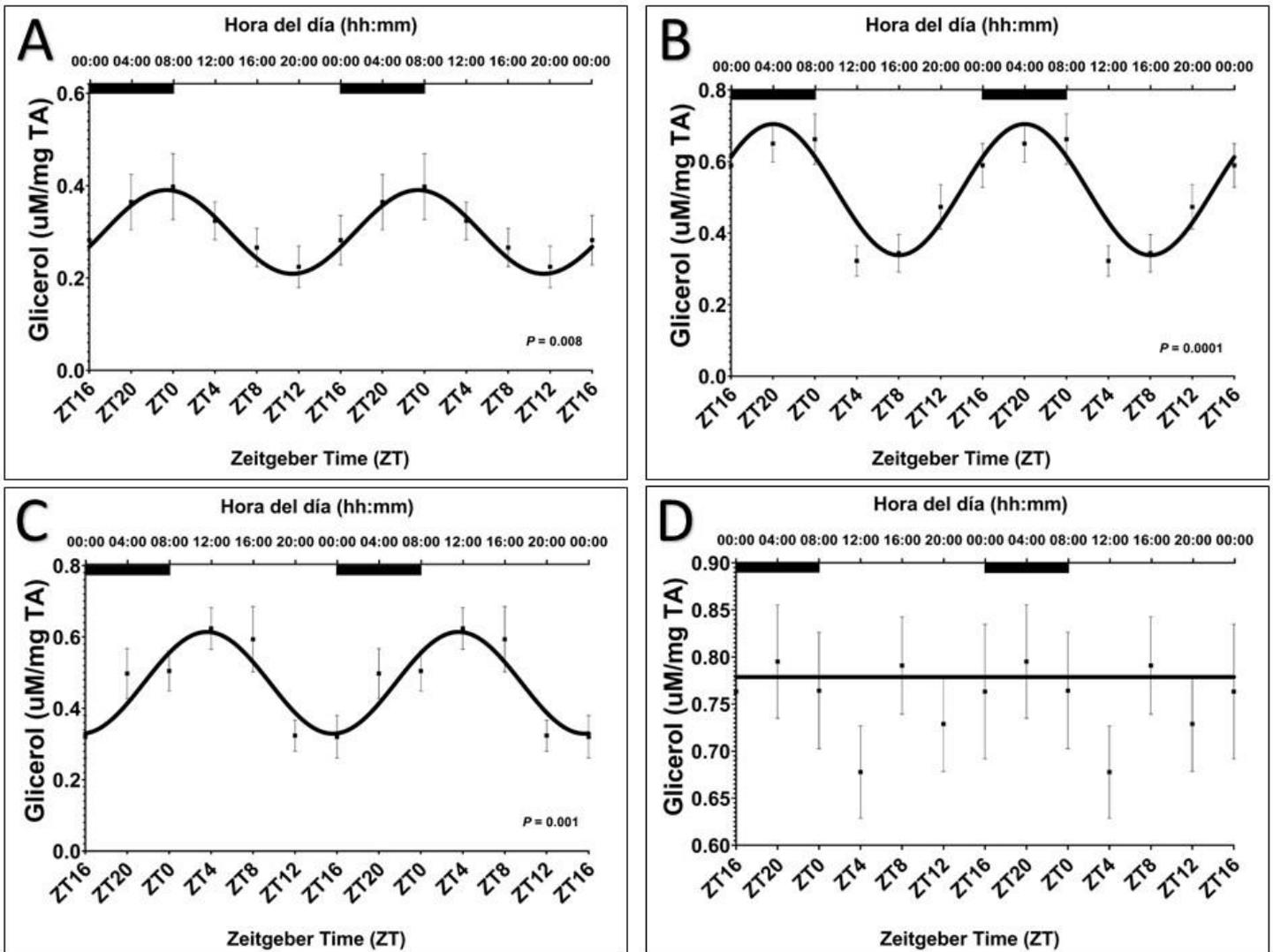


Figura 8. Cambios en la actividad lipolítica a lo largo del día en TA subcutáneo (expresado como μM de glicerol liberado al medio por cada mg de tejido) en la población total ($n = 10$) en **A**) condición control, **B**) condición AM, **C**) condición PM y **D**) condición fasting. El tiempo está representado en Zeitgeber Time (ZT) en el eje X inferior, y como hora del día en el eje X superior. Los datos están representados por los puntos negros con barras de error y la línea continua representa la curva sinusoidal ajustada generada por el software CircWave. Los datos están expresados como media \pm SEM.

En el ritmo de la condición control ($P = 0.008$; **Figura 8A**), la acrofase (el punto donde alcanza su valor más alto) tiene lugar a las 07:23h.

En modelos animales alimentados *ad libitum* se ha observado *in vivo* la presencia de variaciones a lo largo del día en la concentración de glicerol y ácidos grasos no esterificados, lo que sugiere la existencia de un ritmo circadiano en la actividad lipolítica. Estas concentraciones eran superiores durante el periodo de sueño al compararlas con aquellas concentraciones determinadas durante el periodo de actividad donde tiene lugar la ingesta,^{23,45} asemejándose al ritmo que nosotros hemos determinado en la condición control.

Los datos obtenidos reproducen el ritmo circadiano observado *in vivo* en humanos en condiciones de ingesta y sueño normales. Este estudio halló un ritmo circadiano en la liberación de glicerol en el tejido adiposo subcutáneo (medido mediante microdiálisis), el cual comenzaba a aumentar sobre las 20:00h y experimentaba un descenso a las 08:00h cuando tenía lugar la primera ingesta.⁴⁶ Estos resultados coinciden con el ritmo que nosotros hemos observado en la condición control, aumentando la lipólisis durante la noche y descendiendo con la ingesta.

Al analizar los ritmos circadianos en el resto de condiciones encontramos que tanto el AM ($P = 0.0001$; **Figura 8B**) como el PM ($P = 0.001$; **Figura 8C**) mantienen un ritmo aunque en diferente fase. La acrofase de la condición AM se encuentra a las 04:01h, mientras que la acrofase de la condición PM se localiza a las 11:36h.

Por el contrario, los datos de la condición fasting (**Figura 8D**) no se ajustaron a una curva sinusoidal indicando que no presentaba ningún ritmo. Esto podría indicar que el ritmo observado procede del tratamiento aplicado más que de un ritmo propio del tejido.

Un estudio previo observó que, en hígado de ratones, la mayoría de los transcritos que bajo una ingesta *ad libitum* o un ayuno restringido presentaban un patrón de expresión circadiano, cesaban esta expresión rítmica durante un ayuno prolongado.⁴⁷ Estos resultados podrían indicar que un ayuno prolongado tiene consecuencias a nivel celular que pueden afectar a los relojes circadianos, siendo esta una posible explicación a por qué la condición *fasting* es la única que no muestra un ritmo circadiano.

4.2. Diferencias en el ritmo diario entre las diferentes condiciones estudiadas

En la **Figura 9** están representadas las curvas de glicerol liberado al medio de cultivo de las cuatro condiciones.

En la condición control se puede apreciar como libera menos glicerol que el resto de las condiciones, por lo que sería la que menos lipólisis realiza a lo largo de las 24 horas.

En la condición AM, que se refiere a aquella condición que simula la ingesta de 8:00h a 12:00h, se observa un marcado descenso del glicerol liberado durante la ingesta (entre ZT0 y ZT4), indicando una inhibición de la lipólisis, ya que esta se reduce en la ingesta al tener disponible la glucosa como fuente de energía, y progresivamente va aumentando conforme aumentan las horas que está en ayuno.

De la misma manera, en la condición PM, que se refiere a aquella condición que simula la ingesta de 16:00h a 20:00h, se observa de igual forma un marcado descenso del glicerol liberado durante la ingesta (entre ZT8 y ZT12) que progresivamente va aumentando tras comenzar el ayuno.

Por último, en la condición fasting, que realiza 24 horas de ayuno continuado, la lipólisis presenta valores más elevados que el resto de las condiciones, los cuales se mantienen relativamente estables durante las 24 horas, como era de esperar dentro de una situación en la que no hay sustrato energético y el TA debe aportar este sustrato mediante la movilización de grasa.

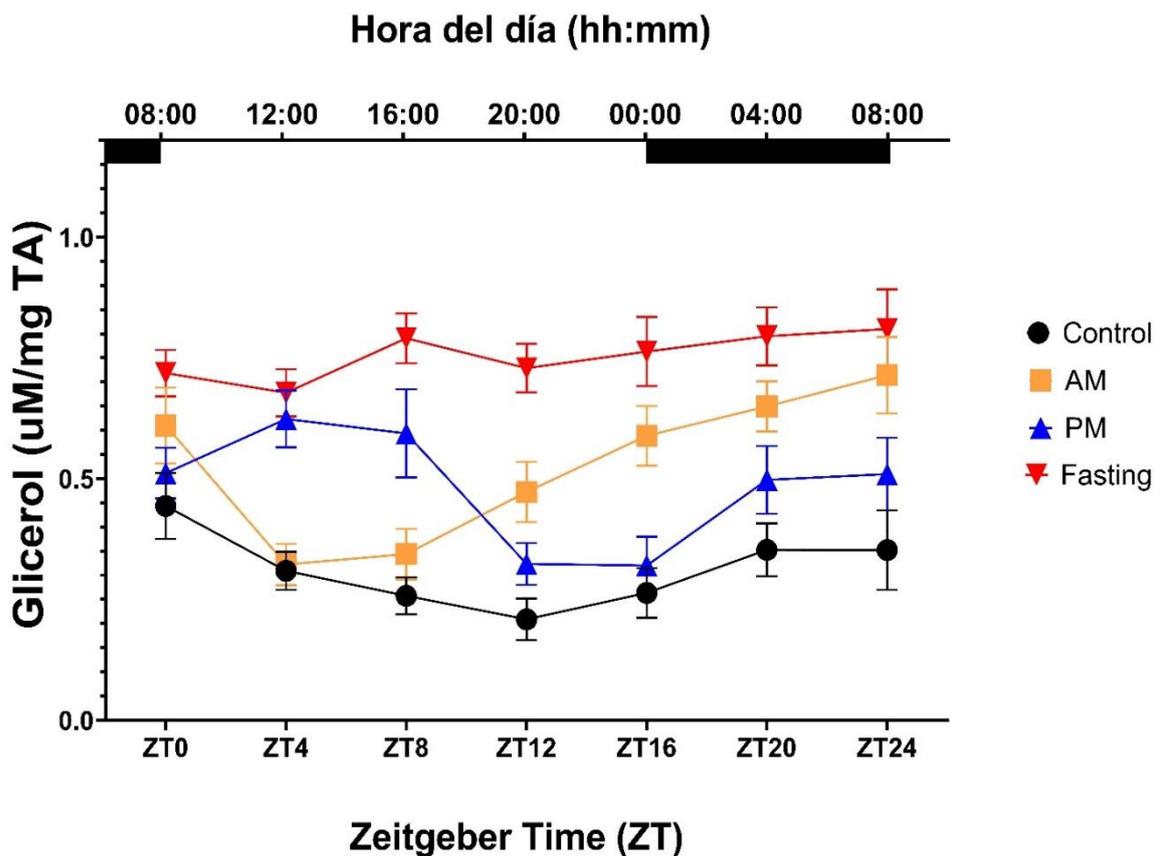


Figura 9. Evolución de la lipólisis a lo largo de 24 horas en los cuatro grupos de tratamiento (n = 10).

Durante el ayuno, los lípidos se convierten en la principal fuente de energía, ya que son la mayor reserva de energía del organismo gracias a su eficiencia energética. Tras la ingesta, la glucosa es utilizada por el organismo como fuente de energía, mientras que la grasa se almacena en el tejido adiposo. Una vez que los carbohidratos se agotan, el organismo emplea la grasa almacenada en forma de TAG en el TA, donde los ácidos grasos y el glicerol liberados gracias a la lipólisis servirán para proporcionar al organismo una fuente de energía.^{7,48,49} Este cambio en el metabolismo durante el ayuno es capaz de explicar los distintos cambios en la actividad lipolítica que se observan en las curvas de las cuatro condiciones, pudiendo ser una explicación al aumento de la lipólisis en las condiciones que simulan una dieta TRE.

4.3. Comparativa en el grado de lipólisis entre las diferentes condiciones

Para determinar el grado de lipólisis durante 24 horas en las diferentes condiciones se calculó el área bajo la curva, y nuestros resultados del ANOVA muestran diferencias significativas entre la condición *fasting* y todas las demás condiciones, siendo la primera significativamente mayor. También entre el control y la condición de TRE AM se encontraron diferencias significativas.

La condición *fasting*, tal y como se espera, aumenta de manera significativa el total de glicerol liberado durante 24 horas, frente a la condición control ($P < 0.0001$; **Figura 10**). Por lo que un ayuno completo estimula la lipólisis en mayor medida que una ingesta continua durante el día.

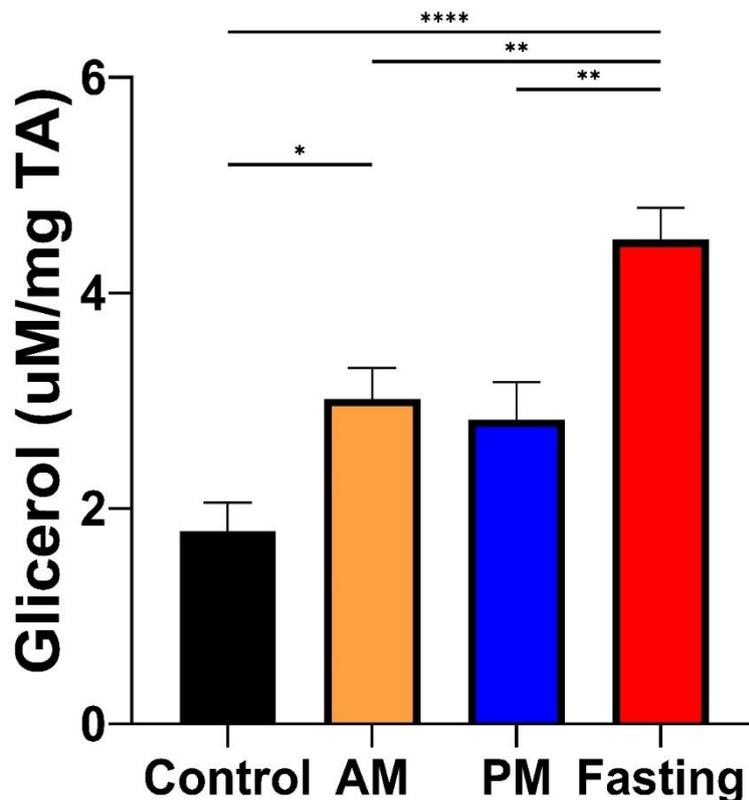


Figura 10. Análisis del área bajo la curva del glicerol liberado durante 24 horas en las cuatro condiciones ($n=10$). * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$. Datos representados como media \pm SEM.

En el TA, el estado nutricional influye en la expresión de ciertos factores que promueven o inhiben la lipólisis. Según un estudio de Nielsen et al. llevado a cabo en humanos, un ayuno prolongado incrementa la cantidad de la lipasa adipocítica de triacilglicéridos o ATGL presente en explantes de tejido adiposo.⁵⁰ La fosfolipasa A₂ específica de adipocitos (AdPLA) es una enzima que cataliza la hidrólisis de fosfolípidos y que ha mostrado capacidad para inhibir la lipólisis. La expresión de AdPLA es inducida tras la ingesta, siendo otra posible ruta para la regulación de la lipólisis según el estado nutricional.⁵¹

Concordando con que la condición control, que es la condición con una ingesta continuada a lo largo del día, realiza menos lipólisis que el resto, mientras que la condición *fasting*, que realiza un ayuno continuo, presenta más actividad lipolítica que el resto.

Al analizar qué tratamiento TRE favorece más la lipólisis, hallamos que únicamente la condición AM mostró diferencias significativas con el control ($P = 0.0364$), lo que significaría una mayor lipólisis (**Figura 10**), no habiendo así diferencias significativas entre ambos tratamientos TRE.

Esto quiere decir que, al menos *ex vivo*, parece que realizar una dieta TRE en la que las 4 horas de ingesta se sitúan por la mañana favorece la lipólisis de forma significativa respecto a una ingesta continuada durante el día, lo que *in vivo* se traduciría en una mayor movilización de grasa corporal, que resulta esencial para combatir la obesidad.

Las dietas TRE parecen tener efectos beneficiosos en la salud cardiometabólica gracias al establecimiento de un horario fijo de ingesta, favoreciendo un ritmo circadiano más robusto.^{52,53} Establecer un horario de ingesta parece sincronizar y aumentar la amplitud de muchos genes controlados por los relojes periféricos, dando lugar a que los procesos metabólicos que controlan tengan lugar en el momento apropiado del ciclo de ayuno-ingesta⁵².

El tratamiento AM en particular parece ser más efectivo que el tratamiento PM en términos de actividad lipolítica tras compararlos con el control, resaltando la importancia de la hora de la ingesta. Esto parece sugerir que la eficacia de las dietas TRE también depende de la hora a la que se fija el periodo de ingesta.

¿A qué se deben estas diferencias? Una posible explicación a esto es la presencia de ritmos circadianos en muchos procesos biológicos. El metabolismo parece estar más adaptado a una ingesta temprana, ya que, por ejemplo, la sensibilidad a la insulina o el efecto termogénico de los alimentos están aumentados por la mañana.^{54,55} Adelantar la hora de ingesta ha demostrado en otros estudios ser más ventajoso en relación a la pérdida de peso y otras alteraciones

metabólicas que una ingesta más tardía.^{25,26,56} Estos resultados sugieren que combinar una dieta TRE con una ingesta temprana podría tener un efecto sinérgico en cuanto a sus respectivos beneficios.

4.4. Limitaciones

Una limitación de este estudio es el bajo número de participantes (n = 10) que aporta una baja significancia estadística. Además, los participantes eran individuos con obesidad y, por ende, es posible que estos resultados no puedan ser aplicados directamente a la población general. Otra limitación es que el estudio está llevado a cabo en TA *ex vivo*, por tanto, se precisa realizar estudios intervencionales *in vivo* para determinar el impacto real de estos tratamientos en personas, ya que hay otros factores, como el sistema nervioso o el endocrino, que intervienen en la lipólisis.¹³ Los hábitos dietéticos del sujeto antes de la cirugía, las condiciones del cultivo y el propio proceso quirúrgico pueden afectar al ritmo de la lipólisis.

Es importante que en un futuro se realicen intervenciones *in vivo* para comprobar si una dieta TRE permite combatir la obesidad sin limitar las calorías diarias, gracias a la alineación del periodo de ingesta con los ciclos de luz-oscuridad, que son el principal sincronizador del reloj circadiano central.²⁸

5. Conclusiones

En este proyecto hemos observado un patrón rítmico en la actividad lipolítica en explantes de TA humano en la condición control y ambas condiciones de TRE pero que no se ha podido replicar en una condición de ayuno continuo. Los resultados obtenidos sugieren que limitar la ingesta a un periodo de 4 horas por la mañana y ayunar el resto aumenta la lipólisis *ex vivo*, respecto a una alimentación clásica con ingesta durante todo el periodo de vigilia y ayuno durante el sueño, destacando el papel tanto del ayuno, aumentando la movilización de TAG, como de la hora de la ingesta, sincronizando los relojes circadianos y alineando la ingesta con los relojes circadianos, en las terapias de pérdida de peso

Estos resultados realzan el posible uso de TRE como terapia contra la obesidad en humanos, pudiendo así acercarse más al objetivo final que sería trasladarlo en un futuro a la práctica clínica, tratándose de una novedosa intervención no farmacológica como tratamiento de la obesidad y enfermedades metabólicas asociadas.

6. Referencias Bibliográficas

1. Koliaki C, Spinou T, Spinou M, Brinia ME, Mitsopoulou D, Katsilambros N. Defining the Optimal Dietary Approach for Safe, Effective and Sustainable Weight Loss in Overweight and Obese Adults. *Healthcare* 2018, Vol 6, Page 73. 2018;6(3):73. doi:10.3390/HEALTHCARE6030073
2. Obesity and overweight. Accessed May 25, 2022. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
3. FOOD SECURITY AND NUTRITION IN THE WORLD THE STATE OF. Published online 2019. Accessed May 25, 2022. www.fao.org/publications
4. Frigolet ME, Gutiérrez-Aguilar R. The colors of adipose tissue. *Gaceta medica de Mexico*. 2020;156(2):142-149. doi:10.24875/GMM.M20000356
5. Cohena P, Spiegelmanb BM. Cell biology of fat storage. *Molecular Biology of the Cell*. 2016;27(16):2523. doi:10.1091/MBC.E15-10-0749
6. Morigny P, Boucher J, Arner P, Langin D. Lipid and glucose metabolism in white adipocytes: pathways, dysfunction and therapeutics. *Nature Reviews Endocrinology*. 2021;17(5). doi:10.1038/s41574-021-00471-8
7. Rosen ED, Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature*. 2006;444(7121):847. doi:10.1038/NATURE05483
8. Mittal B. Subcutaneous adipose tissue & visceral adipose tissue. *The Indian Journal of Medical Research*. 2019;149(5):571. doi:10.4103/IJMR.IJMR_1910_18
9. Matafome P, Seica R. Function and dysfunction of adipose tissue. *Advances in Neurobiology*. 2017;19:3-31. doi:10.1007/978-3-319-63260-5_1
10. Esteve Ràfols M. Adipose tissue: Cell heterogeneity and functional diversity. *Endocrinología y Nutrición (English Edition)*. 2014;61(2):100-112. doi:10.1016/J.ENDOEN.2014.02.001
11. Zechner R, Zimmermann R, Eichmann TO, et al. FAT SIGNALS - Lipases and Lipolysis in Lipid Metabolism and Signaling. *Cell Metabolism*. 2012;15(3):279. doi:10.1016/J.CMET.2011.12.018
12. Lafontan M, Langin D. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Progress in Lipid Research*. 2009;48(5):275-297. doi:10.1016/J.PLIPRES.2009.05.001
13. Frühbeck G, Méndez-Giménez L, Fernández-Formoso JA, Fernández S, Rodríguez A. Regulation of adipocyte lipolysis. *Nutrition Research Reviews*. 2014;27(1):63-93. doi:10.1017/S095442241400002X
14. Nielsen TS, Jessen N, Jørgensen JOL, Møller N, Lund S. Dissecting adipose tissue lipolysis: Molecular regulation and implications for metabolic disease. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2014;52(3). doi:10.1530/JME-13-0277

15. Li Y, Li Z, Ngandiri DA, Llerins Perez M, Wolf A, Wang Y. The Molecular Brakes of Adipose Tissue Lipolysis. *Frontiers in Physiology*. 2022;13:67. doi:10.3389/FPHYS.2022.826314/BIBTEX
16. Chen S, Huang X. Cytosolic lipolysis in non-adipose tissues: energy provision and beyond. *The FEBS Journal*. Published online 2021. doi:10.1111/FEBS.16161
17. Gooley JJ. Circadian regulation of lipid metabolism. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2016;75(4):440-450. doi:10.1017/S0029665116000288
18. Kiehn JT, Tsang AH, Heyde I, et al. Circadian rhythms in adipose tissue physiology. *Compr Physiol*. 2017;7(2):383-427. doi:10.1002/CPHY.C160017
19. Gómez-Santos C, Gómez-Abellán P, Madrid JA, et al. Circadian Rhythm of Clock Genes in Human Adipose Explants. *Obesity (Silver Spring)*. 2009;17(8):1481. doi:10.1038/OBY.2009.164
20. Carrasco-Benso MP, Rivero-Gutierrez B, Lopez-Minguez J, et al. Human adipose tissue expresses intrinsic circadian rhythm in insulin sensitivity. *FASEB Journal*. 2016;30(9):3117-3123. doi:10.1096/FJ.201600269RR/-/DC1
21. Gómez Abellán P, Gómez Santos C, Madrid JA, et al. Site-specific circadian expression of leptin and its receptor in human adipose tissue. *Nutricion hospitalaria*. 2011;26(6):1394. doi:10.1590/S0212-16112011000600029
22. Arredondo-Amador M, Zambrano C, Kulyté A, et al. Circadian Rhythms in Hormone-sensitive Lipase in Human Adipose Tissue: Relationship to Meal Timing and Fasting Duration. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2020;105(12):e4407. doi:10.1210/CLINEM/DGAA492
23. Shostak A, Meyer-Kovac J, Oster H. Circadian regulation of lipid mobilization in white adipose tissues. *Diabetes*. 2013;62(7):2195-2203. doi:10.2337/DB12-1449/-/DC1
24. Kiehn JT, Koch CE, Walter M, Brod A, Oster H. Circadian rhythms and clocks in adipose tissues: current insights. *ChronoPhysiology and Therapy*. 2017;7:7-17. doi:10.2147/CPT.S116242
25. Jakubowicz D, Barnea M, Wainstein J, Froy O. High Caloric intake at breakfast vs. dinner differentially influences weight loss of overweight and obese women. *Obesity*. 2013;21(12):2504-2512. doi:10.1002/OBY.20460
26. Dashti HS, Gómez-Abellán P, Qian J, et al. Late eating is associated with cardiometabolic risk traits, obesogenic behaviors, and impaired weight loss. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2021;113(1):154. doi:10.1093/AJCN/NQAA264
27. Davis R, Rogers M, Coates AM, Leung GKW, Bonham MP. The Impact of Meal Timing on Risk of Weight Gain and Development of Obesity: a Review of the Current Evidence and Opportunities for Dietary Intervention. *Current Diabetes Reports*. 2022;22(4):147. doi:10.1007/S11892-022-01457-0
28. Mattson MP, Allison DB, Fontana L, et al. Meal frequency and timing in health and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(47):16647. doi:10.1073/PNAS.1413965111

29. Morris CJ, Yang JN, Scheer FAJL. The impact of the circadian timing system on cardiovascular and metabolic function. *Prog Brain Res.* 2012;199:337. doi:10.1016/B978-0-444-59427-3.00019-8
30. Baumeier C, Kaiser D, Heeren J, et al. Caloric restriction and intermittent fasting alter hepatic lipid droplet proteome and diacylglycerol species and prevent diabetes in NZO mice. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids.* 2015;1851(5):566-576. doi:10.1016/J.BBALIP.2015.01.013
31. Brandhorst S, Choi IY, Wei M, et al. A periodic diet that mimics fasting promotes multi-system regeneration, enhanced cognitive performance and healthspan. *Cell Metab.* 2015;22(1):86. doi:10.1016/J.CMET.2015.05.012
32. Curtis J, de Cabo R. Utilizing calorie restriction to evaluate the role of sirtuins in healthspan and lifespan of mice. *Methods Mol Biol.* 2013;1077:303-311. doi:10.1007/978-1-62703-637-5_20
33. Chung KW, Chung HY. The Effects of Calorie Restriction on Autophagy: Role on Aging Intervention. *Nutrients.* 2019;11(12). doi:10.3390/NU1122923
34. Gabel K, Hoddy KK, Haggerty N, et al. Effects of 8-hour time restricted feeding on body weight and metabolic disease risk factors in obese adults: A pilot study. *Nutrition and Healthy Aging.* 2018;4(4):345. doi:10.3233/NHA-170036
35. Rynders CA, Thomas EA, Zaman A, Pan Z, Catenacci VA, Melanson EL. Effectiveness of Intermittent Fasting and Time-Restricted Feeding Compared to Continuous Energy Restriction for Weight Loss. *Nutrients.* 2019;11(10). doi:10.3390/NU11102442
36. Anton SD, Moehl K, Donahoo WT, et al. Flipping the Metabolic Switch: Understanding and Applying Health Benefits of Fasting. *Obesity (Silver Spring).* 2018;26(2):254. doi:10.1002/OBY.22065
37. Fanti M, Mishra A, Longo VD, Brandhorst S. Time-Restricted Eating, Intermittent Fasting, and Fasting-Mimicking Diets in Weight Loss. *Current Obesity Reports.* 2021;10(2):70-80. doi:10.1007/S13679-021-00424-2
38. Gill S, Panda S. A smartphone app reveals erratic diurnal eating patterns in humans that can be modulated for health benefits. *Cell Metab.* 2015;22(5):789. doi:10.1016/J.CMET.2015.09.005
39. Schroder JD, Falqueto H, Mânica A, et al. Effects of time-restricted feeding in weight loss, metabolic syndrome and cardiovascular risk in obese women. *Journal of Translational Medicine.* 2021;19(1):3. doi:10.1186/S12967-020-02687-0
40. Overview of Circadian Rhythms. Accessed May 26, 2022. <https://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arh25-2/85-93.htm>
41. Lewy AJ, Emens J, Songer J, Rough J. The neurohormone melatonin as a marker, medicament, and mediator. *Hormones, Brain and Behavior Online.* Published online 2009:2505-2528. doi:10.1016/B978-008088783-8.00080-2
42. Wu X, Yu G, Parks H, et al. Circadian Mechanisms in Murine and Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Following Dexamethasone Exposure. *Bone.* 2008;42(5):861. doi:10.1016/J.BONE.2007.12.226

43. Maury E, Navez B, Brichard SM. Circadian clock dysfunction in human omental fat links obesity to metabolic inflammation. *Nature Communications* 2021 12:1. 2021;12(1):1-17. doi:10.1038/s41467-021-22571-9
44. Ghorbani A, Abedinzade M. Comparison of In Vitro and In Situ Methods for Studying Lipolysis . *ISRN Endocrinology*. 2013;2013:1-6. doi:10.1155/2013/205385
45. Benavides A, Siches M, Llobera M. Circadian rhythms of lipoprotein lipase and hepatic lipase activities in intermediate metabolism of adult rat. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. 1998;275(3 44-3). doi:10.1152/AJPREGU.1998.275.3.R811
46. Hagström-Toft E, Bolinder J, Ungerstedt U, Arner P. A circadian rhythm in lipid mobilization which is altered in IDDM. *Diabetologia*. 1997;40(9):1070-1078. doi:10.1007/S001250050789
47. Vollmers C, Gill S, DiTacchio L, Pulivarthy SR, Le HD, Panda S. Time of feeding and the intrinsic circadian clock drive rhythms in hepatic gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(50):21453. doi:10.1073/PNAS.0909591106
48. Izumida Y, Yahagi N, Takeuchi Y, et al. Glycogen shortage during fasting triggers liver–brain–adipose neurocircuitry to facilitate fat utilization. *Nature Communications*. 2013;4. doi:10.1038/NCOMMS3316
49. Kolb H, Kempf K, Röhling M, Lenzen-Schulte M, Schloot NC, Martin S. Ketone bodies: from enemy to friend and guardian angel. *BMC Medicine*. 2021;19(1):313. doi:10.1186/S12916-021-02185-0
50. Nielsen TS, Vendelbo MH, Jessen N, et al. Fasting, but not exercise, increases adipose triglyceride lipase (ATGL) protein and reduces G(0)/G(1) switch gene 2 (G0S2) protein and mRNA content in human adipose tissue. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2011;96(8). doi:10.1210/JC.2011-0149
51. Jaworski K, Ahmadian M, Duncan RE, et al. AdPLA ablation increases lipolysis and prevents obesity induced by high fat feeding or leptin deficiency. *Nat Med*. 2009;15(2):159. doi:10.1038/NM.1904
52. Longo VD, Panda S. Fasting, circadian rhythms, and time restricted feeding in healthy lifespan. *Cell Metab*. 2016;23(6):1048. doi:10.1016/J.CMET.2016.06.001
53. Chaix A, Manoogian ENC, Melkani GC, Panda S. Time-Restricted Eating to Prevent and Manage Chronic Metabolic Diseases. *Annu Rev Nutr*. 2019;39:291. doi:10.1146/ANNUREV-NUTR-082018-124320
54. Sutton EF, Beyl R, Early KS, Cefalu WT, Ravussin E, Peterson CM. Early Time-Restricted Feeding Improves Insulin Sensitivity, Blood Pressure, and Oxidative Stress Even Without Weight Loss in Men with Prediabetes. *Cell Metab*. 2018;27(6):1212. doi:10.1016/J.CMET.2018.04.010
55. Morris CJ, Garcia JI, Myers S, Yang JN, Trienekens N, Scheer FAJL. The human circadian system has a dominating role in causing the morning/evening difference in early diet-induced thermogenesis. *Obesity (Silver Spring)*. 2015;23(10):2053. doi:10.1002/OBY.21189

56. Ruiz-Lozano T, Vidal J, de Hollanda A, Scheer FAJL, Garaulet M, Izquierdo-Pulido M. Timing of food intake is associated with weight loss evolution in severe obese patients after bariatric surgery. *Clin Nutr.* 2016;35(6):1308-1314.
doi:10.1016/J.CLNU.2016.02.007

7. Anexos

Cuantificación de la lipólisis

La medición de la liberación de glicerol al medio de cultivo se lleva a cabo en un ensayo de fluorescencia siguiendo el protocolo descrito a continuación que ha sido adaptado por mí para introducir esta metodología en la condición de investigación.

Reactivos

-*Free Glycerol Reagent* (Sigma)

-*Amplex® UltraRed Reagent* (Invitrogen)

-*Glycerol Standard Solution* (0.26 mg/ml; 2823 μ M) (Sigma)

Procedimiento

1. Preparar diluciones seriadas de glicerol para realizar una curva estándar empleando el medio de cultivo correspondiente donde se ha realizado el ensayo de lipólisis, es decir el mismo medio en el que se hallaban el tejido/células, y *Glycerol standard solution* (0.26 mg/ml; 2823 μ M). En eppendorfs de 1.5 ml realizar las diluciones según la siguiente tabla.

μ M of glycerol	Procedure
120	take 8,5 μ l of glycerol stock to 191,5 μ l lipolysis medium
60	take 100 μ l from 120 μ M and add to 100 μ l medium
30	take 100 μ l from 60 μ M and add to 100 μ l medium
15	take 100 μ l from 30 μ M and add to 100 μ l medium
7,5	take 100 μ l from 15 μ M and add to 100 μ l medium
3,75	take 100 μ l from 7,5 μ M and add to 100 μ l medium
1,88	take 100 μ l from 3,75 μ M and add to 100 μ l medium
0	take 100 μ l medium

2. Reconstituir el *Free Glycerol Reagent* añadiendo 40 ml de agua MilliQ y reconstituir el *Amplex UltraRed solution* añadiendo 340 μ l de DMSO.
3. Para 96 pocillos, mezclar 10 ml de *Free Glycerol Reagent* con 100 μ l de *Amplex UltraRed* en un tubo de 12 ml envuelto en papel de aluminio. Mezclar mediante inversión.
4. Pipetear 20 μ l de la curva estándar de glicerol o de la muestra en sus correspondientes pocillos, por duplicado, en una placa negra de 96 pocillos.
5. Añadir 100 μ l de la mezcla de *Free Glycerol-Amplex UltraRed* a cada pocillo.

6. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
7. Leer fluorescencia en un fluorímetro a las longitudes de onda Ex/Em 530/590 nm.
8. Calcular la concentración de glicerol de acuerdo con la curva estándar.
9. Determinar el glicerol liberado por miligramo de tejido empleando la siguiente fórmula:

$$\text{(}\mu\text{M de glicerol)} / \text{mg de TA} = \mu\text{M/mg TA}$$