

AYUDAS A LA INVESTIGACIÓN IGNACIO H. DE LARRAMENDI

CONVOCATORIA AÑO 2019
(Salud)

MEMORIA FINAL

Investigador Principal: José Luis Ferrán Bertone

Entidad: Universidad de Murcia

País: España

Fundación
MAPFRE

AYUDAS A LA INVESTIGACIÓN

MEMORIA FINAL

TITULO DEL PROYECTO:

**LA ACTIVIDAD FÍSICA DURANTE LA TARDE,
PERO NO EN LA MAÑANA PREVIENE LA
OBESIDAD DURANTE LA ADOLESCENCIA**

INVESTIGADOR PRINCIPAL:

-José Luis Eduardo Ferran (Universidad de Murcia)

INTEGRANTES DEL EQUIPO:

-María Caballero (Universidad de Murcia)

-Miroljub Popovic (Universidad de Murcia)

-Natalia Popovic (Universidad de Murcia)

-Bruno Ribeiro Do Couto (Universidad de Murcia)

-Nicanor Morales Delgado (Universidad Miguel
Hernández de Elche)

-Marta Garaulet (Universidad de Murcia)

-Manuel Irimia (Centro de Regulación Genómica -
CRG-)

-Ángel Toval Sánchez (Universidad de Murcia)

-Ana Belén Meseguer (Universidad de Murcia)

AGRADECIMIENTOS:

A Yevheniy Kutsenko por su intensa dedicación en el desarrollo de este proyecto, así como también a Daniel Garrigos, Marta Martínez Morga y Alberto Barreda por su contribución.

AUTORES:

-José Luis Ferran: Licenciado en Medicina por la Universidad de Buenos Aires (Argentina). Doctorado en neurociencias en la Universidad de Buenos Aires obteniendo el premio a la mejor tesis en ciencias básicas (2002). Actualmente profesor Titular de Universidad en el Departamento de Anatomía Humana y Psicobiología de la Universidad de Murcia. Cuenta con 3 sexenios de investigación, ha dirigido 3 tesis doctorales y ha publicado 45 artículos indexados. Sus estudios de doctorado y postdoctorado le han dado una sólida formación sobre el cerebro de vertebrados. En años recientes ha desarrollado un modelo de actividad física en roedores que le permite estudiar los mecanismos neurales que controlan la actividad motora y los efectos metabólicos derivados de la actividad física (financiado por la Agencia estatal de Investigación). Actualmente su grupo se ha enfocado hacia estudios de efectos de la actividad física durante la adolescencia. Actualmente es el coordinador de la red “Brainactivity, Neurobiología de la actividad física” financiada por el Consejo Superior de Deportes.

-María Caballero: Licenciada en Biología (1983) por la Universidad de Murcia. Doctorado (1988) en Biología, por la misma Universidad. Es Profesora Titular de la Universidad de Murcia (31.01.2021). Cuenta con 4 sexenios de investigación y ha publicado 30 artículos. Desde el inicio de su carrera investigadora, ha trabajado en estudios de neuroanatomía comparada, conectividad neuronal, así como en diversos modelos de experimentación animal sobre envejecimiento cerebral. Actualmente, trabaja como colaboradora del grupo de investigación “Envejecimiento Cerebral y Demencias” (Universidad de Murcia e IMIB) en el análisis del efecto del periodo de día sobre los procesos de aprendizaje, memoria y ansiedad, desde la adolescencia hasta la vejez.

-Miroľjub Popovic: Licenciado en Medicina Veterinaria (1988) por la Universidad de Belgrado (Serbia). Master (1992) y Doctorado (1995) en Neurociencias por la misma Universidad. Actualmente es Profesor Titular de Universidad en el Departamento de Anatomía Humana y Psicobiología de la Universidad de Murcia. Cuenta con 3 sexenios de investigación, ha dirigido 1 tesis doctoral y ha publicado 47 artículos. Desde el inicio de su carrera investigadora, ha trabajado en estudios conductuales, utilizando diversos modelos de experimentación animal. Recientemente, trabaja en el análisis del efecto del periodo de día sobre los procesos de aprendizaje, memoria y

ansiedad, desde la adolescencia hasta la vejez. Es investigador responsable del Grupo de Investigación: Envejecimiento cerebral y demencias de la Universidad de Murcia y del Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB)

-Natalia Popovic: Licenciada en Medicina Veterinaria (1988) por la Universidad de Belgrado (Serbia). Master (1993) y Doctorado (1996) en Neurociencias, por la misma Universidad. Actualmente es Profesora Contratada Doctora en el Departamento de Anatomía Humana y Psicobiología de la Universidad de Murcia. Cuenta con 3 sexenios de investigación y ha publicado 47 artículos. Desde el inicio de su carrera investigadora, ha trabajado en estudios de diversos modelos de experimentación animal de enfermedades neurológicas. Recientemente, trabaja en el análisis del efecto del periodo de día sobre los procesos de aprendizaje, memoria y ansiedad, desde la adolescencia hasta la vejez.

-Bruno Ribeiro Do Couto: Licenciado en Psicología Clínica por el Instituto Superior de Ciencias de la Salud (Oporto, Portugal). Doctorado Europeo en Psicología en la Universidad de Valencia. Actualmente profesor Contratado Doctor en el Departamento de Anatomía Humana y Psicobiología de la Universidad de Murcia. Cuenta con 3 sexenios de investigación, ha dirigido 1 tesis doctoral y ha publicado 25 artículos indexados. Actualmente forma parte del grupo de investigación de José Luis Ferran en los estudios sobre la actividad física durante la adolescencia y forma parte de la red "Brainactivity, Neurobiología de la actividad física" financiada por el Consejo Superior de Deportes.

-Nicanor Morales Delgado: Nicanor Morales Delgado: Licenciado en Biología por la Universidad de La Laguna (Tenerife, España). Doctor en Biomedicina Experimental por la Universidad de Castilla-La Mancha (2012). Actualmente profesor ayudante doctor en el Departamento de Histología y Anatomía de la Universidad Miguel Hernández de Elche. Ha publicado 13 artículos indexados y ha tutorizado 38 trabajos académicos (TFM y TFG). Sus estudios de doctorado y postdoctorado le han conferido una sólida formación en morfología y el desarrollo del cerebro de vertebrados, especialmente en el hipotálamo de ratón y rata. En los últimos años ha colaborado en otros modelos centrados en el estudio de los mecanismos neurales que controlan la actividad motora y los efectos metabólicos derivados de la actividad física.

-Marta Garaulet: Catedrática de Fisiología (Universidad de Murcia) y Científica del Brigham and Women's Hospital (Universidad de Harvard, EE. UU.). El enfoque de su investigación es introducir la Cronoterapia y la Nutrigenética en la ciencia de la Nutrición. Sus estudios han demostrado que existe un reloj interno en el tejido adiposo humano en el que la genética está detrás de nuestra maquinaria circadiana. Ha construido tres poblaciones (ONTIME, ONTIME JR y ONTIME MT, con más de 6000 sujetos (ClinicalTrials.gov Identifier:

NCT02829619, NCT03036592, NCT02895282). Recibió el premio a la "Mejor Investigación en Obesidad" en 2016, por la Sociedad Española de Obesidad (SEEDO) y el "Grand Prix de la Science de l'Alimentation" de la Academia Internacional de Gastronomía y Nutrición 2017 y la medalla Vermail de la Academia Francesa de Artes, Ciencias y Letras (2020). Los proyectos de investigación incluyen los financiados por el Ministerio de Ciencia de España (4 proyectos) sin interrupciones desde 2008, siempre como IP; 7 proyectos de fuentes regionales. Ha iniciado varios proyectos colaborativos internacionales (4 proyectos) desde el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH / NIDDK) donde es co-investigador principal (co-PI) (1-R01-DK-105072-01A1) o co-investigador (R01DK102696). Ha sido profesora visitante en la Universidad de Harvard (Brigham & Women's Hospital) de 2012 a 2019 en el Departamento de Medicina del Sueño.

-Manuel Irimia: Licenciado en Biología por la Universidad Complutense de Madrid. Doctorado en Genética por la Universidad de Barcelona. Actualmente es líder de grupo en el Centro de Regulación Genómica (CRG, Barcelona). Estudios postdoctorales en el departamento de Biología de la Universidad de Stanford y en el Donnelly Centre, Universidad de Toronto, Canadá. Ha publicado más de 90 artículos indexados. Su investigación se centra en dos preguntas principales: ¿Cómo una única secuencia del genoma codifica la información para construir la enorme complejidad de los tipos y estructuras celulares de un organismo adulto? ¿Cómo se traducen los cambios en esta secuencia en novedades morfológicas durante la evolución? Para abordar estas preguntas, su laboratorio combina enfoques computacionales y experimentales que utilizan sistemas in vitro e in vivo (pez cebra, ratón y mosca de la fruta) para investigar los roles de la diversificación y especialización transcriptómica en el desarrollo y la evolución embrionarios.

-Angel Toval Sánchez: Licenciado en Ciencias de la Actividad Física y del Deporte por la Universidad de Murcia. Máster en Formación del profesorado y Máster en Investigación en Ciencias de la Actividad Física y del Deporte. Doctorado en Neurociencias con mención internacional por la Universidad de Murcia. 7 publicaciones en revistas científicas indexadas en JCR, 1 patente, más de 50 comunicaciones a congresos nacionales e internacionales, 3 estancias de investigación en la Universidad de Sevilla, Universidad de Varsovia y Universidad de Illinois en Chicago. Actualmente se encuentra investigando sobre los mecanismos neurales subyacentes a la actividad física en el grupo de Neurobiología del Ejercicio de la Universidad de Murcia.

-Ana Belen Mesequer: Licenciada en Ciencias de la Documentación y Diplomada en Fisioterapia. Doctora por la Universidad de Murcia. Actualmente profesora Titular de Universidad en el Departamento de Fisioterapia de la Universidad de Murcia. Cuenta con 1 sexenio de investigación, ha dirigido 1 tesis doctoral y ha publicado 9 artículos indexados. Sus estudios de doctorado y

postdoctorado le han dado una formación de la mejora de la calidad de los servicios de fisioterapia en la salud pública, formación en propiedades psicométricas y en metaanálisis de generalización de la fiabilidad de instrumentos de medida en fisioterapia, así como reciente formación en aspectos que pueden influir en la memoria y en el aprendizaje en roedores.

INDICE GENERAL:

OBJETO Y ALCANCE

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

OBJETIVOS

MATERIALES Y METODOLOGÍA

Planificación y ejecución del programa de entrenamiento

- 1. Análisis del contenido adiposo mediante tomografía computada.**
- 2. Análisis del contenido magro mediante tomografía computada.**
- 3. Análisis del contenido óseo mediante tomografía computada.**
- 4. Análisis del peso, volumen y su evolución durante el experimento.**
- 5. Determinación del perfil lipídico y análisis de biomarcadores en suero.**
- 6. Secuenciación de tejido adiposo visceral y subcutáneo**

DISCUSION

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

OBJETO Y ALCANCE:

La actividad física es una de las principales vías de prevención de la obesidad y de su riesgo asociado de síndrome metabólico. La práctica regular de actividad física puede contribuir a disminuir los efectos de la obesidad sobre el sistema cardiovascular. El ejercicio puede ser el principal tratamiento para disminuir la grasa visceral y reducir el riesgo de síndrome metabólico relacionado con la obesidad. La ventana de tiempo del día en el que se desarrolla la actividad física es un factor determinante para modificar y amplificar los efectos de esta sobre las vías metabólicas. El presente estudio se desarrolló para comenzar a determinar los mecanismos neurales y adiposos activados durante un ejercicio forzado en la adolescencia. Para este fin se llevó a cabo un entrenamiento forzado en ratas adolescentes en dos momentos del día (mañana y tarde) con dieta hipergrasa. Se evaluó el contenido de tejido adiposo mediante tomografía computada, se obtuvieron muestras de tejidos para su posterior secuenciación y muestras de suero sanguíneo para obtener perfil lipídico y otros marcadores claves. Inicialmente el proyecto pretendía evaluar además el efecto de una dieta restringida a una franja horaria. Sin embargo, los resultados obtenidos potenciaban el interés para desarrollar un entrenamiento similar al inicial y darle mayor profundidad al estudio. El informe final presenta el desarrollo experimental según la planificación inicial del proyecto en el que se abordan los experimentos concretados y las contingencias que se desarrollaron según los resultados obtenidos durante el desarrollo del proyecto. Una vez concretada la firma del convenio correspondiente en el mes de **junio comenzamos con la planificación experimental** según en qué medida la situación de la pandemia permitía el acceso a los laboratorios. El primer **programa de entrenamiento dio comienzo a fines de julio, finalizando a mediados de septiembre**. Se llevó a cabo un segundo programa de entrenamiento en los meses de abril y mayo de 2021. Se presentarán algunos de **los resultados obtenidos de forma breve** debido al interés por su publicación en un tiempo cercano requiriendo de confidencialidad hasta concretar su publicación.

ABSTRACT:

Physical activity is one of the main ways to prevent obesity and its associated risk of metabolic syndrome. Regular physical activity can help reduce the effects of obesity on the cardiovascular system. Exercise may be the main treatment to decrease visceral fat and reduce the risk of obesity-related metabolic syndrome. The time window of the day in which physical activity takes place is a determining factor in modifying and amplifying its effects on metabolic pathways. The present study was developed to determine the neural and adipose mechanisms activated during forced exercise in adolescence. For this purpose, forced training was carried out in adolescent rats at two times of the day (morning and afternoon) with a highfat diet. The adipose tissue content was evaluated by computed tomography, tissue samples were obtained for sequencing and blood serum samples to obtain lipid profile and key markers. Initially, the project aimed to also evaluate the effect of a diet restricted to one time slot. However, the results obtained increased the interest to develop a training similar to the initial one and to give more depth to the study. The final report presents the experimental development according to the initial planning of the project in which the concrete experiments and the contingencies that were developed according to the results obtained during the development of the project are addressed. Once the signing of the corresponding agreement was finalized in June, experimental planning began according to the extent to which the pandemic situation allowed access to the laboratories. The first training program began in late July, ending in mid-September. A second training program was carried out in the months of April and May 2021. Some of the results obtained are briefly presented due to the interest in their publication in a short time, requiring confidentiality until their publication is finalized.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES:

La adolescencia es un período de transición entre la niñez y el adulto, que se caracteriza por vulnerabilidad para el desarrollo de enfermedades mentales y está marcada por extensos cambios madurativos de amplias regiones del cerebro (Caballero y Tseng, 2016). Esta etapa, también está caracterizada por riesgo de desarrollar obesidad debido a los hábitos alimentarios, la maduración sexual y el declive en la actividad física (Hill et al., 2011). Esta etapa representada por cambios neurobiológicos claves en roedores se define entre las edades postnatales P30 a P60 (Spear, 2000; Caballero and Tseng, 2016; Kutsenko et al., 2021; Toval et al., 2021). Durante este período se producen los mayores incrementos en peso corporal, así como también en el porcentaje de tejido adiposo subcutáneo y visceral (Kutsenko et al., 2021).

El tejido adiposo almacena lípidos y segrega adipocinas que trabajan en el mantenimiento del equilibrio energético corporal. La obesidad, que es el resultado de condiciones ambientales y factores hereditarios, altera el funcionamiento normal de los adipocitos y promueve el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2, depresión, cáncer y aumenta el riesgo de metástasis (Ackerman et al., 2017; Jantaratnotai et al., 2017; Petridou et al., 2019; Buie et al., 2019; Bull et al., 2020). Además, la acumulación de tejido adiposo visceral en la cavidad abdominal está asociada con la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico; y es un factor de riesgo de hipertensión y diabetes, independientemente del contenido total de grasa (Mathieu et al., 2009; Liu et al., 2010). Durante los últimos cuarenta años, el sobrepeso y la obesidad han aumentado significativamente en adolescentes y adultos de todo el mundo; determinando gastos millonarios en el costo de la salud pública en términos de atención médica y hospitalización (Ortega et al., 2016; Hafner et al., 2020).

La actividad física es una de las principales formas de prevenir la obesidad y su riesgo asociado de síndrome metabólico (LaMonte et al., 2005). Las personas físicamente activas tienen un menor riesgo de enfermedades cardiovasculares y la actividad física regular puede contribuir a disminuir los efectos de la obesidad en el sistema cardiovascular (Ortega et al., 2016). El ejercicio puede ser el principal tratamiento preventivo para disminuir el tejido graso visceral y reducir el riesgo de síndrome metabólico relacionado con la obesidad. Los beneficios de la actividad física para la salud pueden depender de la duración y la intensidad del ejercicio; sin embargo, el momento de ejecución del ejercicio modifica las respuestas fisiológicas de las vías metabólicas (Ezagouri et al., 2019; Gabriel y Zierath, 2019). La ventana horaria del día es un factor determinante para modificar y amplificar los efectos de la actividad física en las vías metabólicas del músculo esquelético y en el uso/equilibrio de fuentes de energía sistémicas (Sato et al, 2019).

Nuestros resultados preliminares indicaban por primera vez que el ejercicio durante la TARDE es la mejor ventana de tiempo del día para una movilización óptima y disminución de la ganancia del tejido adiposo durante la adolescencia en roedores bajo una dieta estándar.

OBJETIVOS:

Con el fin de obtener una comprensión integral de los mecanismos neurales y adiposos activados durante una actividad física forzada vespertina (sobre la base de nuestros extensos datos preliminares), se proponen los siguientes objetivos:

Objetivo 1 Determinar las principales vías metabólicas que trabajan para disminuir la ganancia de tejido adiposo después de un programa de ejercicio durante la adolescencia en una condición de dieta alta en grasas.

Objetivo específico 1.1 Determinar los cambios transcriptómicos en el tejido adiposo subcutáneo y visceral después de un programa de entrenamiento forzado matutino.

Este objetivo pretende determinar el perfil molecular (expresión diferencial y splicing alternativo) de las principales vías metabólicas durante un programa de entrenamiento forzado matutino en comparación con el control.

Objetivo específico 1.2 Determinar los cambios transcriptómicos en el tejido adiposo subcutáneo y visceral después de un programa de entrenamiento forzado vespertino.

Este objetivo pretende determinar el perfil molecular (expresión diferencial y splicing alternativo) de las principales vías metabólicas durante un programa de entrenamiento forzado vespertino en comparación con el control.

Los objetivos específicos 1.1 y 1.2 permitirán determinar las principales vías metabólicas activadas por el ejercicio forzado en condiciones forzadas AM o PM; y ayudará a definir los principales candidatos a participar en la disminución de la ganancia de tejido adiposo solo durante la condición de PM en la adolescencia.

Objetivo 2 Determinar las principales vías metabólicas que actúan en la disminución de la ganancia de tejido adiposo después de un programa de ejercicio nocturno con tiempo restringido de acceso a una dieta alta en grasas durante la adolescencia.

Objetivo específico 2.1 Determinar los cambios transcriptómicos en tejido adiposo subcutáneo y visceral después de un programa de entrenamiento forzado vespertino con acceso restringido a los alimentos por la mañana y por la TARDE.

Este objetivo pretende determinar las vías metabólicas candidatas a la disminución de tejido adiposo durante un programa vespertino forzado con acceso restringido a la comida por la tarde en comparación con el control.

Objetivo específico 2.2 Determinar los cambios transcriptómicos en tejido adiposo subcutáneo y visceral después de un programa de entrenamiento forzado vespertino con acceso restringido a los alimentos por la mañana y por la NOCHE.

Este objetivo pretende determinar las vías metabólicas candidatas a la disminución de tejido adiposo durante un programa vespertino forzado con acceso vespertino restringido a los alimentos en comparación con el control.

El objetivo 1 se desarrollo en su totalidad y en lugar de desarrollar el objetivo 2 se volvieron a llevar a cabo los entrenamientos del objetivo 1 para obtener muestras de suero adicionales y profundizar el dato obtenido.

MATERIALES Y METODOLOGÍA:

Los recursos materiales, infraestructuras y equipos singulares disponibles para el proyecto son los habituales de un laboratorio con infraestructura para neuromorfología convencional y molecular (sistemas de frío, criostatos, microscopios, centrifugadoras preparativas, dispositivos para RT-PCR y PCR cuantitativa, separaciones en gel, frío sala, etc.), lo que nos permitió acercarnos a la metodología propuesta sin dificultades. También contamos con un sistema automatizado de extracción de ARN (Bertin, adquirido con fondos del proyecto anterior) con RIN de alta calidad (> 9) imprescindible para estudios de PCR en tiempo real. Contamos con dos equipos de adiestramiento de roedores (instrumentos Lafayette), previstos para las distintas pruebas de comportamiento requeridas, y una plataforma estereotáxica para roedores necesaria para llevar a cabo el proyecto (adquirida con Contrato Mapfre en 2014). Además, contamos con todo el equipo necesario para realizar experimentos de comportamiento que incluyen pruebas de laberinto en T, campo abierto y Rotarod. Dichos equipos se amplían con otros que ofrecen los servicios generales de investigación de la Universidad de Murcia. Dichos servicios, que incluyen alojamiento animal y servicios genéticos, sistemas para SPECT (tomografía computarizada para roedores), estudios de qPCR y microscopía confocal, están actualmente disponibles en el IMIB (Instituto Murciano de Investigaciones Biosanitarias), donde se encuentra nuestro amplio laboratorio. Todo el equipamiento necesario para el proyecto propuesto es accesible para nuestro equipo y dando resultados para otros proyectos en curso.

La secuenciación de ARN (construcción de bibliotecas y secuenciación) se llevó a cabo en las instalaciones del CRG (Centro de Regulación Genómica, Barcelona). Nuestro colaborador Manuel Irimia es un experto en estudios de RNASeq y es nuestro principal referente en el análisis y discusión de los datos obtenidos.

Metodología general de investigación

El diseño experimental siguió las recomendaciones para estudios en roedores con rueda forzada (Garrigos et al., 2021). Para estos objetivos, el diseño consistió en grupos de carreras experimentales (por la mañana o por la mañana; por la tarde o por la tarde) y sus controles. Los cambios inducidos por el ejercicio se examinaron después de un programa de entrenamiento en rampa que fue desarrollado luego de la habituación a partir del día P56 (adolescencia) (22 días de entrenamiento durante la mañana o la noche) en ratas Sprague Dawley. El entrenamiento se llevó a cabo durante 30 minutos en horario AM o PM y siguiendo las mismas reglas (tiempo y velocidad de carrera) (Figura 1) (Toval et al., 2017; 2021). Primero, se determinó el volumen total de tejido graso antes de iniciar el período de actividad física forzada y una vez finalizado mediante tomografía por emisión de fotón único (SPECT) (incluyendo tejido graso global y componentes viscerales segmentados (VAT) y subcutáneos (SAT) de la región toracoabdominal) (Kutsenko et al., 2021). Se determinó la ingesta diaria del roedor. Una vez finalizado el entrenamiento y una vez finalizado el estudio de tomografía computada, se obtuvieron muestras de tejido adiposo para su secuenciación (visceral y subcutáneo). Además, se extrajo sangre de los roedores para determinar su perfil lipídico y evaluar la expresión de marcadores fundamentales (leptina, adiponectina, etc.).

En cuanto a la dieta hipergrasa se optó por la TD.06415 (Adjusted Calories Diet-45/Fat-) adquirida a ENVIGO (USA).

En el diseño se decidió además incorporar **medidores de ingesta de comida y bebida** para poder valorar en tiempo real la ingesta, los cuales fueron comprados a la compañía CIBERTEC. De esta forma podemos contar con información precisa sobre el patrón de ingesta de todos los

roedores involucrados en el experimento. Este tipo de análisis nos permitirá saber si hay cambios en la ingesta que podrían relacionarse con las diferencias observadas entre la mañana y la tarde.

RESULTADOS:

Planificación y ejecución del programa de entrenamiento:

-El diseño experimental contó con un grupo experimental que entrenaba por la mañana (AM, n:6), con su correspondiente control (n:6), y un grupo experimental que entrenaba por la tarde (PM, n:6) y su correspondiente control (n:6).

-Se desarrolló un programa de entrenamiento que comenzó con una fase de "handling" de 5 días. Antes de comenzar el período de habituación al entrenamiento se llevó a cabo la tomografía computada para determinar el contenido de tejido adiposo, magro y óseo antes de dar comienzo el entrenamiento. Finalizada a la habituación se llevó a cabo un entrenamiento de 24 días con fases secuenciales de baja, media y alta intensidad. Se optó a continuación por llevar a cabo una tomografía computada para evaluar el contenido de tejido adiposo, magro y óseo de los roedores entrenados y sus controles. Se extendió luego de la tomografía computada un entrenamiento de tres días adicionales para que no afecte la sedación los resultados a ser evaluados en los tejidos a extraer (Figura 1).

Hemos observado que **cada grupo experimental comparado con su control tenía un peso estadísticamente similar, siendo seleccionados como grupos que compartían camadas de origen y el día de inicio y finalización del experimento.**

Todos los roedores estuvieron en condiciones **de temperatura y humedad controlada con ciclos definidos de luz y oscuridad.** Todos los roedores expuestos al **programa de entrenamiento pudieron completarlo** sin ninguna dificultad debido a la progresión de la carga de actividad física instaurada. Se **registró el peso diario** de los roedores, la temperatura del ambiente, la humedad y el comportamiento de los roedores. Finalmente, cada caja en la que se alojaban 3 roedores contaba con un equipo **para medir ingesta de comida y otro de bebida.** De forma tal que podemos contar con datos precisos de los patrones de ingesta de comida y bebida por hora, día y mes.

Figura 1: Programa de entrenamiento llevado a cabo en los grupos experimentales AM y PM. A) Se indican los detalles del programa completo de entrenamiento desarrollado en los grupos experimentales. Fases de pre-entrenamiento, habituación y entrenamiento. Se especifican los días en los que se han llevado a cabo los estudios de tomografía computada para determinar el contenido de tejido adiposo, magro y óseo. B) Duración diaria total del entrenamiento recibido por cada grupo experimental con la velocidad máxima alcanzada.

1. Análisis del contenido adiposo mediante tomografía computada.

El análisis del **contenido adiposo total (TA)** permite determinar que comparando el contenido adiposo del grupo experimental AM con su control no se observan diferencias entre ambos grupos antes de llevarse a cabo el entrenamiento (P24) (Fig. 2). Una conclusión similar se puede obtener al comparar el contenido adiposo total entre el grupo experimental PM y su control antes del entrenamiento (P24) (Fig. 2). **Sin embargo, una vez finalizado el entrenamiento (P57) se observa que el grupo AM tiene una disminución estadísticamente significativa en la ganancia de tejido adiposo comparado con su control. Diferencias que no se observan con el grupo PM (Figs. 1 y 2).**

El análisis del **contenido adiposo subcutáneo (SAT)** permite determinar que comparando el contenido adiposo del grupo experimental AM con su control no se observan diferencias entre ambos grupos antes de llevarse a cabo el entrenamiento (P24) (Fig. 2). Una conclusión similar se puede obtener al comparar el contenido adiposo subcutáneo entre el grupo experimental PM y su control antes del entrenamiento (P24) (Fig. 2). **Una vez finalizado el entrenamiento (P57) en ninguno de los dos grupos AM o PM se observan diferencias significativas en la ganancia de tejido adiposo subcutáneo comparado con su control (Figs. 2 y 3).**

El análisis del **contenido adiposo visceral (VAT)** permite determinar que comparando el contenido adiposo del grupo experimental AM con su control no se observan diferencias entre ambos grupos antes de llevarse a cabo el entrenamiento (P24) (Fig. 2). Una conclusión similar se puede obtener al comparar el contenido adiposo visceral entre el grupo experimental PM y su control antes del entrenamiento (P24) (Fig. 2). **Sin embargo, una vez finalizado el entrenamiento (P57) se observa que el grupo AM tiene una disminución estadísticamente significativa en la ganancia de tejido adiposo visceral comparado con su control. Diferencias que no se observan con el grupo PM (Figs. 2 y 3).**

Finalmente, no se observan diferencias significativas en el índice SAT/VAT (Figura 2).

Estos datos indican diferencias en relación al contenido de tejido adiposo total en la respuesta al entrenamiento AM y PM. Sin embargo, el análisis detallado del contenido adiposo subcutáneo (SAT) o visceral (VAT) indica que la disminución significativa en la ganancia ocurre en la grasa VAT.

Figura 2: Análisis del contenido adiposo total (TA), subcutáneo (SAT) y visceral (VAT) en ratas experimentales con sus correspondientes controles antes de comenzar el entrenamiento (P24) y una vez finalizado (P57). Se indica además el índice SAT/VAT en los mismos tiempos.

Figura 3: Análisis de la ganancia de peso, volumen, contenido adiposo total (TA), visceral (VAT), subcutáneo (VAT), magro y óseo.

2. Análisis del contenido magro mediante tomografía computada.

El análisis del **contenido magro** permite determinar que comparando el contenido magro del grupo experimental AM con su control no se observan diferencias entre ambos grupos antes de llevarse a cabo el entrenamiento (P24) (Fig. 4). Una conclusión similar se puede obtener al comparar el contenido magro total entre el grupo experimental PM y su control antes del entrenamiento (P24) (Fig. 4). **Una vez finalizado el entrenamiento (P57) no se observan diferencias entre experimental y control en el grupo AM y en el grupo PM tanto en el contenido absoluto como en la ganancia (Figs. 3 y 4).**

Estos datos indican que un entrenamiento AM o PM con dieta hipergrasa no produce cambios en el contenido magro.

Figura 4: Análisis del contenido de tejido magro y óseo ante de iniciar (P24) y una vez finalizado el entrenamiento (P57).

3. Análisis del contenido óseo mediante tomografía computada.

El análisis del **contenido óseo** permite determinar que comparando el contenido óseo del grupo experimental AM con su control no se observan diferencias entre ambos grupos antes de llevarse

a cabo el entrenamiento (P24) (Fig. 4). Sin embargo, al comparar el contenido adiposo total entre el grupo experimental PM y su control antes del entrenamiento (P24), se observa un mayor contenido óseo en el grupo experimental (Fig. 4). **Una vez finalizado el entrenamiento (P57) no se observan diferencias entre experimental y control en el grupo AM y en el grupo PM en el contenido absoluto, pero si se destaca una menor ganancia en el grupo experimental (Figs. 3 y 4).**

Estos datos indican que un entrenamiento AM o PM con dieta hipergrasa solo disminuye la ganancia de contenido óseo en el grupo experimental PM.

4. Análisis del peso, volumen y su evolución durante el experimento.

El análisis del **peso y del volumen** permite determinar que comparando el grupo experimental AM con su control no se observan diferencias entre ambos grupos antes de llevarse a cabo el entrenamiento (P24) (Fig. 5). Una conclusión similar se obtiene al comparar el peso y el volumen entre el grupo experimental PM y su control antes del entrenamiento (P24) (Fig. 5). **Una vez finalizado el entrenamiento (P57) no se observan diferencias entre experimental y control en el grupo AM y en el grupo PM en relación al peso y volumen absoluto; y su ganancia (Figs. 3 y 5).**

Se analizó además la evolución del peso día a día durante todo el entrenamiento y no se observaron diferencias entre experimental y control tanto en el grupo AM como en el grupo PM (Fig. 6).

Estos datos indican que un entrenamiento AM o PM con dieta hipergrasa no produce cambios en el peso y volumen absolutos, su ganancia o la evolución del peso a lo largo del entrenamiento en franja horaria selectiva.

Figura 5: Análisis del peso y volumen ante de iniciar (P24) y una vez finalizado el entrenamiento (P57).

Figura 6: Análisis de la evolución del peso ante de iniciar (P24) y una vez finalizado el entrenamiento (P57).

5. Determinación del perfil lipídico y análisis de biomarcadores en suero.

Una vez finalizado el entrenamiento se obtuvo, además sangre para extracción de suero de los roedores. Las muestras fueron procesadas y se obtuvo el perfil lipídico y el contenido de una serie de biomarcadores de importancia. El perfil lipídico indicaba el perfil cronobiológico para cada una de las mediciones valoradas.

6. Secuenciación de tejido adiposo visceral y subcutáneo

La secuenciación del transcriptoma del tejido adiposo subcutáneo y visceral permitió determinar que cada uno de estos tejidos tenía características transcriptómicas diferenciales. La

comparación del transcriptoma de cada condición experimental se comparó con su propio control y se utilizaron para ello muestras de los 6 individuos experimentales. De esta forma se pudieron eliminar aquellos que se separaban del grupo (Figura 7).

Figura 7: Cuatro muestras del análisis total fueron identificados como fuera del grupo y eliminados del análisis.

La identificación de la expresión diferencial de genes se llevó a cabo agrupando las muestras en términos de tejido, tiempo y prueba, abarcando ocho grupos. La comparación de los grupos experimentales con su control demostró que control y experimental mostraban diferencias significativas (Figura 8). El análisis mediante un test de interacción en el tiempo determinó que más de 500 genes se expresaban diferencialmente (Figura 9). Finalmente, un análisis GO y de enriquecimiento de vías identificó listas de genes involucrados en vías diversas vías que podrían ser candidatas a ser exploradas para determinar los mecanismos responsables de las diferencias observadas por un programa de actividad física durante la mañana o la tarde (Figura 10).

Figura 8: Comparación entre grupos control y experimental que muestra diferencias transcriptómicas significativas.

Figura 9: Mapa de calor que muestra el patrón de expresión de más de 500 genes. Color naranja indica alta expresión y morado indica baja expresión.

Figura 10: Representación del mapa del enriquecimiento GO. La altura de los términos representa el número de genes expresados diferencialmente y el color su significado.

DISCUSIÓN:

En este estudio se determina el cambio observado en el contenido de tejido adiposo, en el perfil lipídico y biomarcadores del suero y en el transcriptoma de los tejidos adiposo subcutáneo y visceral durante un programa de actividad física forzada desarrollado durante la adolescencia.

El presente estudio en roedores es uno de los pocos estudios llevados a cabo durante la adolescencia que determinen además el contenido corporal mediante técnica in vivo como la tomografía computada. Kutsenko et al. (2021) han determinado que un programa de actividad física durante la adolescencia temprana (P30-P45) entrenando en sesiones matutinas y vespertinas produce una disminución del contenido de tejido adiposo en machos. Sin embargo, este efecto no se observa en hembras. En nuestro estudio el objetivo era determinar si hay un efecto diferencial en un programa de actividad física que se lleva a cabo solo por la mañana o por la tarde. Publicaciones en curso de nuestro grupo de investigación han demostrado que un programa de actividad física con dieta estándar y por la tarde tiene un efecto en la disminución del contenido de tejido adiposo, pero no ocurre este cambio por la mañana (Kutsenko et al., en preparación). Sin embargo, los resultados del presente estudio demuestran que el efecto en este caso solo se produce por la mañana. La única condición diferencial es el tipo de dieta obtenida. Se espera que los perfiles transcriptómicos obtenidos que sugieren vías metabólicas específicas enriquecidas permitan determinar los mecanismos responsables de los cambios observados.

El estudio ha revelado algo inesperado y con gran potencial para nuestras investigaciones futuras. Indica que el contenido graso de la dieta modifica la respuesta metabólica bajo condiciones similares de actividad física. Este aspecto no había sido explorado hasta el momento y genera una nueva ventana para futuras líneas de investigación.

CONCLUSIONES:

- Los roedores experimentales AM y PM han respondido 100% al entrenamiento incremental.***
- No hay diferencias en el contenido adiposo entre el grupo experimental y control antes del entrenamiento tanto en el AM como en el PM.***
- El grupo experimental AM presenta diferencias en el contenido de tejido adiposo comparado con su control con una clara disminución. No hay diferencias en el grupo PM.***
- Las diferencias observadas en el contenido de grasa solo se observan en el contenido de VAT.***
- No se observan diferencias en cuanto al contenido magro, óseo, peso y volumen tanto en el grupo AM como en el PM.***
- Existen diferencias en algunos valores del perfil lipídico en la condición AM.***
- La secuenciación del transcriptoma indica 579 genes expresados diferencialmente entre las diferentes condiciones.***
- Se han revelado vías metabólicas candidatas a ser exploradas como responsables de los cambios observados por el programa de actividad física.***

BIBLIOGRAFÍA:

ACKERMAN, S. E., O. A. BLACKBURN, F. MARCHILDON AND P. COHEN Insights into the Link Between Obesity and Cancer. *Curr Obes Rep*, 2017, 6(2162-4968 (Electronic)), 195-203. <https://doi.org/10.1007/s13679-017-0263-x>

BUIE, J. J., L. S. WATSON, C. J. SMITH AND C. SIMS-ROBINSON Obesity-related cognitive impairment: The role of endothelial dysfunction. *Neurobiology of Disease*, 2019, 132, 104580. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104580>

- BULL, F. C., S. S. AL-ANSARI, S. BIDDLE, K. BORODULIN, et al. World Health Organization 2020 guidelines on physical activity and sedentary behaviour. *British Journal of Sports Medicine*, 2020, 54(24), 1451-1462. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2020-102955>
- CABALLERO, A., R. GRANBERG AND K. Y. TSENG Mechanisms contributing to prefrontal cortex maturation during adolescence. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 2016, 70, 4-12. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.05.013>
- CABALLERO, A. AND K. Y. TSENG GABAergic Function as a Limiting Factor for Prefrontal Maturation during Adolescence. *Trends in Neurosciences*, 2016, 39(7), 441-448. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.04.010>
- EZAGOURI, S., Z. ZWIGHAFT, J. SOBEL, S. BAILLIEUL, et al. Physiological and Molecular Dissection of Daily Variance in Exercise Capacity. *Cell Metabolism*, 2019, 30(1), 78-91.e74. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.03.012>
- GABRIEL, B. M. AND J. R. ZIERATH Circadian rhythms and exercise — re-setting the clock in metabolic disease. *Nature Reviews Endocrinology*, 2019/04/01 2019, 15(4), 197-206. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0150-x>
- HAFNER, M., E. YERUSHALMI, M. STEPANEK, W. PHILLIPS, et al. Estimating the global economic benefits of physically active populations over 30 years (2020–2050). *British Journal of Sports Medicine*, 2020, 54(24), 1482-1487. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2020-102590>
- HILLS, A. P., L. B. ANDERSEN AND N. M. BYRNE Physical activity and obesity in children. *British Journal of Sports Medicine*, 2011, 45(11), 866-870. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2011-090199>
- JANTARATNOTAI, N., K. MOSIKANON, Y. LEE AND R. S. MCINTYRE The interface of depression and obesity. *Obesity Research & Clinical Practice*, 2017/01/01/ 2017, 11(1), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.orcp.2016.07.003>
- KUTSENKO, Y., A. BARREDA, A. TOVAL, D. GARRIGOS, et al. Sex-dependent effects of forced exercise in the body composition of adolescent rats. *Scientific Reports*, 2021, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89584-8>
- LAMONTE, M. J., C. E. BARLOW, R. JURCA, J. B. KAMPERT, et al. Cardiorespiratory Fitness Is Inversely Associated With the Incidence of Metabolic Syndrome. *Circulation*, 2005, 112(4), 505-512. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.104.503805>
- LIU, J., C. S. FOX, D. A. HICKSON, W. D. MAY, et al. Impact of Abdominal Visceral and Subcutaneous Adipose Tissue on Cardiometabolic Risk Factors: The Jackson Heart Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2010, 95(12), 5419-5426. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-1378>
- MATHIEU, P., P. POIRIER, P. PIBAROT, I. LEMIEUX, et al. Visceral Obesity. *Hypertension*, 2009, 53(4), 577-584. <https://doi.org/10.1161/hypertensionaha.108.110320>
- ORTEGA, F. B., C. J. LAVIE AND S. N. BLAIR Obesity and Cardiovascular Disease. *Circulation Research*, 2016, 118(11), 1752-1770. <https://doi.org/10.1161/circresaha.115.306883>
- PETRIDOU, A., A. SIOPI AND V. MOUGIOS Exercise in the management of obesity. *Metabolism*, Mar 2019, 92, 163-169. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.10.009>
- SATO, S., A. L. BASSE, M. SCHÖNKE, S. CHEN, et al. Time of Exercise Specifies the Impact on Muscle Metabolic Pathways and Systemic Energy Homeostasis. *Cell Metabolism*, 2019, 30(1), 92-110.e114. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.03.013>
- SPEAR, L. P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 2000, 24(4), 417-463. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(00\)00014-2](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(00)00014-2)
- TOVAL, A., D. GARRIGOS, Y. KUTSENKO, M. POPOVIĆ, et al. Dopaminergic Modulation of Forced Running Performance in Adolescent Rats: Role of Striatal D1 and Extra-striatal D2 Dopamine Receptors. *Molecular Neurobiology*, 2021/01/04 2021. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02252-2>

ANEXOS: