



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN DE MARCADORES CIRCADIANOS DE
CRONODISRUPCIÓN EN OBESIDAD. UTILIDAD EN LA
PRÁCTICA CLÍNICA**

M^a Dolores Corbalán Tutau

2012

A mis padres

A Lucas y Pablo

A veces sentimos,
que lo que hacemos es tan solo una gota en el mar,
pero el mar sería menos si le faltara una gota

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Murcia, por haberme proporcionado los medios técnicos y humanos necesarios para mi formación investigadora y, en general, a todas aquellas personas e instituciones que han hecho posible la realización de esta Tesis doctoral.

A la Prof. D^a Marta Garaulet, directora de esta tesis, por la confianza que depositó en mí permitiendo incorporarme a su equipo de trabajo y delegándome el desarrollo de este proyecto. Por sacar lo mejor de mí en cada momento y animarme a continuar en situaciones difíciles. Eres la máxima responsable de que este trabajo vea finalmente la luz, gracias por tu paciencia y dedicación, para mí eres un ejemplo de trabajo.

Al Prof. D. Juan Antonio Madrid, codirector de esta tesis, por enseñarme lo que es la cronobiología, por su constante apoyo, su colaboración y su opinión crítica en el trabajo de investigación realizado.

Al Prof. D. Salvador Zamora, Catedrático de Fisiología de la Universidad de Murcia, por el seguimiento de este trabajo y poder aprender de su dilatada experiencia en el campo de la Fisiología.

Al Prof. D. Manuel Canteras, Catedrático de Bioestadística de la Universidad de Murcia, por guiarme en el complicado mundo de la estadística, quiero destacar su rigurosidad, amabilidad, disponibilidad y en definitiva su profesionalidad.

Al Prof. Jose M^a Ordovás, por el interés mostrado en este proyecto, por sus correcciones y opiniones críticas, por ser un ejemplo a seguir.

Al Dr. Francisco Nicolás, y al Servicio de Bioquímica de la Arrixaca, por su ayuda y hacer posible el desarrollo de las determinaciones analíticas.

Al Servicio de Ayuda a la Investigación (SAI), conocido por todos como el SACE, gracias a Toñi, Juana y Pepe, porque hacen fácil y llevadero cualquier trabajo, son ejemplo de profesionalidad, entrega y simpatía.

A Teresa Hernández y Ana Espallardo, por el esfuerzo que hicieron al iniciar este trabajo.

A todas las mujeres que desinteresadamente se han prestado voluntarias para desarrollar este trabajo, muchísimas gracias a todas.

A todos los profesores del Departamento de Fisiología, en especial a José Ángel López, por sus consejos y amistad a lo largo de estos años y a Javier Martínez, por ser capaz de arrancarnos siempre una sonrisa. Sin olvidar por supuesto a Paquita Pérez y Elvira Larqué.

A Juan Antonio Sarabia y Teresa Mondéjar, por ayudarme en mis inicios con la cronobiología, gracias por vuestra accesibilidad en esos difíciles momentos que son los inicios.

A todos los demás miembros del departamento, porque ellos saben mejor que nadie la dura vida de un doctorando. Entre ellos, Dani González, Eli Ortiz, Antonio Martínez, Luisa Vera, Ana del Pozo, Borja Blanco, Ander Montoya, Natalia Villamizar, José Fernando López y Carmen Sánchez. Por último a tod@s los que han estado y ya no están. Eva Morales, Juan Carlos Baraza, Vera Cruz, M^a José López, María Sabater, Juan Antonio Martínez, Catarina Oliveira y Rodrigo Fortes. A todos, muchas gracias, por vuestro compañerismo.

A Fátima Pérez de Heredia y Juan José Hernandez, por ser ejemplo de trabajo y constancia, por vuestra ayuda incondicional y sobre todo por vuestra amistad.

A mis niñas de la sala, por ser mi familia durante estos años. Rebeca Martínez, por ser como eres, por la ilusión y el trabajo que dedicas a todo y siempre tener tiempo para echar una mano a los demás. Ana Pagán, por su originalidad, cariño y apoyo, porque con chicas como tú todos los días tienen color. Lorena Cabrera, por su inocencia y ternura, gracias por los buenos momentos que me has dado y por estar siempre ahí para escuchar. María Ruíz, eres la fuerza en persona, en ti se unen la dulzura y la energía. Carmen Torralba, por

transmitirme con tanto cariño su experiencia. Maria Sánchez-Campillo, por sus animadas anécdotas. Patricia Rubio, aunque hemos pasado poco tiempo juntas, suficiente para descubrir a una gran compañera. Cristina Bandín, por darme la oportunidad de conocerte un poquito más y a Domingo, por su buen carácter y cariño. A todos daros las gracias por estar ahí durante todo este tiempo y por ser como sois “las mejores”, os quiero.

A Carmen Piernas, Puri Gómez-Abellán y Cecilia Gómez Santos, sin vosotras esta tesis jamás hubiera visto la luz, sois las mejores amigas que cualquiera podría desear. Carmen, gracias por tu alegría, cariño, consejos... No tengo palabras para decir todo lo que he aprendido de ti, por favor no cambies nunca, siempre me sentiré orgullosa de decir que eres mi amiga. Ceci, sabes todo lo que significa tu amistad para mí, gracias por tus consejos, por cuidarme como lo has hecho, y por estar ahí en los buenos y en los malos momentos, por último, Puri, mi apoyo incondicional, siempre dispuesta a ayudarme sin esperar nada a cambio, eres una de las mejores personas que he conocido en mi vida y espero que en esta vida obtengas toda la felicidad que te mereces. Sólo deciros que os quiero y que sé que siempre podré contar con vosotras.

A Enrique y Sheila, por trabajar como tres, por vuestro compañerismo y amistad.

A Águeda, Tere, y M^a Carmen por ser las mejores amigas y por la ilusión con la que compartimos nuestras vidas, gracias por estar siempre ahí.

A Lucas por ser mi compañero, mi amigo y consejero. Por compartir conmigo tu vida.

A mis hermanos, Marisol, Ana y Pedro, gracias por ser como sois, por vuestro apoyo y cariño y saber que los cuatro juntos podemos afrontar cualquier situación en la vida.

A mis padres, no tengo palabras para agradecerles todo lo que han hecho por mí, me han dado siempre todo su apoyo y confianza, sólo pensando en mi bienestar y felicidad. Sois el mejor ejemplo de trabajo y sacrificio, y nunca podré recompensaros. Os quiero mucho.

A Pablo, por ser el mejor regalo que he recibido en la vida, porque durante los nueve meses que te llevé dentro me diste la fuerza y energía para terminar esta tesis, todos los días doy gracias a Dios por tenerte conmigo, eres el amor de mi vida.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	5
1. Obesidad	7
1.1 Definición y criterios diagnósticos.....	7
1.1.1 Criterios diagnósticos	7
1.2 Tipos de obesidad.....	9
1.2.1 Obesidad androide.....	10
1.2.2 Obesidad ginoide	10
1.3 Factores de riesgo de la obesidad.....	11
1.3.1 Factores genéticos	11
1.3.2 Factores neuroendocrinos	12
1.3.3 Hábitos alimentarios.....	12
1.3.3.1 Ambiente obesogénico.....	12
1.3.3.2 Comer fuera de casa.....	13
1.3.3.3 Tamaño de las raciones.....	13
1.3.3.4 Desayuno.....	13
1.3.3.5 Aperitivos.....	13
1.3.3.6 Frecuencia de consumo.....	13
1.3.4 Actividad física.....	13
1.3.5 Causas psicosociales.....	14
1.4 Tratamientos de la obesidad.....	14
2. Cronobiología	16
2.1 Conceptos básicos de cronobiología.....	16
2.2 El reloj circadiano.....	17
2.3 Representación gráfica y análisis de datos de cronobiología.....	18
2.4 Técnicas de estudio del sistema circadiano.....	19
2.4.1 Estudio de la temperatura corporal.....	20
2.5 Cuando el sistema circadiano funciona mal: Cronodisrupción (CD).....	21
2.6 Causas de cronodisrupción.....	23
3. Cronobiología y Obesidad	25

3.1 Cronobiología y obesidad: Evidencias clínicas de esta interesante relación...	25
3.1.1 Evidencias genéticas...	25
3.1.2 Evidencias epidemiológicas...	27
4. Marcadores circadianos en obesidad...	29
4.1 Melatonina...	29
4.2 Cortisol...	30
4.3 Temperatura periférica...	31
4.4 Patrones de comida y sueño...	32
4.4.1 Patrones de comida...	32
4.4.2 Patrones de sueño...	34
Referencias...	37
OBJETIVOS...	49
Objetivo general...	51
Objetivos específicos...	51
SUJETOS, MATERIALES Y MÉTODOS...	53
1. Selección de sujetos...	55
1.1 Diseño del estudio: identificación de casos y controles...	55
2. Estudio antropométrico...	55
2.1 Material antropométrico empleado...	56
2.2 Protocolo de medida...	57
2.3 Peso y talla: Índice de Masa Corporal (IMC)...	58
2.4 Cálculo del porcentaje de grasa corporal...	58
2.5 Cálculo de la distribución de grasa corporal...	59
2.6 Clasificación de obesidad visceral y cutánea...	60
2.7 Estudio de bioimpedancia...	60
3. Descripción del cuestionario para la evaluación de la actividad física...	62
3.1 Puntuación del cuestionario de actividad física...	63
4. Determinaciones sanguíneas...	64
4.1 Determinación del colesterol total...	64

4.2 Determinación de HDL-colesterol...	64
4.3 Determinación de LDL-colesterol...	65
4.4 Determinación de triglicéridos...	65
4.5 Determinación de Ghrelina...	65
4.6 Determinación de Leptina...	66
4.7 Determinación de Adiponectina...	66
5. Medida de presión arterial...	67
5.1 Protocolo de medida...	67
6. Medidas de glucosa...	67
7. Clasificación del Síndrome Metabólico.....	68
8. Medición de temperatura corporal periférica...	69
8.1 Significado de cada parámetro de temperatura.....	70
9. Mediciones en saliva de melatonina y cortisol...	71
9.1 Determinación de melatonina salivar...	71
9.2 Determinación salivar de cortisol...	72
10. Evaluación nutricional...	72
11. Análisis del ciclo sueño-vigilia...	73
12. Determinación del carácter matutino-vespertino...	73
13. Determinación de los polimorfismos de los genes reloj <i>Per2</i> y <i>CLOCK</i>	
Referencias...	75
RESULTADOS	79
Artículo 1. Differences in daily rhythms of wrist temperature between obese and normal weight women. Associations with Metabolic Syndrome features...	81
Artículo 2. Daily profile in two circadian markers “melatonin and Cortisol” and associations with Metabolic Syndrome components.....	101
Artículo 3. Timing and duration of sleep and meals in obese and normal weight women. Associations with increase blood pressure.....	117
Artículo 4. <i>Per2</i> variants are associated with abdominal obesity, psycho-behavioral factors, and attrition in the dietary treatment of obesity.....	

DISCUSIÓN	161
A. Discusión general.....	163
B. Discusión específica por artículos.....	164
B. 1. Diferencias en los ritmos diarios de temperatura periférica entre mujeres obesas y normopeso. Asociación con las variables del Síndrome Metabólico.....	165
B. 2. Perfil diario de dos marcadores circadianos “la melatonina y el Cortisol” y sus asociaciones con los componentes del Síndrome Metabólico.....	168
B. 3. Horarios y duración del sueño y las comidas en mujeres obesas y normopeso y su asociación con un incremento de la presión arterial.....	171
B. 4. Hacia una caracterización cronobiológica de la obesidad en la práctica clínica.....	176
B. 5. Variantes del <i>Per2</i> están asociadas con la obesidad abdominal, factores psico-conductuales y abandonos en el tratamiento dietético de la obesidad.....	
B. 6. El gen <i>CLOCK</i> está implicado en la peso de pacientes obesos que seguían un tratamiento dietético basado en la dieta mediterránea.....	
CONCLUSIONES	187
Anexo I: RECOGIDA DE DATOS DE ANTROPOMETRÍA	189
Anexo II: CUESTIONARIO DE ACTIVIDAD FÍSICA	190
Anexo III: TABLA DE DATOS DE PRESIÓN ARTERIAL	197
Anexo IV: CUESTIONARIO DE CONSUMO DE ALIMENTOS	198
Anexo V: DIARIO DE SUEÑO	199
Anexo VI: CUESTIONARIO MATUTINIDAD-VESPERTINIDAD	200
Anexo VII: CARTAS DE ACEPTACIÓN	200

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

A	Amplitud
ACTH	Hormona Adrenocorticotropa
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico mensajero
AS	Área Subcutánea
AV	Área Visceral
CD	Cronodisrupción
CFI	Circadian Function Index
D	Densidad Corporal
DC	Diámetro Coronal
DS	Diámetro Sagital
EI	Estabilidad Interdiaria
F	Acrofase
HDL	Lipoproteína de alta densidad
ICC	Índice Cintura Cadera
ICM	Índice Cintura Muslo
IMC	Índice de Masa Corporal
L10	Mínima temperatura durante 10 horas consecutivas
LDL	Lipoproteína de baja densidad
M	Mesor

M5	Máxima temperatura durante 5 horas consecutivas
MLG	Masa Libre de Grasa
NSQ	Nucleo Supraquiasmático
OMS	Organización Mundial de la Salud
P	Periodo
P1	Potencia del primer armónico
P2	Potencia del segundo armónico
P2_P12	Relación entre armónicos
Pac12	Potencia del duodécimo armónico
PAD	Presión Arterial Diastólica
PAS	Presión Arterial Sistólica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PR	Porcentaje del Ritmo
PT	Pliegue Tripcipital
QP	Periodograma
RM	Resonancia Magnética
ROC	Receiving Operator Characteristic
SEEDO	Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad
SM	Síndrome Metabólico
TA	Tejido Adiposo
TAC	Tomografía Axial Computerizada
VI	Variabilidad Intradiaria

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. OBESIDAD

1.1 Definición y criterios diagnósticos

La obesidad es un trastorno metabólico crónico caracterizado por una excesiva acumulación de energía en forma de grasa en el organismo, que conlleva a un aumento del peso corporal con respecto al valor esperado según sexo, talla y edad (1). Por lo general, el exceso de peso se correlaciona con una acumulación desproporcionada de grasa (2) excepto en los deportistas, en quienes puede deberse a un aumento en la masa muscular.

El cuerpo humano contiene una cantidad de tejido graso que varía entre el 15-18% del peso en el varón y entre el 20-30% en la mujer. En función del porcentaje graso corporal, se suelen considerar sujetos obesos quienes presentan porcentajes por encima del 25% en varones y del 33% en mujeres (2,3).

1.1.1 Criterios diagnósticos

El criterio más exacto para la obesidad es la determinación del porcentaje de grasa que contiene el organismo (4). Para ello, se pueden utilizar diversas técnicas de medida de la composición corporal que estiman el contenido de grasa del organismo, como la densitometría, absorciometría con rayos X de doble energía, técnicas de imagen (tomografía computerizada y resonancia magnética), ecografía, agua corporal total, potasio corporal total, análisis de activación de neutrones, conductancia eléctrica total, bioimpedancia eléctrica y antropometría, entre otras (1-3). En la rutina clínica y en los estudios epidemiológicos nutricionales, los métodos más utilizados son la bioimpedancia eléctrica y la antropometría que incluye la medida del peso y talla, de las circunferencias corporales y pliegues cutáneos (5). De esta manera el grado de obesidad se establece preferentemente, con relación al índice de masa corporal (IMC: resultado de la división del peso corporal (Kg) entre la talla (m^2)), por tener buena correlación con el porcentaje de grasa corporal. Es cierto que el IMC presenta limitaciones como la sobrestimación del porcentaje de grasa en

individuos musculosos (deportistas) o la infravaloración en sujetos con baja masa magra (ancianos), y que la relación entre IMC y grasa corporal no es la misma en distintas poblaciones (6,7).

Aun cuando el punto de corte del IMC para definir obesidad ha ido variando ligeramente, en estos momentos se tiende a aceptar como obesidad un valor de IMC superior a 30, que es precisamente el punto de corte para definir obesidad propuesto por la OMS (5) en su clasificación del peso corporal recogida en la **tabla 1**.

Tabla 1. Criterios de la OMS para la definición de la obesidad según el índice de masa corporal (5).

Valores límites del IMC	
Normopeso	18,5-24,9
Sobrepeso	25-29,9
Obesidad grado 1	30-34,9
Obesidad grado 2	35-39,9
Obesidad grado 3	≥ 40

La clasificación de la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO) (2) introduce ligeras matizaciones a la clasificación de la OMS (**tabla 2**).

Tabla 2. Criterios de la SEEDO para definir la obesidad según el índice de masa corporal (2).

Valores límites del IMC	
Peso insuficiente	$< 18,5$
Normopeso	18,5-24,9
Sobrepeso grado 1	25-26,9
Sobrepeso grado 2	27-29,9
Obesidad grado 1	30-34,9
Obesidad grado 2	35-39,9
Obesidad grado 3 (mórbida)	40-49,9

Obesidad grado 4 (extrema)

 ≥ 50

En la clasificación propuesta por la SEEDO (2) se subdivide la categoría de sobrepeso en dos subcategorías (sobrepeso grado 1, IMC: 25-26,9, y sobrepeso grado 2, IMC: 27-29,9) y distingue un grado de obesidad 4 para los pacientes con IMC superior a 50, mientras que la clasificación de la OMS (5) sólo considera tres grupos de obesidad.

1.2 Tipos de obesidad

También tiene interés conocer el patrón de distribución de la grasa corporal por su relación con el riesgo cardiovascular y otras alteraciones (8). Teniendo en cuenta aspectos relativos a la distribución topográfica de la grasa corporal, la escuela de Marsella diseñó hace más de 30 años una clasificación de los pacientes obesos en función de la relación adiposo-muscular en las cinturas escapular y pelviana, lo que llevó a Vague en 1947 (9) a clasificar la obesidad como de tipo androide y ginoide.

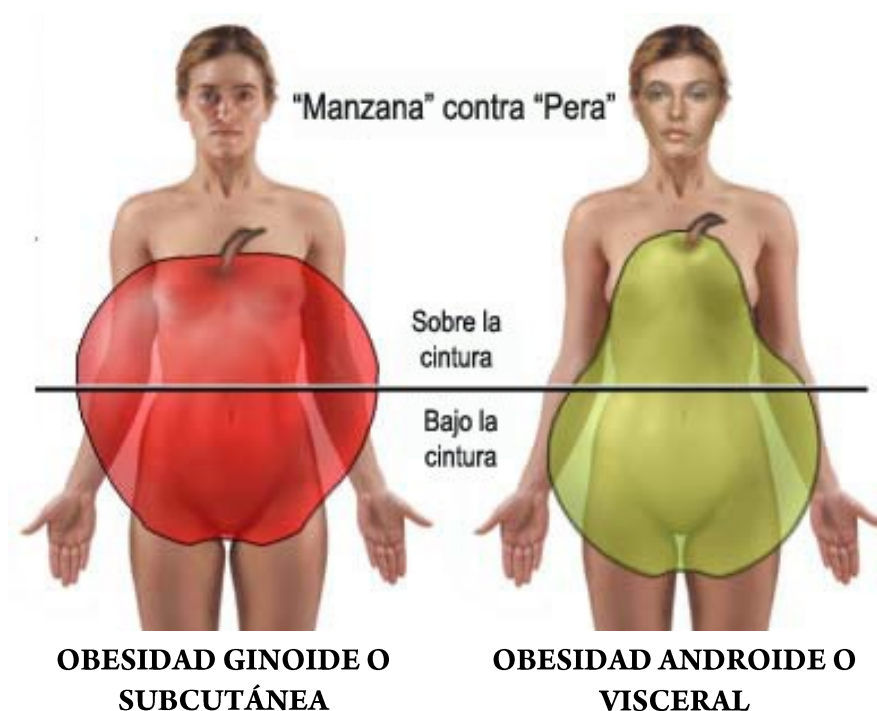


Figura 1. Tipos de obesidad: Obesidad androide o central o abdominal (en forma de manzana) y Obesidad ginoide o periférica (en forma de pera).

En un intento de establecer la distribución de la grasa corporal y relacionarla con factores de riesgo cardiovascular, la SEEDO en el consenso de 2007 (2) ha establecido unos criterios de distribución de la grasa corporal clasificando también la obesidad en:

1.2.1 Obesidad androide:

Más marcada en el segmento superior, con mayor celularidad y volumen adipocitario a nivel del área del deltoides respecto al área trocantérea, se caracteriza por un excesivo acúmulo de grasa en la región abdominal y tiene un mayor riesgo de desarrollar complicaciones metabólicas y vasculares.

Desde el punto de vista antropométrico consideramos que una obesidad es de tipo androide cuando el índice cintura/cadera (ICC) es superior a 1 en el varón y a 0,9 en la mujer.

Dentro de la obesidad androide se distingue dos subtipos de características anatómicas y funcionales diferentes:

- a) Obesidad androide con disposición de grasa preferentemente subcutánea, en la que el exceso de tejido adiposo se localiza en la zona subcutánea abdominal.
- b) Obesidad androide con disposición de grasa preferentemente intraabdominal visceral, donde existe un exceso de grasa abdominal perivisceral. Esta grasa intraabdominal se encuentra fuertemente asociada con el síndrome plurimetabólico y por tanto con el riesgo cardiovascular.

1.2.2 Obesidad ginoide:

Más marcada en el segmento inferior (cinturón escapular < cinturón pelviano), presenta una tendencia mayor a las complicaciones de tipo mecánico (insuficiencia venosa, poliartritis, etc.) y menor tendencia a las complicaciones metabólicas. El exceso de grasa subcutánea se sitúa a nivel gluteo-femoral.

Un aspecto a tener en cuenta en esta clasificación es que el aumento de grasa visceral sólo puede objetivarse mediante Tomografía Axial Computerizada (TAC) o por Resonancia Magnética (RM) que permiten determinar las áreas de grasa intraabdominal o perivisceral

(AV) y las de grasa abdominal subcutánea (AS). A partir de éstas, se calcula un índice (AV/AS) que cuando es superior a 0,4 indica obesidad visceral. Para el índice inverso (AS/AV) se considera intraabdominal visceral cuando éste es menor a 0,75 (10).

Los valores indicadores de riesgo para cada una de estas medidas se recogen en la tabla 3. Estudios epidemiológicos indican que, de las tres medidas antropométricas referidas, la medida de la circunferencia de la cintura es la más fiable y práctica para estimar el contenido de grasa abdominal (**tabla 3**) (2, 8,11,12).

Tabla 3. Datos antropométricos para la evaluación de la distribución de la grasa corporal (2)

Medida	Límite superior de la normalidad	
	Hombres	Mujeres
Índice cintura-cadera	1	0,90
Circunferencia de la cintura (cm)	102	88
Diámetro sagital (cm)	25	25

1.3 Factores de riesgo de la obesidad

El peso corporal está determinado por una interacción entre factores genéticos y ambientales relacionados con el estilo de vida (13). Una alteración en alguno o varios de estos factores ocasionan un desajuste del control del balance energético, bien sea en la ingesta o en el gasto energético, provocando un balance energético positivo y la aparición de la obesidad (14,15). Debido al aumento tan acusado de la obesidad que se está produciendo en la sociedad actual (16), muchas investigaciones están encaminadas a esclarecer el origen y la causa de la obesidad, la cual incluye factores genéticos, neuroendocrinos, además de factores relacionados con el estilo de vida (dieta y actividad física)(17).

1.3.1 Factores genéticos

El componente hereditario de la obesidad se comenzó a valorar en las primeras décadas del siglo XX, pero sólo en los últimos años se ha empezado a disponer de datos objetivos sobre los posibles genes involucrados en el desarrollo de la misma. Los datos de los que se

dispone en la actualidad sugieren que entre el 40%-70% de la variación de los fenotipos de la obesidad está mediada genéticamente (18). El número de genes, marcadores y regiones cromosómicas que han sido relacionadas con fenotipos de obesidad en humanos continúa aumentando.

1.3.2 Factores neuroendocrinos

El aumento de la adiposidad como resultado de un balance energético positivo puede venir determinado por una alteración metabólica de origen neuroendocrino, que se traduciría en un menor gasto energético (19,20).

Algunas alteraciones endocrinas pueden producir obesidad, como la hiperfunción suprarrenal (síndrome de Cushing), que produce una obesidad característica en la región facio-troncular (21), y el síndrome de ovario poliquístico (22), que se caracteriza por amenorrea, hirsutismo, aumento progresivo de peso y resistencia insulínica. La deficiencia de hormona de crecimiento (23), el hiperinsulinismo (15), el hipogonadismo (24) y el hipotiroidismo (25), también se asocian con la ganancia de peso.

1.3.3 Hábitos alimentarios

Una dieta inadecuada por exceso de aporte calórico, la sobrealimentación en edades tempranas, el consumo de alimentos con una alta palatabilidad, el comer entre horas (“picotear”) (26), son factores de riesgo para el desarrollo de la obesidad (25). Por otra parte, existe una gran controversia sobre la posible contribución de la densidad de grasa en la dieta al desarrollo de obesidad (27), o si por el contrario, es irrelevante cuando se mantiene constante la ingesta calórica total (28). Esto es debido a que no existe una correlación un aumento de la ingesta energética y la prevalencia de la obesidad (29). Sin embargo, está demostrada la infravaloración de la ingesta declarada de los individuos obesos (30), lo que podría explicar la falta de asociación entre la obesidad y el aumento de la ingesta energética.

Dentro de los hábitos alimentarios es importante destacar los siguientes factores:

1.3.3.1 Ambiente obesogénico

La ausencia de supermercados con disponibilidad de frutas y hortalizas o su ubicación a grandes distancias, sobre todo en núcleos humanos con niveles socioeconómicos

desfavorecidos, son factores condicionantes de un mayor IMC medio poblacional (31,32). Deben arbitrarse estrategias que hagan posible la disponibilidad alimentaria y el acceso a alimentos saludables, en especial a frutas y hortalizas, para crear ambientes favorables para mantener el IMC medio poblacional (33).

1.3.3.2 Comer fuera de casa

El consumo de fast food de forma habitual (más de una vez a la semana) puede contribuir al incremento de la ingestión energética y a la ganancia de peso y obesidad (34,35). Limitar el consumo habitual (frecuencia de más de una vez a la semana) de fast food puede evitar la ganancia de peso debida a este factor (33).

1.3.3.3 Tamaño de las raciones

El ofrecimiento de raciones de mayor tamaño condiciona un aumento en la ingesta energética de los individuos. La utilización de raciones de menor tamaño limita la ingesta energética (33).

1.3.3.4 Desayuno

Son controvertidas e inconsistentes las investigaciones que estudian la relación entre la omisión del desayuno en adultos y el riesgo de sobrepeso y obesidad (36,37,38,39).

1.3.3.5 Aperitivos

Son controvertidas e inconsistentes las investigaciones que sugieren que el consumo de aperitivos está asociado con el incremento de peso (40,41,42).

1.3.3.6 Frecuencia de consumo

Las investigaciones que estudian la relación entre la frecuencia de comidas y la variación de peso corporal son inconsistentes (43,44,45).

1.3.4 Actividad física

La población adopta estilos de vida cada vez más sedentarios (46). Esta tendencia puede deberse al descenso en la actividad física requerida en la mayoría de los trabajos, así como

una mayor disponibilidad de medios de locomoción (en sustitución al hábito de caminar) y a un tipo de ocio que sólo exige una actitud pasiva (ver televisión, ordenador...). Parece que este estilo de vida que se está implantando en la sociedad actual es una de las causas del desarrollo de la obesidad como una epidemia mundial (47).

1.3.5 Causas psicosociales

Determinadas situaciones ambientales pueden desencadenar respuestas emocionales que condicionan un exceso de ingesta conduciendo a lo que se denomina obesidad reactiva (3, 48).



Figura 2. Principales causas de la obesidad. Las causas de la obesidad son múltiples, e incluyen factores tales como la herencia genética; el comportamiento del sistema nervioso, endocrino y metabólico; y el tipo o estilo de vida que se lleve.

1.4 Tratamiento de la obesidad

Las estrategias terapéuticas exigen un abordaje multidisciplinario de la obesidad que constituye la forma más eficaz de intervención y debe ser entendido como el tratamiento de

una enfermedad crónica (**tabla4**) (2). En principio, siempre se debe comenzar con una evaluación adecuada del paciente desde el punto de vista clínico y psicológico, para conocer los hábitos dietéticos y establecer de forma individualizada las indicaciones dietéticas correctas, así como abandonar el sedentarismo y realizar ejercicio físico.

Tabla 4. Condiciones que debería cumplir el tratamiento dietético de la obesidad

- Tiene que disminuir la grasa corporal preservando al máximo la masa magra
- Ha de ser realizable por un espacio de tiempo prolongado
- Debe ser eficaz a largo plazo, esto es, ha de mantener el peso perdido
- Ha de prevenir futuras ganancias de peso
- Tiene que conllevar una función de educación alimentaria que destierre errores y hábitos de alimentación inadecuados
- Debe disminuir los factores de riesgo cardiovascular asociados a la obesidad (hipertensión arterial, dislipemia, prediabetes o diabetes mellitus)
- Ha de mejorar otras comorbilidades vinculadas al exceso de peso (apnea del sueño, artrosis, riesgo neoplásico, etc.)
- Ha de inducir una mejoría psicósomática, con recuperación de la autoestima
- Tiene que aumentar la capacidad funcional y la calidad de vida.

Además, la aplicación clínica de técnicas cognitivo-conductuales ha abierto un campo eficaz en el tratamiento crónico de la obesidad. La estrategia de modificación conductual desempeña un papel importante en el cambio de hábitos, cuya función principal es motivar al paciente obeso a seguir el programa de pérdida de peso, proporcionar estímulos positivos, afianzar los hábitos alimentarios y de actividad física aprendidos, ganar en autoestima y disminuir la ansiedad (2, 48). Pérdidas de peso moderadas (10%) y mantenidas, se traducen en efectos muy beneficiosos para la salud del paciente (49).

Sin embargo, los tratamientos dietéticos para la obesidad son a veces poco efectivos y otros factores tales como cambios en la conducta alimentaria a través de la terapia de

comportamiento, y en hábitos de sueño. Así como la intervención en otros factores cronobiológicos relacionados con el cuándo, tales como el horario de comida, la velocidad de la ingesta, evitar el picoteo, la luminoterapia, podrían ser nuevas técnicas en el tratamiento de la obesidad que mejoraran la efectividad de los tratamientos.

2. CRONOBIOLOGÍA

2.1 Conceptos básicos de cronobiología

La cronobiología (del griego Kronos= tiempo; bios= vida y logos= ciencia) es la disciplina científica que estudia los cambios rítmicos (ritmos biológicos) que se producen en los seres vivos en sus distintos niveles de organización. Esta ciencia introduce una nueva dimensión en la biología y en la medicina, el tiempo (50). Si integramos el tiempo en la biología de los seres vivos hemos de admitir que la fisiología, la bioquímica y la conducta de cada ser vivo es diferente en función de la hora del día y del día del año en el que se estudie (51).

Entre los parámetros que caracterizan los ritmos biológicos, el período, o tiempo que tarda en repetirse una oscilación completa, y su inversa, la frecuencia, o números de ciclos por unidad de tiempo, son los que se han utilizado tradicionalmente para caracterizar los diferentes ritmos biológicos (52).

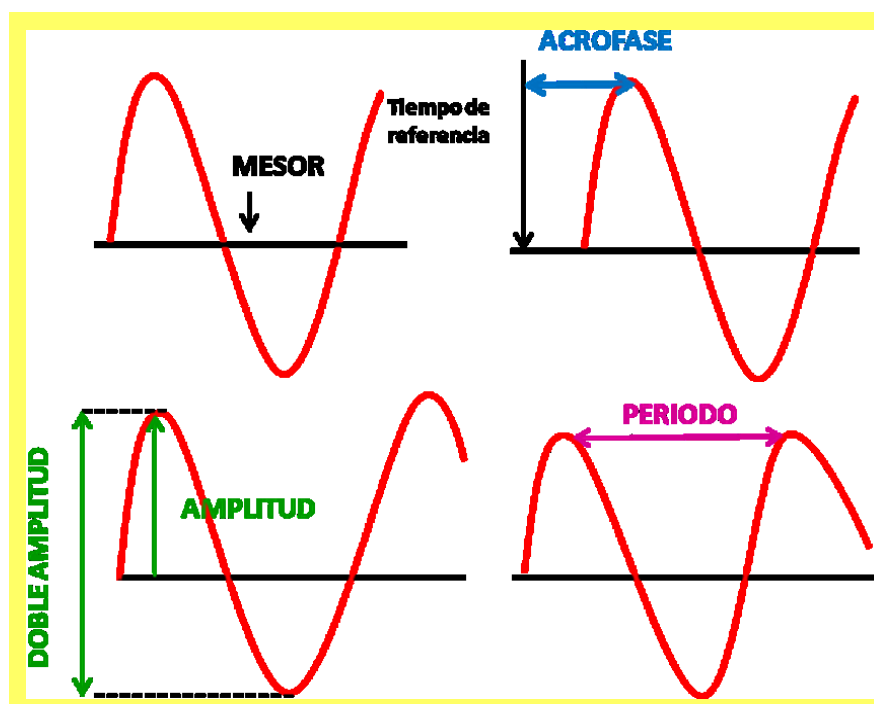


Figura 3. Parámetros que caracterizan los ritmos biológicos: Mesor (M), Acrofase (f), Amplitud (A) y Período (P).

En cronobiología se suele utilizar como unidad de frecuencia el día. De este modo, los ritmos pueden clasificarse como ritmos circadianos, con frecuencia próxima a un ciclo por día (período comprendido entre >20 y <28 horas), ultradianos, con frecuencia superior a un ciclo por día (período < 20 h) e infradianos, ritmos cuya frecuencia es inferior a la diaria (período > 28 h) (50).



Figura 4. Los ritmos biológicos, objeto de estudio de la Cronobiología, pueden clasificarse según el periodo o duración de un ciclo completo.

2.2 El reloj circadiano

Debido a la importancia para la supervivencia de las especies, la selección natural ha favorecido que todos los organismos, desde procariotas hasta los humanos, posean relojes que generan oscilaciones con períodos aproximadamente de 24 horas. En mamíferos, el reloj o marcapasos circadiano principal se localiza en los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo (NSQ) (51). Se trata de dos pequeños núcleos de unos pocos miles de neuronas, localizados a cada lado del tercer ventrículo y en posición dorsal con respecto al quiasma óptico.

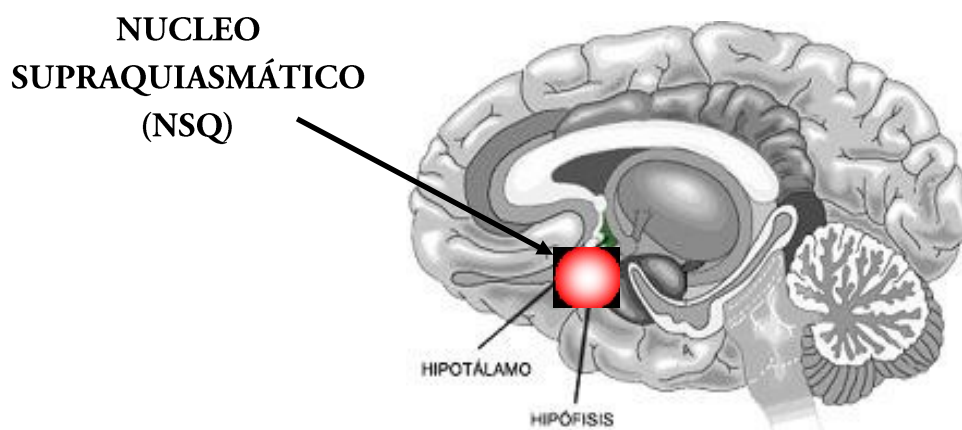


Figura 5. El núcleo supraquiasmático del hipotálamo, que conforma el marcapasos que pone en hora todos los relojes del individuo.

Si bien para que aparezcan los ritmos circadianos basta con la actuación de los NSQ, para que dichos ritmos se mantengan sincronizados a los ciclos ambientales es necesario que el marcapasos circadiano se ponga en hora periódicamente por la actuación de determinados factores ambientales (sincronizadores o *zeitgebers*) que oscilan rítmicamente (53). Entre ellos, el ciclo luz-oscuridad es el más importante para la mayoría de las especies.

Aparte de las señales neuronales, el NSQ difunde su señal rítmica al resto del organismo, mediante la actuación de intermediarios humorales como la melatonina, los factores de crecimiento epidérmico TGF α y EGF y prokinetina 2. La melatonina es una hormona producida por la glándula pineal bajo el control directo de los NSQ (53). La melatonina es considerada como una señal universal de oscuridad química, difundiendo el mensaje de los NSQ a todas las células del organismo.

Además de los NSQ, la retina, tracto retinohipotalámico y el binomio pineal-melatonina, el sistema circadiano se compone de numerosos osciladores secundarios (córtex cerebral, tejido adiposo, hígado, riñón, etc), capaces de producir oscilaciones circadianas, que en condiciones normales se encuentran bajo el control de los NSQ (53,54). Sin embargo, estos osciladores pueden funcionar autónomamente en cultivos de tejidos y pueden ser sincronizados por señales periódicas diferentes a la luz, como son los ciclos de temperatura o la disponibilidad de nutrientes.

2.3 Representación gráfica y análisis de datos en cronobiología.

En la cronobiología a diferencia de otras ciencias el tiempo es importante, por tanto es necesario determinar las variables fisiológicas clásicas desde una nueva perspectiva. En este sentido, no es suficiente con la determinación basal en ayunas, sino que se hace necesario realizar distintas determinaciones a lo largo de las 24h y por ello cuando nos encontramos ante una variable rítmica, la influencia de los intervalos de muestreo es crucial.

A medida que vamos aumentando la frecuencia de muestreo, nos vamos aproximando más a la situación real. Para un ritmo circadiano típico, se considera aceptable la

determinación de la variable cada 4 horas (6 valores en 24 h), si bien un valor cada tres horas es más adecuado; sin embargo, para variables con ritmos pulsátiles (ultradianos), la frecuencia de muestreo debe aumentarse (52).

Un ritmo biológico puede ser analizado midiendo una determinada variable cada cierto tiempo a lo largo de varios ciclos en un individuo (muestreo longitudinal) o bien determinando la variable a lo largo de un solo ciclo en varios individuos (muestreo transversal) (55). En el primer caso habremos caracterizado los parámetros rítmicos en un sujeto, mientras que en el segundo habremos obtenido una muestra de una población.

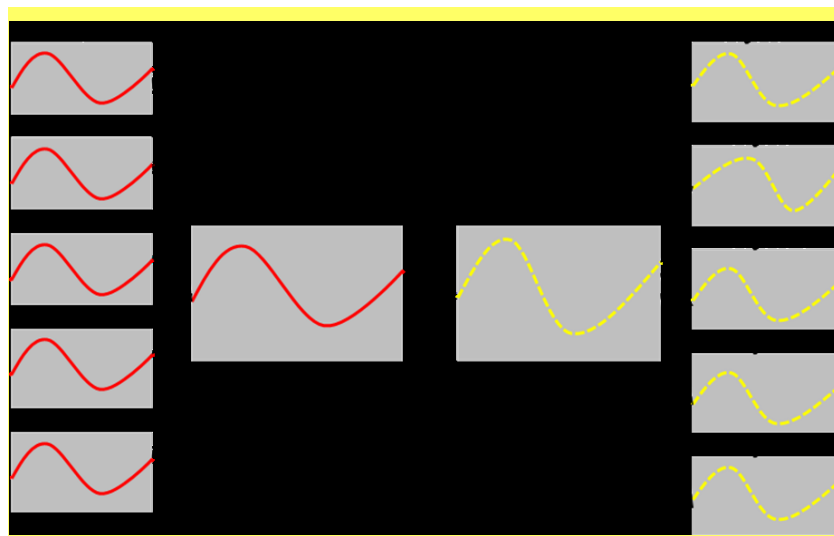


Figura 6. Muestreos longitudinales: El mismo sujeto es muestreado a lo largo del tiempo. Muestreos transversales: Diferentes sujetos son muestreados en tiempos distintos.

El cronograma es la representación en función del tiempo de los datos tal y como se han obtenido del individuo. Permite formarse una idea de los procedimientos que se deberán utilizar para su posterior análisis matemático.

2.4 Técnicas de estudio del sistema circadiano

Los relojes biológicos son poco o nada accesibles, incluso podemos desconocer dónde se encuentran, dependiendo de la especie animal. Por ello, en muchos casos, debemos recurrir a una medida indirecta de su funcionamiento, lo que a su vez implica que debemos registrar una determinada variable a lo largo de varios ciclos. Los ritmos comportamentales,

frecuentemente utilizados en cronobiología, serían como las manecillas del reloj, que nos indican cómo está funcionando su maquinaria.

Entre estos se encuentran variables como la temperatura corporal, tanto central como periférica, la presión arterial y la secreción de la mayoría de hormonas, especialmente de la melatonina y el cortisol, todas ellas presentan ritmos robustos y precisos, y constituyen buenos indicadores del funcionamiento del sistema circadiano (56). Lo ideal, si es técnicamente posible, es que se registren simultáneamente dos o más ritmos marcadores de un mismo organismo. A continuación se incluye una breve presentación de algunas de las técnicas disponibles para el registro de diferentes variables fisiológicas y comportamentales.

2.4.1 Estudio de la temperatura corporal

Siempre hemos de tener en cuenta que el ritmo circadiano de temperatura corporal central y periférica son inversos, de tal forma que un máximo de temperatura central coincide aproximadamente con un mínimo en la periférica y viceversa. Básicamente, la vasodilatación producida a nivel periférico ayuda a disipar el calor corporal disminuyendo la temperatura central, (por eso el ritmo de temperatura periférica muestra una oposición de fase con respecto al de temperatura central), mientras que una vasoconstricción periférica ayuda a la elevación de la temperatura central (57).

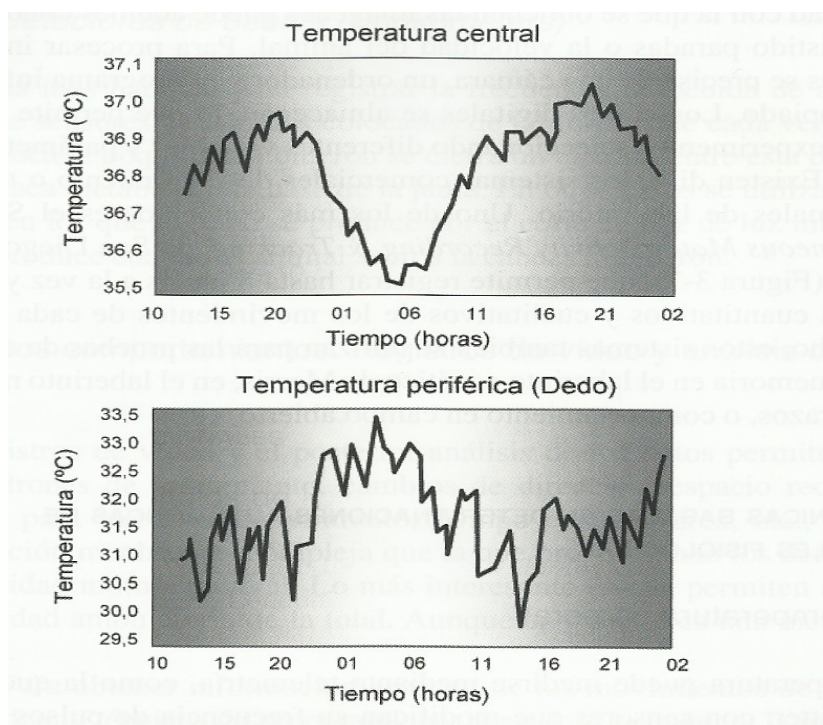


Figura 7. Temperatura central (panel superior) y periférica (panel inferior).

Para utilizar tanto en humanos como en animales de laboratorio, se utilizan los iButton® (Thermochron®), básicamente se trata de un chip encapsulado en acero inoxidable, son robustos y de pequeño tamaño, de unos 16 mm de diámetro y 4 mm de altura. Su memoria admite hasta 2.500 datos. Un lector acoplado a un puerto USB permite tanto la programación del dispositivo (definiendo cada cuanto tiempo queremos la toma de muestras y el momento de inicio de la grabación) como el vaciamiento de los mismos al ordenador para su posterior análisis.

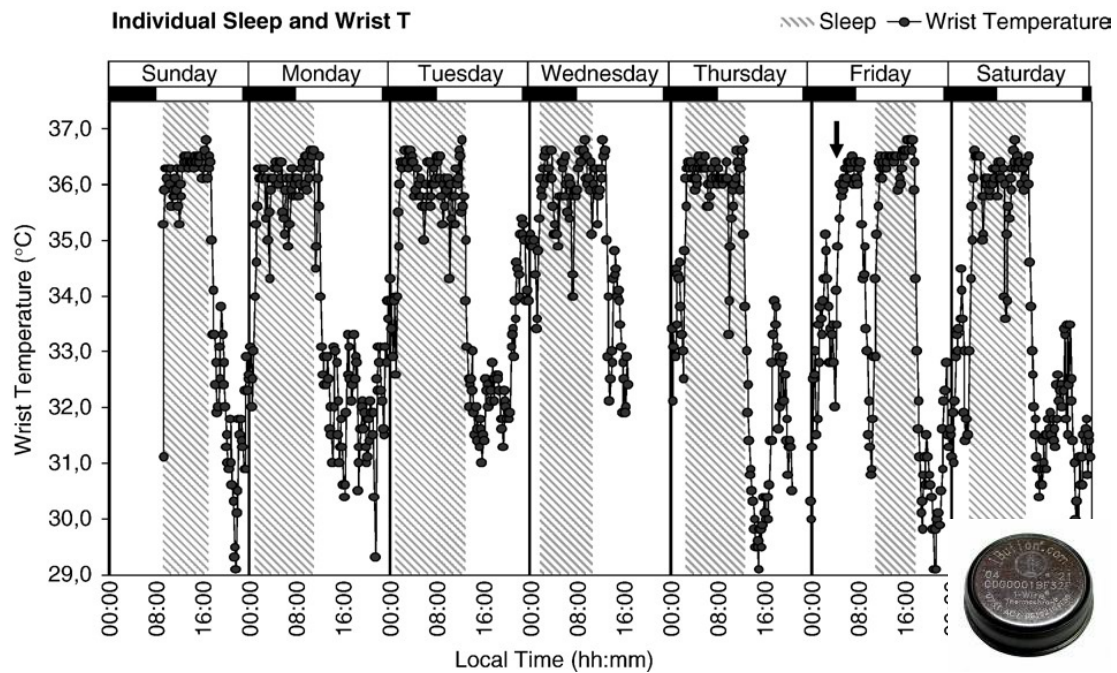


Figura 8. Representación gráfica de los valores de temperatura periférica, medida en la muñeca en un sujeto sano a lo largo de siete días. Cada elevación de la temperatura coincide con el período de sueño (área sombreada). En la esquina inferior se ha incluido una fotografía del *data logger* utilizado para el registro (Ibutton®, Thermochron®). Datos procedentes de JA. Sarabia, Laboratorio de Cronobiología de la Universidad de Murcia.

2.5 Cuando el sistema circadiano funciona mal: Cronodisrupción (CD).

Durante estos últimos años en la ciencia de la Cronobiología se ha introducido un nuevo término, la “cronodisrupción (CD)” o interrupción circadiana, que puede ser definida como una importante perturbación del orden temporal interno de los ritmos circadianos fisiológicos, bioquímicos y comportamentales. También podría definirse como la ruptura de la sincronización entre los ritmos circadianos internos y los ciclos de 24 horas medioambientales (58).

En nuestra sociedad moderna (24 horas/7 días), la CD se produce por varias situaciones anteriormente comentadas como el jet-lag y el trabajo por turnos, pero también por otras como la contaminación lumínica nocturna o la realización de actividades lúdicas preferentemente durante la noche. En los últimos años, el efecto de la CD sobre la salud humana ha adquirido un papel relevante. La evidencia actual sugiere que la CD está estrechamente asociada con un aumento del riesgo de desarrollar ciertas enfermedades o el

empeoramiento de patologías preexistentes como el envejecimiento prematuro, el cáncer y enfermedades cardiovasculares.

- *Envejecimiento prematuro.* El funcionamiento del sistema circadiano se ve afectado por la edad. Se ha demostrado que en edades avanzadas los ritmos circadianos se caracterizan por poseer la fase anticipada, una amplitud reducida, un empeoramiento de la habilidad de resincronización después de un cambio horario así como una desincronización interna entre diferentes ritmos (59). Además, determinados estudios indican que la CD tiene un efecto directo sobre la aceleración del envejecimiento. Por ejemplo, se ha observado que un cambio de 6 horas/ semana en el ciclo luz-oscuridad en ratones envejecidos, produjo una reducción significativa en el periodo de vida de estos roedores. Es por ello que la interrupción de los ritmos circadianos parece reducir las expectativas de vida, mientras que su apropiado funcionamiento permite un aumento de la longevidad.

- *Cáncer.* Estudios realizados tanto en animales como humanos han documentado que una de las consecuencias de la CD es la iniciación y desarrollo de cáncer (60). De hecho, se ha estudiado en humanos una relación entre la CD y diagnóstico del cáncer. En pacientes con cáncer colorectal, el hecho de poseer ritmos bien marcados se asoció con una mejor calidad de vida, mejor respuesta a la quimioterapia y mayor supervivencia (61).

- *Enfermedad cardiovascular.* El patrón circadiano normal de presión sanguínea (dipper) se caracteriza por presentar los valores más bajos de presión arterial durante la noche, alcanzando un máximo por la mañana coincidiendo con la hora del despertar de los individuos. Así, hoy en día sabemos que el mejor indicador para predecir el riesgo de infarto de miocardio es la presencia de valores de presión sanguínea elevados durante la noche (62). De hecho, pacientes hipertensos que presentan una reducción normal de la presión sanguínea durante la noche presentan un riesgo de mortalidad cardiovascular similar a pacientes normotensos (63). Existen casos en los que los valores de presión sanguínea no se reducen por la noche todo lo esperado y son similares a los valores diurnos. Este patrón de presión sanguínea se denomina no-dipper. Se ha observado que este tipo de patrón es característico de trabajadores por turnos o personas ancianas que poseen una alteración de los ritmos circadianos.

- *Obesidad y SM.* Es bien conocido que uno de los efectos que tiene la CD sobre la salud humana es el desarrollo de obesidad y SM. Tal y como se ha comentado a lo largo de esta revisión, estudios epidemiológicos han mostrado que el trabajo por turnos, la privación del sueño y el cambio de horario de alimentación hacia horas nocturnas se asocian con un riesgo elevado de padecer obesidad y SM (64). Muchas de las funciones del sistema circadiano relacionadas con el metabolismo, como son la regulación metabólica de lípidos y glucosa, o la respuesta a la insulina, pueden verse perjudicadas por la CD, contribuyendo a la fisiopatología de la obesidad.

2.6 Causas de la cronodisrupcion

La cronodisrupción puede ser el resultado de alteraciones a diferentes niveles. Puede ocurrir por el empeoramiento de las entradas al oscilador central o sincronizadores, como son los ciclos de luz-oscuridad o los horarios de las comidas; fallos en el oscilador central (NSQ); o de las problemas en las salidas relacionadas con la melatonina y glucocorticoides.

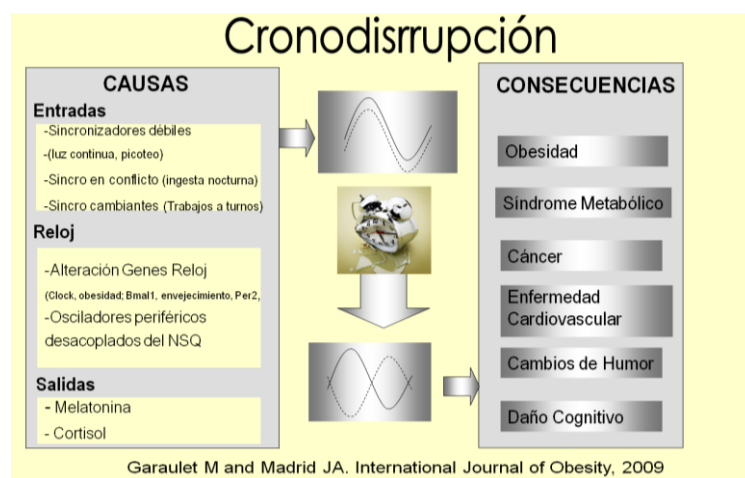


Figura 10. Cronodisrupción. Se ha observado que la interrupción de estos ritmos biológicos, lo que se conoce como cronodisrupción, se está asociando cada vez más a enfermedades de relevancia actual como la obesidad y el síndrome metabólico. El trabajo por turnos, la privación del sueño y la exposición a la luz brillante durante la noche se ha relacionado con el aumento de adiposidad y la prevalencia del síndrome metabólico.

- Entradas. Se ha observado que la deficiencia de luz o el hecho de presentar una intensidad y espectro de luz por debajo de los rangos óptimos pueden contribuir a la aparición de manifestaciones patológicas relacionadas con la CD (65). Los cambios en horarios de las comidas, considerado uno de los más importantes sincronizadores externos, es también un importante factor de CD. Por ejemplo, se ha visto que sujetos con un estilo de vida

nocturno, caracterizado por tomar la cena tarde y picotear durante la noche, presentan hiperglucemia y valores bajos de leptina y melatonina durante la noche (66). Actualmente el hecho de llevar un estilo de vida nocturno se considera uno de los principales riesgos para la salud de la sociedad moderna, además del síndrome de comedor nocturno, la obesidad y la diabetes.

- Oscilador central. La CD, propia de fenómenos como el jet-lag o el trabajo por turnos, se produce por diferencias en las tasas de sincronización de las distintas variables biológicas. De hecho, esta desincronización se produce como consecuencia de un desfase entre los ritmos del NSQ y los producidos por los tejidos periféricos. Pero la CD también se puede producir por una alteración de la maquinaria molecular del reloj central, como es el caso de la alteración en el gen *CLOCK* en ratones mutados que se asocia con obesidad, o por ejemplo alteraciones en el gen *BMAL1* que se han relacionado con envejecimiento, o en *PER2* asociadas con diversos cánceres y alteraciones psicológicas.

- Salidas. El tercer elemento que puede causar CD es la alteración de las salidas del sistema circadiano, que incluye, entre otras, a la anteriormente mencionada melatonina (67, 68). La melatonina se produce como respuesta a la acción simpática del NSQ. Además, es un conocido antioxidante que hace que se liberen radicales libres (69). La acción antioxidante de la melatonina se asocia con la inducción de la expresión/actividad de enzimas antioxidantes y con la mejora de la función de la cadena de transporte electrónico en la mitocondria (70,71). También se ha asociado a alteraciones relacionadas con la obesidad, actuando como una hormona protectora. De hecho, reduce la presión sanguínea y mejora el metabolismo de la glucosa (72).

3. CRONOBIOLOGIA y OBESIDAD

La vida es un fenómeno rítmico. Cuando estudiamos cualquier actividad vital en relación con el tiempo, siempre encontramos oscilaciones que indican claramente que estas actividades no se desarrollan de manera continua. Los ritmos circadianos (derivado de la

frase latina *circa diem*, aproximadamente un día) son una parte tan innata de nuestro comportamiento que escasamente nos detenemos a especular el motivo de su existencia (73).

Durante el siglo pasado, la vida ha cambiado radicalmente en los países industrializados y han emergido 3 tendencias coincidentes con impacto significativo sobre la sociedad y el sistema de asistencia médico: a) el alimento se ha hecho abundante, cada vez es más frecuente el consumo de “snacks” y la alimentación ha cambiado hacia el final del día, b) la reducción gradual del tiempo total diario de sueño junto el incremento de irregularidad interdiaria del sueño-vigilia y c) el aumento de la exposición a la luz brillante durante la noche, inhibiendo la secreción de melatonina (73).

En este contexto, un cuarto de los adultos del mundo tienen síndrome metabólico (SM). La causa subyacente del SM continúa desafiando a los expertos pero tanto la resistencia a la insulina como la obesidad son considerados factores significativos. La genética, la inactividad física, el envejecimiento, un estado proinflamatorio y cambios hormonales también pueden tener un efecto causal.

3.1 Cronobiología y obesidad: Evidencias clínicas de esta interesante relación.

3.1.1 Evidencias genéticas

La biología circadiana del tejido adiposo se ha evaluado en múltiples modelos de roedores que poseen mutación y/o deficiencia en algún gen. Por ejemplo, se ha observado que los ratones que presentan una mutación en el gen *CLOCK* se caracterizan por ser obesos y por no tener una biología circadiana rítmica, mientras que los ratones *Bmal1*-deficientes se caracterizan por presentar más cantidad de tejido adiposo que los que no poseen esta deficiencia. Sin embargo, existen estudios contradictorios en ratones que indican que *Bmal1* juega un papel importante en la regulación de la diferenciación del tejido adiposo, así como en la lipogénesis de adipocitos maduros (74). El estudio de Turek y cols. ha sido el primero en mostrar la interacción molecular entre los genes reloj y la obesidad (75). Este trabajo reveló que los ratones con el gen *CLOCK* mutado eran propensos al desarrollo de un fenotipo similar al SM. También se ha observado que la deficiencia de genes de adipocinas y receptores asociados a la obesidad como son la leptina y el receptor de melanocortina, da

lugar a ritmos circadianos defectuosos. Además, se ha demostrado que la interrupción del funcionamiento del reloj del tejido adiposo de ratones ob/ob (deficientes en leptina), ocasionó en estos animales una importante ganancia del peso corporal, hipertrofia adipocitaria y un aumento de triglicéridos y colesterol en mayor medida que los ratones que tan sólo poseían la deficiencia en leptina (76).

De acuerdo con estos descubrimientos, numerosos estudios epidemiológicos en humanos demuestran una importante asociación entre diversos polimorfismos de genes reloj con un aumento de la incidencia de obesidad y del SM (25-30). A partir de estudios de nuestro propio grupo y otros, podemos deducir que la presencia de algunos polimorfismos del gen *CLOCK* (rs3749474, rs4580704 y rs1801260 (3111T4C)), tiene un especial interés por asociarse con el índice de masa corporal (IMC), con la ingesta energética y con diferentes variables relacionadas con la obesidad (77,78,79,80). De hecho, nuestros resultados mostraron que los individuos portadores de las variantes génicas o polimorfismos, comían más, dormían menos, ingerían más grasa, y en definitiva estaban más obesos, presentando en particular una mayor obesidad abdominal, caracterizada por ser la de mayor riesgo metabólico. Algunas de estas asociaciones se pueden explicar funcionalmente, como es el caso del polimorfismo *CLOCK* rs3749474 que potencialmente da lugar a un cambio de estructura del ARNm que lo hace menos viable, y por tanto la expresión del gen pierde eficacia. Pero quizás de los resultados obtenidos, uno de los más interesantes fue que estas asociaciones entre el polimorfismo genético y obesidad abdominal o alteraciones del metabolismo de la glucosa sólo se demostraban en individuos practicando una alimentación desequilibrada, asociada con un consumo alto de grasas saturadas (bollería industrial, embutidos, etc.) y baja proporción de grasas monoinsaturadas (aceite de oliva). Sin embargo, el polimorfismo carecía de efecto en aquellos sujetos con un consumo en aceite de oliva (ácido oleico) superior a la media. En esta línea, también se han realizado estudios con otros genes reloj. Diversos trabajos han mostrado que la presencia de ciertos polimorfismos de gen *PER2* se asocia con diversas alteraciones psicológicas entre las que destacan: la depresión estacional y el trastorno bipolar (81). Esto nos hizo plantearnos si, en una muestra de pacientes que presentaban sobrepeso u obesidad, existirían alteraciones emocionales o psicológicas relacionadas con la obesidad y si estas alteraciones estarían asociadas a su vez

con polimorfismos en el gen PER2. Consistente con esta idea, nuestros resultados mostraron que aquellas personas portadoras de la variante génica en PER2 demostraron conductas, hábitos y emociones obesogénicas, con mayor frecuencia de abandono de tratamiento, picoteo, estrés por la dieta y consumo de alimentos como escape al aburrimiento (77).

3.1.2 Evidencias epidemiológicas

Existen otras muchas evidencias epidemiológicas de la relación existente entre obesidad y aspectos cronobiológicos. El trabajo por turnos es un factor de riesgo independiente en el desarrollo de obesidad y síndrome metabólico (82). La industrialización ha dado lugar a la extendida adopción de operaciones continuas de 24 horas en un elevado número de industrias. Esto ha causado un aumento en la proporción de la población que, rutinariamente desempeña un trabajo por turnos, llegando a ser dicha proporción mayor del 20 % de la población industrializada.

Estudios epidemiológicos muestran que el trabajo por turnos está asociado con la obesidad, hipertrigliceridemia, bajos valores de HDL, obesidad abdominal diabetes y enfermedad cardiovascular (83). Además, se observa que los trabajadores por turnos presentan un aumento de glucosa, insulina y triglicéridos como respuesta metabólica postprandial que deriva en una disrupción de la ritmicidad circadiana de los perfiles de melatonina (84).

Por otro lado, la ritmicidad circadiana de la función cardiovascular está firmemente establecida. Una larga historia de epidemiología clínica en humanos indica que el infarto de miocardio y las crisis de hipertensión alcanzan picos a ciertas horas durante el día (62).

Se han encontrado interesantes resultados relacionando duración del sueño y riesgo metabólico. Estudios clínicos muestran que sujetos saludables que restringen a 4 horas la duración del sueño durante 6 noches consecutivas muestran una alteración en la tolerancia a la glucosa y una disminución de la respuesta de la insulina que tiene como consecuencia un aumento de la glucosa (85).

Además las personas que duermen poco muestran reducidos significativamente los valores circulantes de la hormona anorexigénica Leptina y elevados los valores de la hormona

orexigénica Grelina (86). Esta situación es bastante importante en niños que tienen una duración del sueño corta, afectada por el día laboral, la estación, y ser poseedores de hermanos más jóvenes, y se ha descrito como un factor de riesgo independiente para la obesidad (85).

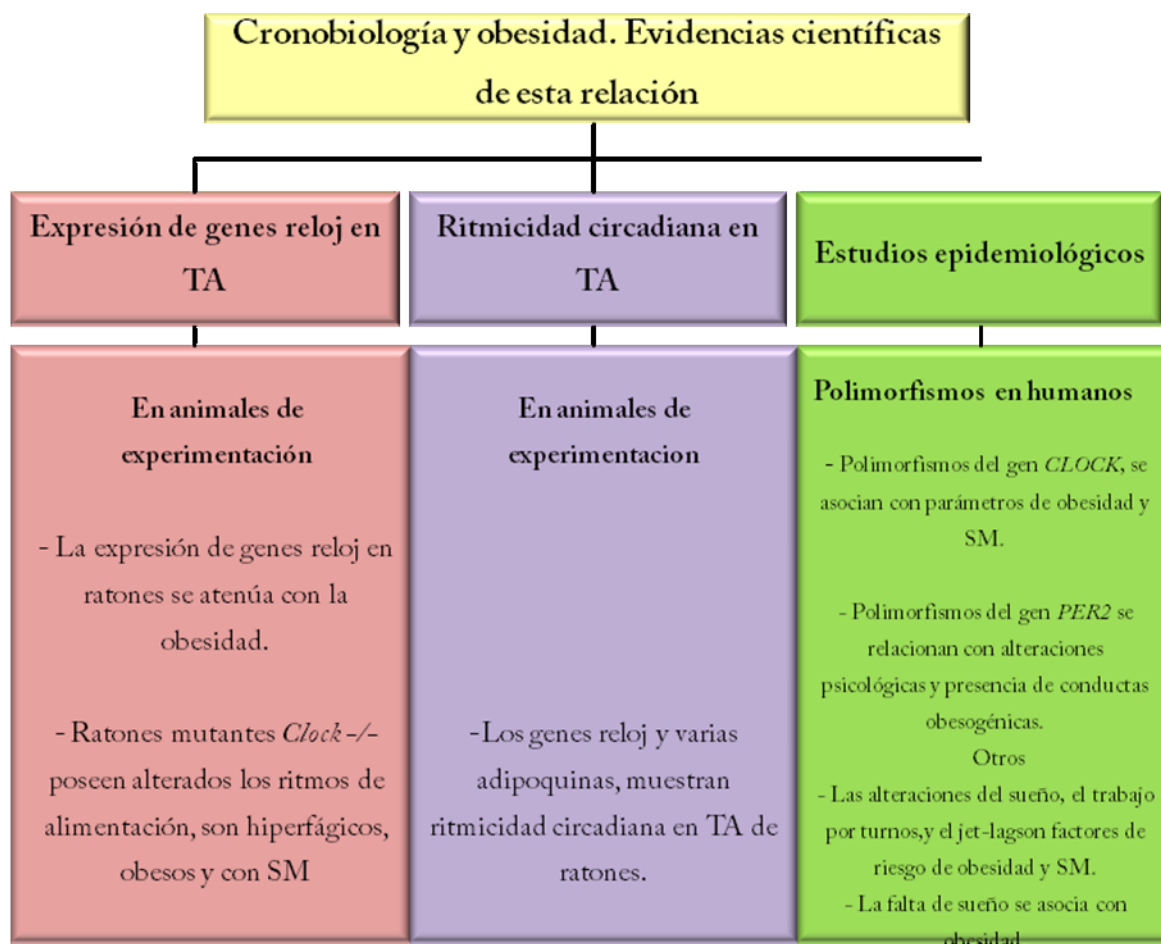


Figura 11. Evidencias científicas de la relación entre Cronobiología y obesidad. TA: tejido adiposo; SM: síndrome metabólico.

4. MARCADORES CIRCADIANOS EN OBESIDAD.

Por lo ya descrito y dada la importancia de un ritmo circadiano normal para mantener un normopeso, parece imprescindible la identificación de biomarcadores de la desregulación del sistema circadiano aplicables a la práctica clínica. Estos biomarcadores también podrían

ser utilizados como herramientas para controlar los efectos de cambios en el estilo de vida orientados a reducir el riesgo de obesidad (87,88).

Para este propósito sería conveniente utilizar técnicas que previamente hayan demostrado ser fáciles de medir y no invasivas, como por ejemplo: a) Diarios de sueño, que examinan los ciclos de vigilia/sueño y que han demostrado ser una herramienta útil para evaluar la calidad y duración del sueño (89); b) Diarios de alimentación, adecuados para analizar el momento y duración de la ingesta alimentaria (90); c) El cuestionario de Horne-Ostberg, para definir la matutinidad o vespertinidad del individuo (91,92,93); d) La melatonina y el cortisol salival, ya que ambos han sido definidos como indicadores fiables de CD (94,95); y por último e) La ritmicidad de la temperatura periférica a través de la muñeca, que ha demostrado ser un valioso indicador biológico interno y se ha asociado a diferentes características del Síndrome metabólico (96,97).

4.1 Melatonina

El órgano pineal es un componente fundamental del reloj biológico en todas las especies de vertebrados, capaz de producir y liberar melatonina, y que en algunas especies constituye el marcapasos circadiano principal (98).

La detección de la luminosidad por los ojos, y no la percepción de la luz que permite la visión, regulan el reloj biológico y la síntesis de melatonina, y utiliza sus propios fotorreceptores específicos en la retina. Estos fotorreceptores especializados transducen la señal luminosa en una señal eléctrica que se envía al núcleo supraquiasmático (NSQ), mediante largas proyecciones retinales localizadas en el nervio óptico. En la base del cerebro, estas fibras penetran en el NSQ, donde las señales apagan su actividad eléctrica, ocasionando que el NSQ se inactive, una vez reducida la actividad del NSQ, este no puede enviar ninguna señal a la glándula pineal, por lo que la pineal restringe la síntesis de melatonina (72,99).

Diferentes estudios realizados en animales de hibernación, muestran que se producen característicos cambios estacionales en las reservas de grasa dependientes del fotoperiodo a través de la liberación nocturna de melatonina. Esta capacidad de manipular el balance de energía a través del fotoperiodo de melatonina ofrece nuevas oportunidades para descubrir

nuevos mecanismos que participan en el control central de la homeostasis energética y la regulación del peso corporal (100).

Generalmente, las concentraciones de melatonina en sangre durante la noche, son 10 a 20 veces mayores que durante el día. Los valores plasmáticos de melatonina han demostrado ser unos excelentes marcadores biológicos de la desregulación circadiana y han sido relacionados con el trabajo por turnos, y en exposiciones a la luz durante la noche. Siendo un marcador de ritmo circadiano bastante robusto aun con la presencia de diversas influencias externas (101). Las concentraciones de melatonina salivares son similares a las plasmáticas y comparables en su ritmo circadiano, aunque en una menor concentración (102).

Debido al efecto de la glándula pineal sobre el eje hipofiso-adrenal, el estudio del perfil circadiano de melatonina parece ser particularmente importante en situaciones patológicas como la obesidad y el síndrome metabólico (103,104,105).

4.2 Cortisol

Otro importante indicador de la función del eje hipofiso-adrenal es el cortisol. La periodicidad de 24 horas en la secreción del dicho eje, se considera como un paradigma de la ritmicidad circadiana en humanos. Empieza a manifestarse a la edad de 6 meses y persiste en adultos hasta la ancianidad. Los perfiles diarios de cortisol plasmáticos son paralelos a los de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) y similares en ambos sexos. Este patrón muestra un máximo al principio de la mañana, una disminución a lo largo del día, a la que sigue un período nocturno de baja concentración (73).

El hecho de que el ritmo circadiano de cortisol tenga una gran reproductibilidad y amplitud, hace que se utilice frecuentemente como marcador del estado del marcapasos circadiano. La amplitud de la variación circadiana de cortisol, que se obtiene como la diferencia entre los valores de mañana y noche, han sido asociados previamente con la obesidad, en concreto con la obesidad abdominal (106). El cortisol también ha sido identificado como un marcador de la función neuroendocrina que puede estar influenciada por el estrés psicológico u otros factores (107,108).

4.3 Temperatura periférica

Entre las oscilaciones circadianas que sufre el organismo, una de las más importantes es el ritmo de temperatura corporal.

Durante el sueño dominan las influencias parasimpáticas que ocasionan una vasodilatación periférica, pero sobre todo, se ha comprobado que las anastomosis arteriovenosas cutáneas están abiertas, lo que determina un aumento en la temperatura de la piel. Esto a su vez facilita las pérdidas de calor, al aumentar la diferencia de temperatura entre la piel y el medio. Además, estas anastomosis reducen el intercambio de calor en contracorriente entre arterias y venas, lo que también hace que las pérdidas caloríficas aumenten. Todo ello hace que la temperatura central disminuya y la periférica aumente (109). Es decir, que durante el sueño la temperatura del núcleo corporal y la cutánea presentan oscilaciones opuestas en fase y precisamente la diferencia entre ambas es un indicador de las pérdidas caloríficas.

Pequeños cambios en la temperatura corporal, del orden de unas pocas décimas de grado, producen efectos diferentes. Las mismas regiones hipotalámicas que regulan la temperatura corporal tienen un papel fundamental en el inicio del sueño (110). Se ha comprobado que las neuronas de la región preóptica y el hipotálamo anterior responden fuertemente ante los aumentos de temperatura y, por otra parte, se considera que estas mismas neuronas son responsables del inicio del sueño (111). Por esta razón, se comprende que el aumento en la temperatura cutánea sea un factor de gran importancia en el inicio del sueño.

Debido a la gran estabilidad de su ritmo circadiano, la temperatura corporal periférica constituye un ritmo marcador muy utilizado, de esta forma nos permite conocer la presencia de algún tipo de alteración de la estructura temporal circadiana, ya que dichas alteraciones del sistema circadiano pueden tener importantes consecuencias biológicas (112).

Factores de comportamientos asociados con cronodisrupción (es decir, el trabajo por turnos, la privación del sueño, una exposición a la luz brillante durante la noche...) han sido descritos como contribuyentes al síndrome metabólico (73). Sin embargo, a pesar de este conocimiento, pocos estudios han examinado específicamente el ritmo circadiano de temperatura periférica en sujetos obesos y su implicación en el desarrollo del síndrome metabólico.

4.4 Patrones de comida y sueño

La vida cotidiana de cualquier individuo se caracteriza por un ritmo bien definido, que es determinado por el sistema circadiano (113). Para generar y organizar estos ritmos, el núcleo supraquiasmático (NSQ) requiere señales metabólicas cíclicas de exposición a la luz, la actividad, la ingesta de nutrientes y el sueño.

4.4.1 Patrones de comida.

Otro de los sincronizadores importantes de nuestros ritmos circadianos es la hora de la comida. Tendemos a realizar nuestras comidas a horas fijas. En España, desde principios del siglo pasado y fruto de una moda introducida por la alta sociedad, se suele comer al medio día mucho más tarde que en otros países europeos.

Aunque la entrada de luz es la señal principal del NSQ, la alimentación también influye sobre el sistema circadiano de los mamíferos. Cuando la disponibilidad de alimentos, se limita a cortos períodos de tiempo, muchos ritmos circadianos inciden en un desplazamiento de fase, para adaptar la fisiología del organismo a los horarios previstos de alimentación (114).

Recientes estudios han demostrado que la falta de un patrón regular en los horarios de comidas favorece la obesidad y el riesgo cardiovascular. Sabemos que es importante lo que se come, pero también seguir una cierta regularidad de comidas (98,115).

El horario regular de comidas no hay duda que ayuda al mantenimiento de una estructura temporal estable y ordenada; sin embargo cada vez es más frecuente, en la sociedad de 24 horas en la que vivimos (116), la alteración de dichos patrones de alimentación y ello no sólo como consecuencia de los turnos de trabajo, sino que también ocurre, sobre todo en los jóvenes, como resultado de los horarios de estudio, ocio y diversión, se observa una tendencia entre los jóvenes a saltarse comidas y a ingerir alimentos en horas nocturnas. Es llamativo el hecho de que muchos pacientes obesos no desayunan prácticamente nada, y hacen sólo una comida al día, muy densa (117).

Y es que se sabe que las irregularidades en horarios de trabajo y de alimentación provocan un frecuente abuso de los platos pre-cocinados, de la comida rápida y el picoteo entre horas,

lo que conlleva problemas de exceso de peso, hipertensión y dislipidemias (118). Estos malos hábitos en la alimentación, acompañados de los cambios continuos en los horarios de sueño, provocan cambios de humor, irritabilidad, cansancio, y además favorecen la aparición de alteraciones intestinales y malas digestiones. Muchos de estos problemas pueden tener solución intentando alimentarse de la forma más ordenada posible.

También se ha estudiado en humanos los ritmos de selección de alimentos. Con independencia de las recomendaciones que proponen como dieta saludable, aquella en la que la ingesta calórica se distribuye aproximadamente en un 55-60% en forma de carbohidratos, un 10-12% proteína y un 30-35% grasa, los diferentes nutrientes tienden a ser ingeridos en proporciones distintas según el momento del día (98). Teniendo en cuenta que conforme nos acercamos a la hora de dormir la tolerancia a la glucosa empeora y el tránsito intestinal se enlentece, parece lógico pensar que la cena no debería ser abundante ni excesivamente rica en carbohidratos simples. Por otro lado, durante el desayuno, sabemos que los carbohidratos se procesan mejor y que conviene aportar una suficiente cantidad en forma proteica con el fin de conseguir lo antes posible un estado de alerta que rompa con la inercia de sueño (119).

Por otro lado, es bien conocido el papel de las hormonas sobre el comportamiento alimentario. La evidencia experimental demuestra que alterar los valores hormonales o lesionar determinados centros neuronales modifica substancialmente el comportamiento alimentario (120). Recientemente se ha evaluado el papel de la leptina como mediador en el control de la conducta alimentaria. La leptina actúa mediante receptores hipotalámicos provocando inhibición de la conducta alimentaria, descenso del peso corporal y un incremento de la actividad motora y la termogénesis (121). El incremento de la leptina plasmática durante la noche puede tener el significado de actuar como hormona de la saciedad, favoreciendo el período de ayuno y descanso nocturno. La obesidad se correlaciona no sólo con elevados valores medios de leptina sino también con una reducción en la amplitud del ritmo y una atenuación de su pulsatibilidad. Mostrando la obesidad con predominio androide menores amplitudes del ritmo de leptina que la obesidad ginoide.

En definitiva, la alimentación, es junto con la luz, el sincronizador externo más importante de los ritmos circadianos de nuestro organismo. Si picamos continuamente o alteramos los

ritmos de comidas, la información que recibe el organismo es confusa, y los ritmos circadianos internos se alteran hacia un aplanamiento de estos ritmos, produciendo cambios importantes en nuestro metabolismo, nuestra ingesta y finalmente el acumulo de peso.

4.4.2 *Patrones de sueño*

Gracias a la cronobiología sabemos que los ritmos circadianos propios de la fisiología del individuo se regulan básicamente por dos factores externos de gran importancia: la luz y la ingesta (98). En este sentido, los horarios de sueño y de comida van a ser cruciales para que el organismo funcione adecuadamente, no sólo en el adulto sino también en el niño.

Las causas de la epidemia de la obesidad, no se explican únicamente por cambios en el estilo de vida tradicional o una disminución de la actividad física, muchos otros factores han sido identificados como contribuidores a esta epidemia, entre ellas un acortamiento de las horas totales de sueño (122). Estudios recientes muestran que las alteraciones en el tiempo de sueño (86,123) y duración del mismo (124,125), pueden influir en diversos aspectos relacionados con la obesidad y una privación parcial del sueño ha sido demostrado que tiene efectos perjudiciales sobre la función endocrina.

Los horarios de sueño han ido variando a lo largo de los últimos años, cada vez dormimos menos. Así, en los años 90 del siglo XX se dormía una media de 8 a 9 horas diarias, mientras que cinco años después, en 1995, la población media europea dormía sólo 7 horas/día. La situación es cada vez más preocupante ya que estudios recientes muestran que en general se duerme una media de 6 horas diarias, mientras que el 30% de los adultos entre los 30 y los 64 años de edad duermen menos de 6 horas (126).

El español también duerme poco: el 57% no alcanza las siete horas diarias, un mínimo indispensable. “Solemos salir tarde de trabajar, cenamos aún más tarde y nos acostamos entre las doce de la noche y la una de la madrugada. No obstante, al día siguiente nos levantamos a la misma hora que el resto de europeos”.

Si nos referimos al niño y al adolescente, sabemos que la necesidad fisiológica de sueño entre los 10 y 17 años de edad es de 9 horas/día y no varía entre estas edades. Aún así, un estudio realizado por la “Fundación Nacional del Sueño de EEUU” (127) en una muestra

representativa de niños y adolescentes, indica que en estos momentos la duración media del sueño es generalmente inferior a 9 horas en los niños, siendo de 8 horas a las edades de 11-12 años y de 7 horas/día en chicos/as de 17-18 años.

Recientemente Eve van Cauter y Kristen Knutson (85) han explicado en su trabajo titulado “Sueño y la epidemia de obesidad en niños y adultos” que la falta de sueño puede afectar al balance energético y como resultado influir en la ganancia de peso. Los autores indican que este hecho sucede mediante tres mecanismos diferentes: a) por el aumento del apetito; b) porque se tiene más tiempo para comer y c) porque la falta de sueño da lugar a una disminución del gasto energético (figura falta de sueño). Además, estos autores describen que el aumento de peso puede resultar en una resistencia a la insulina, condición que promueve una mayor adiposidad.

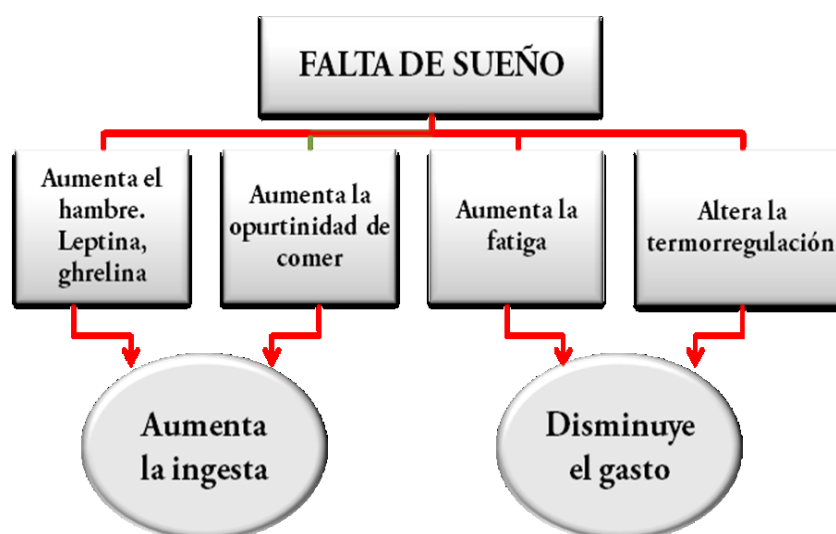


Figura 12. Esquema de las supuestas vías que hacen que la falta de sueño produzca obesidad, al aumentar la ingesta y disminuir el gasto energético

El insomnio, es el trastorno de sueño más común en la población, despertarse varias veces durante la noche es uno de los síntomas de insomnio más común. Estudios previos muestran que entre el 25-35% de las personas se despiertan al menos durante 3 noches a la semana (128). Sin embargo, aun teniendo una gran prevalencia, la importancia clínica de este síntoma no ha sido examinada cuidadosamente, pudiendo tener esta alteración una relación importante con la obesidad y variables del síndrome metabólico (129,130).

Y es que dormir pocas horas produce importantes cambios en ciertos péptidos implicados en el control de la ingesta que dan lugar a un aumento de apetito. Concretamente estos cambios se producen en la leptina, que es una hormona que actúa como señal inhibidora de apetito y en la ghrelina que hace la acción contraria y es estimulante del hambre (86).

Patel y Hu (131), han demostrado recientemente que la asociación entre la falta de sueño y riesgo de obesidad es mucho mayor en niños que en adultos, y también superior entre los jóvenes que en las personas de mayor edad.

En niños y adolescentes se han mostrado resultados semejantes a los encontrados en adultos. Así, un trabajo reciente en el que se examinó a duración del sueño, el gasto energético basal y los valores de leptina mostró, tal y como se ha explicado en adultos, una disminución de los valores de leptina, lo que conlleva un mayor apetito y además un gasto energético menor (132). De hecho, los niños que dormían poco, aun haciendo la misma actividad diaria, quemaban menos calorías, lo que seguramente influía en el aumento de peso.

Otro tipo de sustancias implicadas en que se coma más entre aquellos individuos que duermen menos son las orexinas. Estas sustancias que se encuentran en el cerebro aumentan el apetito y además se relacionan con el estado de vigilia y de alerta. Las orexinas parecen actuar de intermediarias entre el estado de alerta y de apetito (133). Son por tanto factores excitantes, que estimulan el sistema simpático y promueven la actividad de neuronas estimulantes del apetito. Y es que el sólo hecho de alimentarse requiere que estemos despiertos.

REFERENCIAS

1. Pi-Sunyer FX. Obesity: criteria and classification. *Proc Nutr Soc.* 2000, 59(4):505-9.
2. Consensus for the evaluation of overweight and obesity and the establishment of therapeutic intervention criteria]. Salas-Salvadó J, Rubio MA, Barbany M, Moreno B; Grupo Colaborativo de la SEEDO. *Med Clin (Barc).* 2007 Feb 10;128(5):184-96.

3. Bray GA, Bouchard C & James WPT 1998. Definitions and proposed current classification of obesity. Handbook of obesity (ed. Bray, GA, Bouchard, C & James WPT), Marcel Dekker, New York.
4. Moreno B, cancer E & Garrido M (1999). Concepto y clasificacion de obesidad. Obesidad: la epidemia del siglo XXI (ed. Moreno B, Monedero S & Álvarez J), Roche.
5. National Institutes of Health. National Heart, Lung, and Blood Institute. Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults. The evidence report. Bethesda: National Heart, Lung, and Blood Institute. 1998; 1-228. Disponible en: www.nhlbi.nih.gov/nhlbi/nhlbi.htm
6. Fernández-Real JM, Vayreda M, Casamitjana R, Saez M, Ricart W. Índice de masa corporal (IMC) y porcentaje de masa grasa. Med Clin (Barc). 2001; 117: 681-684.
7. Deurenberg P, Yap M, Van Staveren WA. Body mass index and percent body fat: a meta analysis among different ethnic groups. Int J Obes Relat Metab Disord. 1998; 22: 1164-1171.
8. Pouliot MC, Despres JP, Lemieux S, Moorjani S, Bouchard C, Tremblay A, et al. Waist circumference and abdominal sagittal diameter: best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women. Am J Cardiol. 1994; 73: 460-468.
9. Vague J. Presse Med. 1947 May 24;55(30):339.
10. Recio-Rodriguez JI, Gomez-Marcos MA, Patino-Alonso MC, Agudo-Conde C, Rodriguez-Sanchez E, Garcia-Ortiz L, Vg VG. Abdominal obesity vs general obesity for identifying arterial stiffness, subclinical atherosclerosis and wave reflection in healthy, diabetics and hypertensive. BMC Cardiovasc Disord. 2012 Feb 1;12(1):3.
11. Vague J. The degree of masculine differentiation of obesities, a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and acid calculous disease. Am J Clin Nutr. 1956; 4: 20-34.
12. Montague CT, O'Rahilly S. The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity. Diabetes. 2000; 49: 883-888.
13. Pérusse L, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Rankinen T, Snyder E, Sands J, Bouchard C. The human obesity gene map: the 2000 update. Obes Res. 2001 Feb;9(2):135-69.
14. Bray G, Bouchard C. Genetics of human obesity: research directions. FASEB J. 1997 Oct;11(12):937-45.

15. Schwartz MW, Kahn SE. Insulin resistance and obesity. *Nature*. 1999 Dec 23-30;402(6764):860-1.
16. Varo JJ, Martínez-González MA, Martínez JA [Obesity prevalence in Europe]. *An Sist Sanit Navar*. 2002;25 Suppl 1:103-8.
17. Garaulet M, Pérez de Heredia F. Behavioural therapy in the treatment of obesity (II): role of the Mediterranean diet. *Nutr Hosp*. 2010 Jan-Feb;25(1):9-17.
18. Curti ML, Jacob P, Borges MC, Rogero MM, Ferreira SR Studies of gene variants related to inflammation, oxidative stress, dyslipidemia, and obesity: implications for a nutrigenetic approach. *J Obes*. 2011;2011:497401.
19. Camastra S, Bonora E, Del Prato S, Rett K, Weck M, Ferrannini E. Effect of obesity and insulin resistance on resting and glucose-induced thermogenesis in man. EGIR (European Group for the Study of Insulin Resistance). *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1999 Dec;23(12):1307-13.
20. Ravussin E, Gautier JF. Metabolic predictors of weight gain. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1999 Feb;23 Suppl 1:37-41.
21. Orth DN. Cushing's syndrome. *N Engl J Med*. 1995 Mar 23;332(12):791-803. Review.
22. Franks S, Kiddy D, Sharp P, Singh A, Reed M, Seppälä M, Koistinen R, Hamilton-Fairley D. Obesity and polycystic ovary syndrome. *Ann N Y Acad Sci*. 1991;626:201-6.
23. Scacchi M, Pincelli AI, Cavagnini F. Growth hormone in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1999 Mar;23(3):260-71.
24. Forbes GB, Porta CR, Herr BE, Griggs RC. Sequence of changes in body composition induced by testosterone and reversal of changes after drug is stopped. *JAMA*. 1992 Jan 15;267(3):397-9.
25. Jebb SA. Aetiology of obesity. *Br Med Bull*. 1997;53(2):264-85.
26. Coakley EH, Kawachi I, Manson JE, Speizer FE, Willet WC, Colditz GA. Lower levels of physical functioning are associated with higher body weight among middle-aged and older women. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1998 Oct;22(10):958-65.
27. Bray GA, Popkin BM Dietary fat intake does affect obesity! *Am J Clin Nutr*. 1998 Dec;68(6):1157-73.
28. Willett WC. The great fat debate: total fat and health. *J Am Diet Assoc*. 2011 May;111(5):660-2.

29. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000 Apr 6;404(6778):635-43.
30. Poppitt SD, Swann DL Dietary manipulation and energy compensation: does the intermittent use of low-fat items in the diet reduce total energy intake in free-feeding lean men? *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1998 Oct;22(10):1024-31
31. Ford PB, Dzewaltowski DA. Disparities in obesity prevalence due to variation in the retail food environment: three testable hypotheses. *Nutr Rev*. 2008; 66: 216-28.
32. Kamphuis CB, Giskes K, de Bruijn GJ, Wendel-Vos W, Brug J, van Lenthe FJ. Environmental determinants of fruit and vegetable consumption among adults: a systematic review. *Br J Nutr*. 2006; 96: 620-35.
33. Consenso FESNAD-SEEDO. Recomendaciones nutricionales basadas en la evidencia para la prevención y el tratamiento del sobrepeso y la obesidad en adultos *Revista española de obesidad*. Vol. 10 • Suplemento 1 • Octubre 2011
34. Jeffery RW, French SA. Epidemic obesity in the United States: are fast foods and television viewing contributing? *Am J Public Health*. 1998; 88 (2): 277-80.
35. Pereira MA, Kartashov AI, Ebbeling CB, Van Horn L, Slattery ML, Jacobs DR Jr, Ludwig DS. Fast-food habits, weight gain and insulin resistance (the CARDIA study): 15-year prospective analysis. *Lancet*. 2005; 365: 36-42.
36. Schusdziarra V, Hausmann M, Wittke C, Mittermeier J, Kellner M, Naumann A, Wagenpfeil S, Erdmann J. Impact of breakfast on daily energy intake--an analysis of absolute versus relative breakfast calories. *Nutr J*. 2011; 10: 5.
37. Nicklas TA, Myers L, Reger C, Beech B, Berenson GS. Impact of breakfast consumption on nutritional adequacy of the diets of young adults in Bogalusa, Louisiana: ethnic and gender contrasts. *J Am Diet Assoc*. 1998; 98: 1432-8.
38. De Castro JM. The time of day of food intake influences overall intake in humans. *J Nutr*. 2004; 134: 104-11.
39. De Castro JM. The time of day and the proportions of macronutrients eaten are related to total daily food intake. *Br J Nutr*. 2007; 98: 1077-83.
40. Pérez-Cueto FJ, Verbeke W, de Barcellos MD, Kehagia O, Chryssochoidis G, Scholderer J, et al. Food-related lifestyles and their association to obesity in five European countries. *Appetite*. 2010; 54: 156-62.

41. Sánchez-Villegas A, Martínez-González MA, Toledo E, de Irala-Estévez J, Martínez JA; Equipo investigador del Proyecto SUN. Influencia del sedentarismo y el hábito de comer entre horas sobre la ganancia de peso. *Med Clin (Barc)*. 2002; 119: 46-52.
42. Marín-Guerrero AC, Gutiérrez-Fisac JL, Guallar-Castillón P, Banegas JR, Rodríguez-Artalejo F. Eating behaviours and obesity in the adult population of Spain. *Br J Nutr*. 2008; 100: 1142-8.
43. Dwyer JT, Evans M, Stone EJ, Feldman HA, Lytle L, Hoelscher D, et al. Adolescents' eating patterns influence their nutrient intakes. *J Am Diet Assoc*. 2001; 101: 798-802.
44. Howarth NC, Huang TT, Roberts SB, Lin BH, McCrory MA. Eating patterns and dietary composition in relation to BMI in younger and older adults. *Int J Obes (Lond)*. 2007; 31: 675-84.
45. Kerver JM, Yang EJ, Obayashi S, Bianchi L, Song WO. Meal and snack patterns are associated with dietary intake of energy and nutrients in US adults. *J Am Diet Assoc*. 2006; 106: 46-53.
46. Garaulet M, Martínez A, Victoria F, Pérez-Llamas F, Ortega RM, Zamora S. Difference in dietary intake and activity level between normal-weight and overweight or obese adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000 Mar;30(3):253-8.
47. Vicente-Rodríguez G, Rey-López JP, Martín-Matillas M, Moreno LA, Wärnberg J, Redondo C, Tercedor P, Delgado M, Marcos A, Castillo M, Bueno M; Television watching, videogames, and excess of body fat in Spanish adolescents: the AVENA study. AVENA Study Group. *Nutrition*. 2008 Jul-Aug;24(7-8):654-62.
48. Corbalán MD, Morales EM, Canteras M, Espallardo A, Hernández T, Garaulet M. Effectiveness of cognitive-behavioral therapy based on the Mediterranean diet for the treatment of obesity. *Nutrition*. 2009 Jul-Aug;25(7-8):861-9.
49. Williamson DF. Intentional weight loss: patterns in the general population and its association with morbidity and mortality. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1997 Mar;21 Suppl 1:S14-9; discussion S20-1.
50. Vitaterna MH, Takahashi JS, Turek FW. Overview of circadian rhythms. *Alcohol Res Health*. 2001;25(2):85-93.
51. Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*. 2002 Aug 29;418(6901):935-41.

52. Minors DS, Waterhouse JM. Mathematical and statistical analysis of circadian rhythms. *Psychoneuroendocrinology*. 1988;13(6):443-64.
53. Weaver DR. The suprachiasmatic nucleus: a 25-year retrospective. *J Biol Rhythms*. 1998 Apr;13(2):100-12.
54. Kennaway DJ. Resetting the suprachiasmatic nucleus *CLOCK*. *Front Biosci*. 2004 Jan 1;9:56-62.
55. Rusak B. The mammalian circadian system: models and physiology. *J Biol Rhythms*. 1989 Summer;4(2):121-34.
56. Gradisar M, Lack L. Relationships between the circadian rhythms of finger temperature, core temperature, sleep latency, and subjective sleepiness. *J Biol Rhythms*. 2004 Apr;19(2):157-63.
57. Klerman EB, Lee Y, Czeisler CA, Kronauer RE. Linear demasking techniques are unreliable for estimating the circadian phase of ambulatory temperature data. *J Biol Rhythms*. 1999 Aug;14(4):260-74. Erratum in: *J Biol Rhythms* 1999 Oct;14(5):420.
58. Erren TC, Reiter RJ. Defining chronodisruption. *J Pineal Res*. 2009;46:245-247.
59. Hofman MA, Swaab DF. Living by the *CLOCK*: the circadian pacemaker in older people. *Ageing Res Rev*. 2006;5:33-51.
60. Erren TC, Reiter RJ. A generalized theory of carcinogenesis due to chronodisruption. *Neuro Endocrinol Lett* 2008;29:815-821.
61. Mormont MC, Waterhouse J, Bleuzen P, Giacchetti S, Jami A, Bogdan A et al. Marked 24-h rest-activity rhythms are associated with better quality of life, better response and longer survival in patients with metastatic colorectal cancer and good performance status. *Clin Cancer Res* 2000;6:3038-45
62. Staessen JA, Fagard R, Thijs L, Celis H, Arabidze GG, Birkenhäger WH, et al. Randomised double-blind comparison of placebo and active treatment for older patients with isolated systolic hypertension. The Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) Trial Investigators. *Lancet*. 1997;350:757-764.
63. Ohkubo T, Hozawa A, Yamaguchi J, Kikuya M, Ohmori K, Michimata M, et al. Prognostic significance of the nocturnal decline in blood pressure in individuals with and without high 24-h blood pressure: the Ohasama study. *J Hypertens*. 2002;20:2183-2189.

64. Garaulet M, Madrid JA. Chronobiology, genetics and metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol*. 2009;20(2):127-34. Review.
65. Turner PL, Van Someren EJ, Mainster MA. The role of environmental light in sleep and health: Effects of ocular aging and cataract surgery. *Sleep Med Rev*. 2010;14(4):269-80.
66. Quin LQ, Li J, Wang Y, Wang J, Xu JY, Kaneko T. The effects of nocturnal life on endocrine circadian pattern in healthy subjects. *Life Sci*. 2003;73:2467-75.
67. Maywood ES, O'Neill JS, Reddy AB, Chesham JE, Prosser HM, Kyriacou CP, et al. Genetic and molecular analysis of the central and peripheral circadian *CLOCK*work of mice. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2007;72:85-94. Review.
68. Garbarino-Pico E, Green CB. Posttranscriptional regulation of mammalian circadian *CLOCK* output. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2007;72:145-56. Review.
69. Korkmaz A, Topal T, Tan DX, Reiter RJ. Role of melatonin in metabolic regulation. *Rev Endocr Metab Disord*. 2009;10(4):261-70. Review.
70. Leon J, Acuña-Castroviejo D, Escames G, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J Pineal Res*. 2005;38:1-9.
71. Hardeland R, Coto-Montes A, Poeggeler B. Circadian rhythms, oxidative stress, and antioxidant defense mechanisms. *Chronobiol Int*. 2003;20:921-962.
72. Sartori C, Dessen P, Mathieu C, Monney A, Bloch J, Nicod P, et al. Melatonin improves glucose homeostasis and endothelial vascular function in high-fat diet-fed insulin-resistant mice. *Endocrinology*. 2009;150(12):5311-7.
73. Garaulet M, Gómez-Abellán P, Madrid JA. Chronobiology and obesity: the orchestra out of tune. *Clin Lipidology*. 2010;5(2):181-188.
74. Shimba S, Ishii N, Ohta Y, Ohno T, Watabe Y, Hayashi M, et al. Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), a component of the molecular *CLOCK*, regulates adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(34):12071-6.
75. Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, et al. Obesity and metabolic syndrome in circadian *CLOCK* mutant mice. *Science*. 2005;308:1043-1045.
76. Kohsaka A, Bass J. A sense of time: how molecular *CLOCKS* organize metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2007;18:4-11.

77. Garaulet M, Corbalán MD, Madrid JA, Morales E, Baraza JC, Lee YC, et al. *CLOCK* gene is implicated in weight reduction in obese patients participating in a dietary programme based in Mediterranean Diet. *Int J Obes (Lond)*. 2010;34:516-523.
78. Scott EM, Carter AM, Grant PJ. Association between polymorphisms in the *CLOCK* gene, obesity and the metabolic syndrome in man. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32:658-662.
79. Woon PY, Kaisaki PJ, Braganc-a J, Bihoreau MT, Levy JC, Farrall M, et al. Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (BMAL1) is associated with susceptibility to hypertension and type 2 diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:14412-14417.
80. Garaulet M, Lee YC, Shen J, Parnell LD, Arnett DK, Tsai MY, et al. Genetic variants in human *CLOCK* associate with total energy intake and cytokine sleep factors in overweight subjects (GOLDN population). *Eur J Hum Genet*. 2010;18:364-369.
81. Partonen T, Treutlein J, Alpmann A, Frank J, Johansson C, Depner M, et al. Three circadian *CLOCK* genes *Per2*, *Arntl*, and *Npas2* contribute to winter depression. *Ann Med*. 2007;39:229-238.
82. Croce N, Bracci M, Ceccarelli G, Barbadoro P, Prospero E, Santarellia L. Body mass index in shift workers: relation to diet and physical activity. *G Ital Med Lav Ergon*. 2007;29:488-489.
83. Karlsson B, Knutsson A, Lindahl B. Is there an association between shift work and having a metabolic syndrome? Results from a population based study of 27,485 people. *Occup Environ Med*. 2001;58:747-752.
84. Lund J, Arendt J, Hampton SM, English J, Morgan LM. Postprandial hormone and metabolic responses amongst shift workers in Antarctica. *J Endocrinol*. 2001;171:557-564.
85. Van Cauter E, Knutson K. Sleep and the epidemic of obesity in children and adults. *Eur J Endocrinol* 2008;159(1):S59-66.
86. Taheri S, Lin L, Austin D, Young T, Mignot E. Short sleep duration is associated with reduced leptin, elevated ghrelin, and increased body mass index. *PLoS Med*. 2004;1:e62.
87. Ko CH, Takahashi JS. Molecular components of the mammalian circadian *CLOCK*. *Hum Mol Genet* 2006; 15:271-277.
88. Barness LA, Opitz JM, Gilbert-Barness E. Obesity: genetic, molecular, and environmental aspects. *Am J Med Genet A* 2007;143A:3016-3034.

89. Naismith SL, Rogers NL, Mackenzie J, Hickie IB, Lewis SJ. The relationship between actigraphically defined sleep disturbance and REM sleep behaviour disorder in Parkinson's Disease. *Clin Neurol Neurosurg* 2010;112(5):420-3.
90. Baron KG, Reid KJ, Kern AS, Zee PC. Role of sleep timing in caloric intake and BMI. *Obesity* 2011;19:1374-81.
91. Eisenmann JC, Ekkekakis P, Holmes M. Sleep duration and overweight among Australian children and adolescents. *Acta Paediatrica* 2006;95:956–963.
92. Snell EK, Adam EK, Duncan GJ. Sleep and the Body Mass Index and overweight status of children and adolescents. *Child Development* 2007;78:309–323.
93. Urbán R, Magyaródi T, Rigó A. Morningness-eveningness, chronotypes and health-impairing behaviors in adolescents. *Chronobiol Int* 2011;28:238-47.
94. Balbo M, Leproult R, Van Cauter E. Impact of Sleep and Its Disturbances on Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis Activity. *Int J Endocrinol* 2010;2010:759234.
95. Erren TC, Reiter RJ. Axelrod, the pineal and the melatonin hypothesis: lessons of 50 years to shape chronodisruption research. *Neuro Endocrinol Lett* 2010;31(5):585-7.
96. Cornelissen G, Gubin D, Halberg F, Milano G, Halberg F. Chronomedical aspects of oncology and geriatrics. *In Vivo* 1999;13:77–82.
97. Halberg F, Cornélissen G, Ulmer W, Blank M, Hrushesky W, Wood P, Singh, RK, Wang Z. Cancer chronomics III. Chronomics for cancer, aging, melatonin and experimental therapeutics researchers. *J Exp Ther Oncol* 2006;6:73–84.
98. Garaulet M, Madrid JA. Chronobiological Aspects of Nutrition, Metabolic Syndrome and Obesity. *Adv Drug Deliv Rev* 2010;62(9-10):967-78.
99. Feillet CA, Albrecht U, Challet E. “Feeding time” for the brain: a matter of *CLOCKs*. *J. Physiol* 2006;100(5–6):252–260.
100. Barrenetxe J, Delagrangé P, Martínez JA. Physiological and metabolic functions of melatonin. *J Physiol Biochem* 2004;60:61-72.
101. Mirick DK, Davis S. Melatonin as a Biomarker of Circadian Dysregulation. *Cancer Epidemiol Biomarkers* 2008;17:3306–13.
102. Arendt J, Bojkowski C, Franey C, Wright J, Marks V. Immunoassay of 6-hydroxymelatonin sulfate in human plasma and urine: abolition of the urinary 24-hour rhythm with atenolol. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 1985;60:1166–1173.

103. Benloucif S, Burgess HJ, Klerman EB, Lewy AJ, Middleton B, Murphy PJ, Parry BL, Revell VL. Measuring melatonin in humans. *J Clin Sleep Med* 2008; 4:66-9
104. Ferrari E, Magri F. Role of neuroendocrine pathways in cognitive decline during aging. *Ageing Res Rev* 2008;7:225-33.
105. Vicennati V, Pasqui F, Cavazza C, Pagotto U, Pasquali R. Stress-related development of obesity and cortisol in women. *Obesity* 2009;17:1678-83.
106. García-Prieto MD, Tébar FJ, Nicolás F, Larqué E, Zamora S, Garaulet M. Cortisol secretory pattern and glucocorticoid feedback sensitivity in women from a Mediterranean area: relationship with anthropometric characteristics, dietary intake and plasma fatty acid profile. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007;66:185-91.
107. Wüst S, Wolf J, Hellhammer DH, Federenko I, Schommer N, Kirschbaum C. The cortisol awakening response normal values and confounds. *Noise Health* 2000;7:77-85.
108. Steptoe A, Kunz-Ebrecht SR, Brydon L, Wardle J. Central adiposity and Cortisol responses to waking in middle-aged men and women. *International Journal of Obesity* 2004;28:1168-1173
109. Monk TH, Buysse DJ, Reynolds CF 3rd, Kupfer DJ, Houck PR. Circadian temperature rhythms of older people. *Exp Gerontol.* 1995 Sep-Oct;30(5):455-74.
110. Van Someren EJW. (2000a). More than a marker: interaction between the circadian regulation of temperature and sleep, age-related changes, and treatment possibilities. *Chronobiol. Int.* 17:313-54.
111. Van Someren EJW (2006c) Mechanisms and functions of coupling between sleep and temperature rhythms. *Prog Brain Res.* 153:309.
112. Marcheva B, Ramsey KM, Affinati A, Bass JJ. (2009). *CLOCK* genes and metabolic disease. *Appl. Physiol.* 107:1638-46.
113. Moore-Ede, M.C., & Sulzman, F.M. (1981). Internal temporal Order. In *Biological Rhythms*. Asschoff J (Ed). *Handbook of Behavioral Neurobiology* (pp. 215-241). New York.
114. Lax, P., Zamora, S., & Madrid, J.A. (1998). Coupling effect of locomotor activity on the rat's circadian system. *American Journal of Physiology*, 275, 580-58.
115. Garaulet M, Ordovás JM, Madrid JA. The chronobiology, etiology and pathophysiology of obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2010 Dec;34(12):1667-83. Epub 2010 Jun 22.

116. Mistlberger RE. Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev.* 1994 Summer;18(2):171-95.
117. Wyatt HR, Grunwald GK, Mosca CL, Klem ML, Wing RR, Hill JO. Long-term weight loss and breakfast in subjects in the National Weight. Control Registry. *Obes Res.* 2002; 10: 78-82.
118. Gilhooly CH, Das SK, Golden JK, McCrory MA, Dallal GE, Saltzman E, Kramer FM, Roberts SB. Food cravings and energy regulation: the characteristics of craved foods and their relationship with eating behaviours and weight change during 6 months of dietary energy restriction. *Int J Obes (Lond).* 2007; 31: 1849-58.
119. Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schütz G, Schibler U. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science.* 2000 Sep 29;289(5488):2344-7.
120. Krieger DT, Hauser H, Krey LC. Suprachiasmatic nuclear lesions do not abolish food-shifted circadian adrenal and temperature rhythmicity. *Science.* 1977 Jul 22;197(4301):398-9.
121. Garaulet M, Ordovás JM, Gómez-Abellán P, Martínez JA, Madrid JA. An approximation to the temporal order in endogenous circadian rhythms of genes implicated in human adipose tissue metabolism. *J Cell Physiol.* 2011 Aug;226(8):2075-80
122. Keith, S.W., Redden, D.T., Katzmarzyk, P.T., Boggiano, M.M., Hanlon, E.C., Benca, R.M., Ruden, D., Pietrobelli, A., Barger, J.L., Fontaine, K.R., Wang, C., Aronne, L.J., Wright, S.M., Baskin, M., Dhurandhar, N.V., Lijoi, M.C., Grilo, C.M., Deluca, M., Westfall, A.O., & Allison, D.B. (2006). Putative contributors to the secular increase in obesity: exploring the roads less traveled. *International Journal of Obesity.* 30, 1585–1594.
123. Ghiasvand, M., Heshmat, R., Golpira, R., Haghpanah, V., Soleimani, A., Shoushtarizadeh, P., Tavangar, S.M., & Larijani, B. (2006). Shift working and risk of lipid disorders: a crosssectional study. *Lipids in Health and Disease,* 10, 5-9.
124. Van Cauter, E., Holmback, U., Knutson, K., Leproult, R., Miller, A., Nedeltcheva, A., Pannain, S., Penev, P., Tasali, E., & Spiegel, K. (2007c). Impact of sleep and sleep loss on neuroendocrine and metabolic function. *Hormone Research,* 67, 2–9.
125. Spiegel, K., Leproult, R., & Van Cauter, E. (1999). Impact of sleep debt on metabolic and endocrine function. *Lancet,* 354, 1435–9.

126. Patel SR. Reduced sleep as an obesity risk factor. *Obes Rev.* 2009 Nov;10 Suppl 2:61-8. Review
127. Swanson LM, Arnedt JT, Rosekind MR, Belenky G, Balkin TJ, Drake C. Sleep disorders and work performance: findings from the 2008 National Sleep Foundation Sleep in America poll. *J Sleep Res.* 2011 Sep;20(3):487-94.
128. Ohayon, M.M. (2002). Epidemiology of insomnia: what we know and what we still need to learn. *Sleep Medicine Reviews*, 6, 97–111.
129. O'Reardon, J.P., Ringel, B.L., Dinges, D.F., Allison, K.C., Rogers, N.L., Martino, N.S., & Stunkard, A.J. (2004). Circadian eating and sleeping patterns in the night eating syndrome. *Obesity Research & Clinical Practice*, 12, 1789-1796.
130. Rogers, N.L., Dinges, D.F., Allison, K.C., Maislin, G., Martino, N., O'Reardon, J.P., & Stunkard, A.J. (2006). Assessment of sleep in women with night eating syndrome. *Sleep*, 29, 814-819.
131. Patel SR, Hu FB. Short sleep duration and weight gain: a systematic review. *Obesity (Silver Spring)*. 2008 Mar;16(3):643-53. Epub 2008 Jan 17. Review
132. Gozal D, Kheirandish-Gozal L. The obesity epidemic and disordered sleep during childhood and adolescence. *Adolesc Med State Art Rev.* 2010 Dec;21(3):480-90,
133. Willie JT, Takahira H, Shibahara M, Hara J, Nomiyama M, Yanagisawa M, Sakurai T. Ectopic overexpression of orexin alters sleep/wakefulness states and muscle tone regulation during REM sleep in mice. *J Mol Neurosci.* 2011 Feb;43(2):155-61.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

La gran preocupación que existe actualmente alrededor del peso corporal, está colaborando a la proliferación descontrolada de innumerables dietas de adelgazamiento entre las personas “no satisfechas con su peso”.

En este sentido el principal objetivo del siguiente estudio es analizar la obesidad desde un punto de vista cronobiológico, y de esta manera poder dilucidar la importancia que tiene la alteración circadiana de ciertos ritmos biológicos en la ganancia de peso o la no pérdida del mismo. El acúmulo de grasa corporal y el grado de lipogénesis en el tejido adiposo del individuo podría ser diferente a distintas horas del día: ingiriendo las mismas calorías, podría suceder que nuestro tejido adiposo acumulara más o menos grasa dependiendo del momento del día.

A su vez uno de los aspectos más interesantes, es poder conseguir una caracterización cronobiológica de cada individuo, establecer mejoras en las terapias de comportamiento alimentario, introducir nuevos índices que permitan detectar pacientes de riesgo y poder establecer pautas alimentarias y hábitos de vida individualizados que ayuden a estos pacientes a alcanzar la meta de peso propuesta.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

OBJETIVO 1: Analizar en mujeres normopeso y obesas, los patrones circadianos de temperatura periférica, y observar si existen diferencias entre ambos ritmos. A su vez establecer si estos parámetros que definen la temperatura periférica muestran relación con el síndrome metabólico.

OBJETIVO 2: Conocer las posibles entre los ritmos circadianos de melatonina y Cortisol entre mujeres obesas y normopeso y su relación con parámetros relacionados con la obesidad, particularmente con las hormonas leptina, ghrelina y adiponectina y con las variables del Síndrome Metabólico.

OBJETIVO 3: Evaluar los hábitos de sueño y patrones de comida en mujeres normopeso y obesas y establecer si “el Cuándo” es importante en el establecimiento de la obesidad.

OBJETIVO 4: Relacionar la eficiencia y duración del sueño en mujeres obesas, y determinar el impacto de ambos factores en variables de riesgo metabólico.

OBJETIVO 5: Dilucidar qué marcadores circadianos son los más importantes para detectar cronodisrupcion en una población femenina obesa y poder definir un índice que sea efectivo para caracterizar la cronodisrupcion en la práctica clínica.

OBJETIVO 6: Determinar la influencia del genotipo de los genes-reloj *Per2* y *CLOCK* en la obesidad en el ámbito epidemiológico y su aplicación en la práctica clínica en el tratamiento de la obesidad.

SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS

1. SELECCIÓN DE SUJETOS

1.1 Diseño del estudio: identificación de casos y controles.

El estudio fue realizado en 70 mujeres que acudieron a una oficina de farmacia durante el mes de Marzo de 2009, cumpliendo con los criterios previamente establecidos, tales como no padecer ningún tipo de enfermedad endocrinas, renal, hepática, o psiquiátrica grave previa y que no estaban bajo ningún tratamiento farmacológico. Es de destacar que las mujeres seleccionadas no habían sufrido ninguna fluctuación importante de peso en los últimos 3 años (no más de 3 kg hacia arriba o hacia abajo) y ninguna de las pacientes seleccionadas padecía de apnea obstructiva del sueño. Todos los pacientes fueron informados de los métodos y objetivos del proyecto, y dieron su consentimiento informado tanto para la participación en el mismo, como para la utilización de los resultados obtenidos, de acuerdo con los principios recogidos en la Declaración de Helsinki, y siguiendo las normas del Comité Ético de la Universidad de Murcia. Así mismo, se garantizó la total confidencialidad de todos los datos e informaciones relativas a los participantes, tal y como se observa en la Ley Orgánica para la Regulación del Tratamiento Automatizado de Datos de Carácter Personal (Ley Orgánica 5/1992).

Los pacientes fueron asignados a los siguientes grupos: el primer grupo, "*grupo control*", incluyó a 20 mujeres normopeso (edad media: 38 ± 11) (IMC: $22 \pm 2,6$) y el segundo grupo estaba formado por mujeres obesas ($n = 50$) (IMC $> 30 \text{ kg/m}^2$ y $< 40 \text{ kg/m}^2$) (edad media: 42 ± 10) (IMC: $33,5 \pm 3,2$). Todos los sujetos procedían de la ciudad de Murcia, situada en el sureste de España, en la costa mediterránea.

2. ESTUDIO ANTROPOMÉTRICO

La antropometría puede definirse como la determinación del tamaño, el peso y las proporciones del organismo y su comparación con patrones de referencia adecuados (1). Las medidas

antropométricas constituyen una técnica sencilla, barata, no invasiva y fácilmente reproducible, que requiere un material de trabajo de fácil manejo. Sin embargo, presenta algunas limitaciones, como la variabilidad inter-observador y las dificultades técnicas en el caso de individuos obesos.

Los índices antropométricos ayudan a establecer una información aproximada, en comparación con tablas de referencia poblacional, de la composición corporal y el estado nutricional del individuo (2).

La evaluación de la obesidad de estos pacientes se llevó a cabo según los métodos establecidos por la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (3).

2.1 Material antropométrico empleado

- Estadiómetro: escala métrica apoyada sobre un plano vertical que tiene un plano horizontal con un cursor deslizante para contactar con la parte superior de la cabeza con precisión de 1 mm, para medir la talla.

- Báscula: Balanza electrónica, con una precisión de 100 gramos, para medir el peso corporal.

- Cinta antropométrica: cinta métrica flexible, inelástica y con un espacio sin graduar antes del cero con precisión de 1 mm. Este instrumento se utiliza para medir los perímetros y para la localización del punto medio entre dos puntos anatómicos.

- Plicómetro o compás de pliegues cutáneos: tipo Harpenden (Holtain Ltd, Bryberian; Crymmich, Pembrokeshire, UK), con capacidad de medida de 0-48 mm y precisión 0,2 mm. La presión en sus ramas es constante (10 g/mm²) cualquiera que sea su abertura, utilizado para medir pánículo adiposo.



Figura 13. Plicómetro o compás de pliegues cutáneos tipo Harpenden

- Sagitómetro: Es una barra metálica con un cursor deslizante, sirve para medir longitudes y tiene una precisión de 1 mm, el rango abarca desde los pocos centímetros hasta un metro, y es utilizado para medir diámetros.



Figura 14. Sagitómetro abdominal tipo Holtain Kahn

Todo el material utilizado está homologado y cuidadosamente calibrado antes de realizar cada determinación.

2.2 Protocolo de medida

- Ficha antropométrica: donde quedan recogidos diferentes datos del paciente, así como las medidas realizadas (Anexo I).

Cuidados generales: la toma de medidas requiere unas normas básicas:

1. La habitación donde se realiza el estudio antropométrico debe ser amplia y a ser posible con regulación de temperatura para hacerla más confortable.
2. La persona estudiada estará descalza y con ropa ligera.
3. La calibración previa de los instrumentos.
4. las medidas preferentemente en el lado derecho del cuerpo.
5. La persona debe estar como mínimo 2-3 horas de ayuno y con la vejiga vacía.

En este estudio se han tenido en cuenta todas estas consideraciones generales.

2.3 Peso y Talla: Índice de Masa Corporal (IMC)

La medición del peso y la altura se realizó en la báscula y el tallímetro descritos anteriormente. El individuo descalzo y ligero de ropa, se sitúa en posición erguida sobre la superficie de la báscula con el peso distribuido sobre ambos pies, los talones juntos y la cabeza alineada según el plano de Frankfurt (siguiendo la línea trago-comisural), y con los brazos relajados. (2).

A partir de estas medidas, se determinó un parámetro derivado que es el índice de Masa Corporal (IMC) o Índice de Queletet:

$$\text{IMC} = \text{Peso (Kg)} / \text{Altura (m}^2\text{)}$$

Este índice relaciona el peso y la talla, es independiente del sexo y se considera un buen estimador de la grasa corporal. El valor del IMC, es actualmente el indicador de referencia en muchos estudios clínicos y epidemiológicos. (2).

2.4 Cálculo del porcentaje de grasa corporal.

La valoración del porcentaje de grasa corporal, se realizó a partir de las medidas de pliegues cutáneos. Estas medidas se llevaron a cabo con el sujeto en bipedestación, en el plano lateral derecho del paciente. Seguidamente, se sujetó el plicómetro con la mano derecha, y con los dedos pulgar e índice de la mano izquierda, aproximadamente a 1 cm del punto anatómico marcado, se cogió el pliegue, siempre evitando incluir el músculo subyacente. Se aplicaron las puntas del plicómetro de forma perpendicular a los pliegues, con una presión constante de tres segundos, al cabo de este tiempo se procedió a la lectura del pliegue en mm, realizando 3 mediciones, siempre por el mismo operador y tomando como valor final la mediana de las medidas realizadas (2).

Los pliegues que se midieron para el cálculo del porcentaje de grasa corporal fueron los siguientes:

- Pliegue del bíceps: El pliegue se pinzó en la parte anterior del brazo, verticalmente y a la distancia media entre el acromion y el olecranon (4).
- Pliegue del tríceps: Se determinó en la cara posterior del brazo, estando éste caído y relajado, en el punto medio entre el acromion y el olecranon (4).
- Pliegue suprailíaco: Este pliegue se midió oblicuamente, a una distancia de 5-7 cm por encima de la espina ilíaca anterosuperior, a nivel de la línea media-axilar (5).

- Pliegue subescapular: Se tomó en el ángulo inferior de la escápula, en su parte interna y en dirección oblicua, formando un ángulo de 45° con la horizontal que pasa por el borde inferior de la escápula (4).

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

La determinación de la densidad corporal (D) se realizó a partir de la ecuación de Durnin & Arman (6)

Hombres	$D = 1,161 - 0,0632 \times X$
Mujeres	$D = 1,12581 - 0,072 \times X$

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

A partir de la ecuación anterior, se determina el porcentaje de grasa corporal según la ecuación de Siri (7), tal y como viene propuesta por la SEEDO.

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

Teniendo como base el modelo bicompartimental, el porcentaje de masa magra o masa libre de grasa (MLG) se obtiene restándole al total el porcentaje de masa grasa obtenido.

$\%MLG = 100 - \%GC$

2.5 Cálculo de la distribución de grasa corporal

Con el objetivo de determinar la distribución de grasa corporal se midieron los siguientes perímetros:

- Circunferencia de la cintura: Se midió en la línea media entre el margen costal inferior y la cresta ilíaca (8)
- Circunferencia de la cadera: Se midió en el punto de mayor circunferencia a nivel de los glúteos (9)

- Circunferencia de muslo: Es el perímetro de la raíz del muslo, en sentido oblicuo y paralelo al pliegue inguinal (10)

Todas las medidas se realizaron con una cinta métrica flexible e inextensible y con el paciente en bipedestación.

A partir de estas medidas se calculó el índice cintura (cm)/cadera (cm) que aporta información sobre la distribución de la grasa corporal; así como de los factores de riesgo asociados al tipo de obesidad que presente el paciente. También permite clasificar la obesidad en androide, cuando el cociente cintura/cadera es superior a 94 cm en hombres y 80 cm en mujeres, u obesidad ginoide o glúteo-femoral (ICC < 94 en hombres y < 80 en mujeres).

Índice cintura cadera (ICC) = circunferencia cintura / circunferencia cadera

Índice cintura muslo (ICM) = circunferencia cintura / circunferencia muslo

2.6 Clasificación de obesidad visceral y subcutánea

Para determinar si un paciente padece obesidad abdominal o subcutánea utilizamos una nueva ecuación predictiva del tipo de obesidad (11). La aplicación de esta ecuación es válida para evaluar la obesidad visceral. Para poder aplicar esta ecuación tuvimos que medir los diámetros coronal (DC) (la anchura del abdomen de un lado al otro) y sagital (DS) (la profundidad del cuerpo entre el tórax y la espalda a la altura del abdomen), ambas medidas se tomaron con el paciente tumbado sobre una camilla, sin ropa en la zona del abdomen y con éste relajado. También utilizamos para la ecuación el Pliegue Tripicital (PT).

NUEVA ECUACIÓN

$$0,868+(0,064*DS)-(0,036*DC)-(0,022*PT)$$

CLASIFICACIÓN

Si el dato obtenido es <0,42 ----→ Obesidad Subcutánea

Si el dato obtenido es >0,42 ---→ Obesidad Abdominal

2.7 Estudio de Bioimpedancia.

La determinación de la bioimpedancia eléctrica para valorar la composición corporal se basa en las propiedades eléctricas del organismo, siendo la conducción eléctrica más elevada en el compartimento magro que en el graso (12).

Básicamente, consiste en hacer circular una corriente de baja intensidad (500 microamperios) a una frecuencia fija (50 kHz) entre dos puntos del organismo y medir la impedancia o resistencia presentada por el organismo al paso de esta corriente. De esta manera puede calcularse el contenido de agua corporal total, asumiendo que el factor de hidratación es constante, según las fórmulas que incluye el aparato, se determina el valor de la masa magra y de la masa grasa corporal. Esta técnica presenta como ventajas que es segura, no invasiva y el error interobservador es mínimo, por lo que es un método muy utilizado en estudios epidemiológicos.

Entre los inconvenientes cabe citar que requiere una serie de consideraciones que pueden variar en algunas ocasiones:

- La hidratación de la MLG es constante.
- La relación agua extra/intracircular es constante.
- El cuerpo humano no se comporta como un conductor uniforme, de forma que la impedancia corporal viene ante todo determinada por la impedancia de las extremidades superior e inferior, por lo que las alteraciones hídricas en estos segmentos (edemas) pueden alterar las estimaciones.

Material

- Bioimpedanciómetro TANITA (TANITA Corporation of America, Inc, Arlington Heights, IL, USA) modelo TBF-300.



Figura 15. Bioimpedanciómetro TANITA modelo TBF-300. Fuente: TANITA Corporation of America.

Protocolo de medida

Para asegurar una mejor fiabilidad de los datos, la medición se realizó con los individuos descalzos y cumpliendo las siguientes condiciones (13):

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

3. DESCRIPCIÓN DEL CUESTIONARIO PARA LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FÍSICA

El objetivo del cuestionario es calcular el nivel de actividad física, para ello cada individuo declara su participación en alguna de las actividades propuestas y el tiempo dedicado a cada una de ellas a la semana. (Anexo II)

Antes de realizar el cuestionario a cada paciente se le explicó lo siguiente:

- Las preguntas se referirán acerca del tiempo que usted estuvo físicamente activo en los últimos 7 días. Por favor responda cada pregunta aún si usted no se considera una persona activa. Por favor piense en aquellas actividades que usted hace como parte del trabajo, en el jardín y en la casa, para ir de un sitio a otro, y en su tiempo libre de descanso, ejercicio o deporte.
- Piense acerca de todas aquellas actividades vigorosas y moderadas que usted realizó en los últimos 7 días. Actividades vigorosas son las que requieren un esfuerzo físico fuerte y le hacen respirar mucho más fuerte que lo normal. Actividades moderadas son aquellas que requieren un esfuerzo físico moderado y le hacen respirar algo más fuerte que lo normal.

El cuestionario se divide en los siguientes apartados:

- Actividad física relacionada con el trabajo
- Actividad física relacionada con el transporte
- Trabajo de la casa, mantenimiento de la casa y cuidado de la familia
- Actividades físicas de recreación tiempo libre y deporte
- Tiempo dedicado a estar sentado

3.1 Puntuación del cuestionario de actividad física

Los individuos fueron clasificados en 3 niveles de actividad física según la puntuación obtenida en el cuestionario.

INACTIVO

Cuando no hay ninguna actividad

Cuando hay algo de actividad pero no la suficiente como para llegar a los niveles 2 ó 3.

MÍNIMAMENTE ACTIVO

3 ó más días actividad vigorosa* durante al menos 20 minutos cada día

5 ó más días actividad moderada o caminatas de al menos 30 minutos por día.

5 ó más días de cualquier combinación de: caminatas, actividad moderada ó vigorosa que alcancen un mínimo de 600 METs (min/semana).

ACTIVIDAD SALUDABLE

Actividad vigorosa durante al menos 3 días y acumulando al menos 1500 METs

(min/semana)

7 ó más días de cualquier combinación de: caminatas, actividad moderada ó vigorosa alcanzando un mínimo de 3000 METs (minutos/semana).

Cálculos

La puntuación se va a calcular en un índice denominado MET (múltiplo de la tasa metabólica basal), que tiene distintos niveles en función del ejercicio realizado:

- Caminar (o montar en bici de paseo) = 3.3 METs
- Actividad moderada = 4.0 METs
- Actividad vigorosa (que es aquella que te haga respirar con más frecuencia de lo normal) = 8.0 METs

4. DETERMINACIONES SANGUÍNEAS

Las determinaciones analíticas se realizaron con muestras de sangre venosa, y tras 8 horas como mínimo de ayuno del paciente.

La sangre extraída se introdujo en tubos de vacío, con EDTA tripotásico para las determinaciones sanguíneas. El plasma se extrajo tras centrifugación de la muestra a 3500 rpm durante 10 minutos. La fase superior amarilla, el plasma, se alicuotó y congeló a -80°C para las determinaciones que no se realizaron en el momento.

4.1 Determinación de Colesterol total

Fundamento

La cuantificación de los valores de colesterol total en suero se ha determinado enzimáticamente mediante el método de la colesteroesterasa/colesterooxidasa (14). Se inicia la reacción añadiendo a la muestra de suero el reactivo de colesterol.

Bajo la acción catalítica de la peroxidasa sobre la 4-aminofenazona y el peróxido de hidrógeno se forma un colorante rojo, cuya intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de colesterol. Este colorante puede medirse fotométricamente en mmol/l (factor de conversión: 1mg/dl = 0,026 mmol/l). Esta técnica tiene una sensibilidad analítica de 0,08 mmol/l.

Material

- Kit Colesterol CHOD-PAP (Roche-Diagnostic, Alemania)
- Analizador Roche/Hitachi 747

4.2 Determinación de Colesterol-HDL*Fundamento*

Esta determinación está basada en el método enzimático anterior descrito para el colesterol total con algunas modificaciones. La muestra previamente es incubada con PEG durante 15 minutos para la precipitación de las lipoproteínas aterógenas. A partir del sobrenadante realizamos la reacción enzimática descrita para el colesterol total (factor de conversión: 1mg/dl = 0,026 mmol/l).

Material

- Kit Colesterol CHOD-PAP
- Polietilenglicol (PEG)
- Analizador Ra-1000 (Bayer, Alemania)

4.3 Determinación de colesterol-LDL

La determinación del colesterol-LDL (mmol/l) se determina indirectamente mediante la ecuación de Friedewald (15).

$$\text{Colesterol-LDL} = (\text{Colesterol Total}) - (\text{Triglicéridos}/5) - (\text{Colesterol-HDL})$$

4.4 Determinación de Triglicéridos*Fundamento*

Este método está basado en estudios previos, empleando una lipasa lipoproteica de microorganismos para la hidrólisis completa y rápida de triglicéridos a glicerol con oxidación subsiguiente a dihidroxiacetonafofosfo y peróxido de hidrógeno (16). Este último compuesto, bajo la acción catalítica de la peroxidasa con 4-aminofenazona y 4-clorofenol, da un colorante

rojo en una reacción de punto final (Trinder,P, 1969). La cuantificación se realiza fotométricamente en mmol/l (factor de conversión: 1 mg/dl = 0,012 mmol/l). La sensibilidad analítica de la técnica es de 0,05 mmol/l.

Material

- Kit Triglicéridos GPO-PAP
- Analizador Roche/Hitachi 747

4.5 Determinación de Ghrelina

Fundamento

El análisis plasmático de ghrelina fue determinado mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA), que se basa en el marcaje con un radioisótopo de un antígeno determinado y su posterior detección por anticuerpos específicos fijados sobre un soporte sólido (17). La Ghrelina se midió de forma cuantitativa. La sensibilidad de la técnica es de 40 pg/ml.

Material

- Kit Ghrelin-RIA (Mediagnost, Reutlinge,Germany); para la cuantificación se utilizó un contador gamma (DPC Gambyt).

4.6 Determinación de Leptina

Fundamento

El radioinmunoensayo permite medir la leptina humana en suero o plasma. Esta técnica utiliza un anticuerpo policlonal de alta afinidad específico para esta proteína. Reconoce cuantitativamente la leptina humana. Los estándares y el trazador I-125 se preparan a partir de leptina recombinante. El uso de un antisuero de alta afinidad impide que se produzcan interferencias provocadas por las proteínas de unión a la leptina. La sensibilidad de la técnica es de 0,1 ng/ml.

Material

- Kit Human Leptin-RIA- Sensitive Mediagnost, Reutlinge,Germany); para la cuantificación se utilizó un contador gamma (DPC Gambyt).

4.7 Determinación de Adiponectina.

Fundamento

Este ensayo utiliza la hormona marcada Adiponectina-I125 y antisuero policlonal de conejo para determinar el nivel de adiponectina en suero o plasma. La sensibilidad de la técnica es de 1 ng/ml.

Material

- Kit RIA Human Adiponectin (Millipore, Billerica, MA, USA). Para la cuantificación se utilizó un contador gamma (DPC Gambyt).

5. MEDIDAS DE PRESIÓN ARTERIAL

Para determinar las medidas de Presión arterial se entregó a cada paciente un monitor de presión arterial para muñeca OMRON RX3 de fácil uso y precisión, con las siguientes características:

- Rango de medición: Presión de 0 - 299 mmHg.
- Monitor de presión arterial para muñeca totalmente automático
- Manguito extra grande que se ajusta a muñecas de 13,5-19,5 cm.
- Clínicamente validado según el Protocolo Internacional
- Precisión: +/- 3 mmHg en la presión. +/- 5% del valor indicado en el visor.

La medición de la tensión arterial, se realizó antes de comer (14 h) y antes de cenar (21 h), durante una semana a días alternos. Es decir se la midieron el primer, el tercer, el quinto y el séptimo día, anotando los resultados obtenidos en una tabla (Anexo III).

5.1 Protocolo de medida

- Estar sentado tranquilamente 5 minutos previos a la medida.
- No fumar ni tomar café 30 minutos antes de realizar la medida.
- Tener la vejiga vacía (luego de haber orinado).

- Colocar el brazo izquierdo si es diestro y viceversa a la altura del corazón, apoyándolo en una mesa o el brazo del sillón.
- Proceder a realizar la medida.

Han sido considerados como rangos normales de la presión arterial en humanos adultos:

- Sistólica entre 90 y 140 mmHg
- Diastólica entre 60 y 90 mmHg

6. MEDIDAS DE GLUCOSA

La glucemia se midió mediante tiras reactivas del Glucometer Elite® que determina cuantitativamente la concentración de glucosa en sangre total. La sangre se obtuvo mediante la punción en el dedo con una lanceta estéril, dejando que la gota de sangre penetrara por capilaridad en la tira reactiva. Las pacientes fueron advertidas de la importancia de no depositar la gota de sangre encima de la tira, pues podría llevar a la contaminación del aparato.

Cada paciente realizó dos determinaciones de glucosa en días distintos, durante el periodo de una semana. Una medida la realizaron por la mañana en ayunas, y la segunda medida la realizaban otro día por la noche después de un ayuno de 8 horas.

El análisis se basa en la medida del potencial eléctrico en el electrodo de la tira. La reacción de la glucosa con los reactivos (glucosa oxidasa, 29,1% p/p, y ferricianuro potásico, 32,0% p/p) genera electrones que producen una corriente proporcional a la concentración de glucosa en la muestra. Al cabo de 30 segundos, suena un pitido y aparece en la pantalla la concentración de glucosa en sangre total, expresada en miligramos de glucosa/100 ml.

Esta prueba proporciona una medida de glucemia con valores comprendidos entre 20 y 600 mg/100 ml (de 1,1 a 33,3 mmol/L)

Las tiras reactivas deben estar a temperatura ambiente antes de su uso y el medidor debe codificarse para cada serie de tiras.

7. CLASIFICACIÓN DEL SÍNDROME METABÓLICO

El Síndrome Metabólico constituye a nivel mundial uno de los principales problemas de salud pública del siglo XXI. Utilizando como referencia la definición de Síndrome metabólico (SM) propuesta por la Federación Internacional de la Diabetes (18).

Perímetro de cintura	≥ 94 cm (Hombres) ≥ 80 cm (Mujeres)
Glucosa	≥ 100 mg/dl
Triglicéridos	≥ 150 mg/dl
HDL-colesterol	< 40 mg/dl (Hombres) < 50 mg/dl (Mujeres)
Presión arterial	PA Sistólica ≥ 130 mm Hg PA Diastólica ≥ 85 mm Hg

Ha sido desarrollada una puntuación para determinar la presencia o ausencia del mismo. El criterio seguido ha consistido en sumar una unidad por cada uno de los componentes del síndrome metabólico que estuviera presente en cada una de las pacientes (perímetro de la cintura, glucosa en ayunas, triglicéridos, HDL-c, y presión arterial sistólica o diastólica) pudiendo alcanzar cada una como máximo un valor de 5 puntos.

8. MEDICIÓN DE TEMPERATURA CORPORAL PERIFÉRICA.

En este estudio hemos utilizado la temperatura periférica medida, concretamente, en la muñeca, sobre la arteria radial, ya que la temperatura periférica en la muñeca se encuentra en antifase con respecto a la temperatura central. De este modo se pueden obtener unos resultados similares a los obtenidos mediante el registro de temperatura central pero con las ventajas derivadas de la mayor comodidad para el sujeto.

Cada sujeto, durante tres días completos y consecutivos fue dotado con un ThermoChron iButton de 17 milímetros de diámetro y 3,3 gr de peso, capaz de registrar su propia temperatura en el tiempo, de forma totalmente autónoma y sin necesidad de baterías ni otros dispositivos auxiliares. Gracias a su cápsula de acero inoxidable, el ThermoChron iButton puede resistir los

ambientes más duros, incluyendo agua, lodos, contaminantes, temperaturas extremas y manipulación incorrecta.

Características Técnicas:

- Intervalo entre -40°C a $+85^{\circ}\text{C}$ en incrementos de $0,5^{\circ}\text{C}$.
- Exactitud de $\pm 1^{\circ}\text{C}$ entre -20°C a 70°C .
- Reloj en tiempo real con ajuste de años bisiestos.
- Exactitud del reloj de ± 2 minutos/mes (0 a 45°C)

Posteriormente los valores numéricos obtenidos se exportaron en el ordenador para su posterior análisis.

8.1 Significado de cada parámetro de temperatura

- VALOR MÁXIMO: Mayor valor de temperatura alcanzado.
- VALOR MÍNIMO: Menor valor de temperatura alcanzado.
- VALOR MEDIO: Temperatura media.
- MESOR: Temperatura media, es prácticamente lo mismo que VALOR MEDIO.
- AMPLITUD: Diferencia entre el máximo (o mínimo) valor de la función y la media.
- ACROFASE: Desplazamiento de fase con respecto a un valor de referencia. El modo de vida vespertino se asocia a hipoglucemia por la mañana y una acrofase más retrasada.
- RAYLEIGH: Hace referencia a la regularidad. Cuando el valor se acerca a 1 mayor regularidad, todas las acrofases coinciden. Cuando el valor se acerca a 0, las acrofases van al azar.
- PR: Porcentaje del ritmo. Cuanto más alto es este valor, será una curva más sinusoidal.
- P1: Potencia del primer armónico. Es un valor muy parecido a la AMPLITUD, marca la fuerza del ritmo de 24 horas.

- P2: Potencia del segundo armónico. Marca la fuerza de ritmos de 12 horas. Nuestros pacientes normopeso tienen más marcado este ritmo puede ser estar relacionado con la siesta y actividad postprandial.
- Pac12: Potencia del 12 armónico ritmos cada 2 horas.
- P2_P12: La relación entre armónicos. Para saber si hay ritmos ultradianos.
- M5: La máxima temperatura durante 5 horas consecutivas dentro del día completo. Valores de T^a altos están asociados a una mayor profundidad del sueño, es decir a una mejor calidad, y a la vasodilatación lo que conlleva un a menor Presión Arterial.
- HORA M5: Hora a la que se alcanza esta T^a .
- L10: La mínima temperatura durante 10 horas consecutivas dentro del día completo.
- HORA L10: Hora a la que se alcanza esta T^a .
- ESTABILIDAD INTERDIARIA: Indica si todos los días se repite el mismo patrón de comportamiento. Es bueno tener valores cercanos a 1.
- VARIABILIDAD INTRADIARIA: Es un valor que está invertido, oscila entre los valores de 0 y 2. Tener un valor cercano a 0 indica que dentro de un ritmo hay más fragmentación del mismo, es decir, pequeñas oscilaciones dentro de una recta sinusoidal. En delgados nos salen ritmos más fragmentados, esto puede deberse a que al tener menos grasa en la muñeca sean más sensibles a los cambios de temperatura.
- ÍNDICE IO: Se refiere a %. A 100 le quitamos el valor que nos salga. Significa: El % de valores de T^a por la noche que están por debajo a la mediana de los valores de la mañana.
- QP: Es el Periodograma. Cuanto mayor sea el valor, significa que mejor ritmo.
- CFI: Circadian Function Index.

9. MEDICIONES EN SALIVA DE MELATONINA Y CORTISOL

9.1 Determinación de melatonina salivar.

Fundamento

El procedimiento de ensayo sigue el principio básico de ELISA competitivo en el cual existe competencia entre un antígeno de biotina y no-biotina por un número limitado de sitios de unión

de anticuerpos. La cantidad de biotina antígeno unido al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración del analito de la muestra. Cuando el sistema está en equilibrio, el antígeno biotina libre se elimina por un paso de lavado y el anticuerpo antígeno biotina vinculada está determinado por el uso de estreptavidina-peroxidasa como marcador y TMB como sustrato. La cuantificación de muestra se realiza comparando la actividad enzimática del analito con una curva-respuesta preparada con standards.

Protocolo de medida

Los pacientes realizaron dos medidas en el mismo día, una fue realizada al mediodía sobre las 14:00 horas y la otra entre las 2 y las 3 de la madrugada, cuando el paciente ya había conciliado el sueño.

Los pacientes siguieron las siguientes instrucciones:

- No comer, beber, masticar chicle o cepillarse los dientes 30 minutos antes de la toma de muestra.
- Asegurarse de no tener lesiones en la cavidad bucal que pudieran contaminar la muestra.
- Introducir la esponja del saliveter en la boca durante un minuto, no morder la esponja solamente chuparla hasta que esta quede impregnada de saliva.
- Realizar la toma de madrugada, poniéndose un despertador y no encendiendo ninguna luz.
- Guardar las muestras envueltas con papel de aluminio para que la luz no estropee las muestras.

9.2 Determinación salivar de cortisol

Fundamento

Las pruebas determinaciones fueron con un ensayo inmunoenzimático (ELISA), basado en el principio de la competencia. Una cantidad desconocida de antígeno presente en la muestra y una cantidad fija de enzima-antígeno marcado compiten por los sitios de unión de los anticuerpos recubiertos con película en los pozos. Después de la incubación de los pozos se lavan para detener la reacción de la competencia. Tras la reacción del sustrato la intensidad del color desarrollado es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra. Los resultados de las muestras pueden determinarse directamente a través de la curva estándar.

Protocolo de medida

Las precauciones a seguir son las mismas que con la recogida de las muestras de melatonina, en esta ocasión los pacientes realizaron tres medidas, una se realizaba por la mañana al levantarse, la segunda medida la realizaron a las 12:00 del mediodía y la última antes de acostarse.

10. EVALUACIÓN NUTRICIONAL

Conocer el estado nutricional de los pacientes es fundamental para el estudio de los factores implicados en el desarrollo de la obesidad.

La ingesta de nutrientes ha sido valorada mediante una encuesta recordatorio de 7 días. Durante una semana completa cada paciente anotó en un dietario personal todos aquellos alimentos consumidos a lo largo de una semana, especificando hora del día en los que eran consumidos y cantidades, expresadas en gramos. (Anexo IV).

Posteriormente los datos fueron analizados con el programa de análisis nutricional GRUNUMUR (19), este programa informático utiliza en su base de datos tablas de composición de alimentos españoles, para los contenidos de energía y nutrientes se han introducido las tablas de Mataix y Mañas (20), para los de ácidos grasos las de Moreiras y colaboradores (21), y para los de algunos componentes antioxidantes presentes en los alimentos los datos de Olmedilla y colaboradores (22).

La información que este programa aporta es, además de la ingesta diaria de energía y nutrientes, la distribución de éstos en las diferentes tomas del día (desayuno, almuerzo, comida, merienda, cena, entre comidas).

11. ANÁLISIS DEL CICLO SUEÑO-VIGILIA

El ciclo de sueño vigilia es una de las manifestaciones más evidentes de la actividad del sistema circadiano humano (23). Con el fin de determinar el patrón de sueño, durante una semana completa, cada paciente anotó en un diario del sueño (Anexo V) la hora aproximada del inicio del sueño y la hora del despertar, así como las interrupciones de más de 10 minutos que hubiese experimentado durante la noche. En el caso de aquellos pacientes que dormían siesta, también reflejaron su inicio y duración en el diario.

12. DETERMINACION DEL CARÁCTER MATUTINO-VESPERTINO.

La valoración del carácter matutino-vespertino de los pacientes se realizó mediante una encuesta de hábitos de vida, desarrollada por los investigadores Horne y Otsberg (24) (Anexo VI). Dicho cuestionario, fue contestado de forma individual por cada paciente siguiendo las siguientes instrucciones:

- Leyendo atentamente cada pregunta antes de ser respondida.
- Contestando a todas las preguntas.
- Contestando a las preguntas consecutivamente una tras otra.
- Contestando cada pregunta independientemente de las demás. No volviendo atrás para verificar las respuestas.
- Todas las preguntas contienen respuestas preestablecidas. En cada pregunta pusieron una cruz al lado de una sola respuesta. Algunas preguntas muestran una escala, en ese caso pusieron una cruz en el lugar apropiado de la escala.
- Contestando con toda sinceridad.

Una vez terminado el test se sumaron todos los puntos que figuran al lado de cada casilla (Anexo VI) y se clasificó a los individuos según el carácter correspondiente a la puntuación final.

Puntuación	Carácter
70-86	Matutinidad Extrema
59-69	Matutinidad Moderada
42-58	Indefinido
31-41	Vespertinidad Moderada
16-30	Vespertinidad Extrema

13. DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS PER2 Y CLOCK.

Aislamiento del ADN

El ADN fue aislado de las muestras de sangre periférica y purificado usando el kit Puregene® DNA Purification (Gentra Systems, Valencia, CA, USA), siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial.

El ADN original fue diluido a una concentración del 2 ng/ μ L y alicuotado en platos de 96 pocillos. Unos pocos pocillos dentro de cada plato fueron alicuotados con agua pura para que sirvieran como controles. Otra estrategia empleada para un mayor control fue que algunas muestras fueron replicadas con otro número de indentificación en diferentes pocillos. Todos los platos de 96 pocillos con el ADN fueron almacenados a -18°C .

Para el genotipado, se seleccionaron tagSNPs (25) como aproximaciones para cuantificar SNPs no genotipados cuando hay un fuerte desequilibrio de asociación con Tagger, basado en datos del estudio HapMap Caucasian European Utah (26), con una frecuencia del alelo menor de ≥ 0.10 y una r^2 mínima de 0,8. La selección de SNPs se basó en 3 criterios: estudios previos de asociaciones genéticas o funciones biológicas de interés; mediciones bioinformáticas funcionales, y estructuras de desequilibrio de asociación.

En el caso del PER2, se genotipó el SNP rs2304672 C>G porque era el tagSNP en bloque largo de LD (LD1); reside en la region 5' no traducida (5' UTR) del PER2; porque los análisis bioinformáticos funcionales (27) sugirieron que había cambios importantes en la estructura del mRNA; y porque se asoció previamente con factores psico-sociales (28, 29, 30). SNP rs4663302 se eligió porque era marcador de otra región LD, reside 6554 bp por encima del comienzo del lugar de transcripción del PER2 y tiene una alta frecuencia del alelo menor en la población CEU.

Para el genotipaje se empleó un equipo Stratagene MX3005, la mezcla para el ensayo que incluye la sonda Taqman® (20X) y los primers de la casa comercial Applied Biosystems (SNP Genotyping Assays, Foster City, CA, USA) y el kit para amplificación: MBL-HOT Start (5U/ μ L)

El ADN genómico se amplificó en un equipo de PCR a tiempo real utilizando las sondas Taqman® que llevan incorporadas dos fluoróforos (HEX comprobado y FAM) uno para cada alelo del gen (el mutado y el normal). De esta forma se identificaron los sujetos homocigotos para el alelo más común (marcados con un fluoróforo), homocigotos para el alelo menos común (donde se encuentra la mutación, sería el sitio polimórfico (marcados con el otro fluoróforo)) y heterocigotos (que llevan el alelo normal y el mutado (marcados con los dos fluoróforos)). El ensayo se optimizó para 5 μ L de volumen final (Vf) de reacción en cada pocillo de la placa. La mezcla utilizada en la PCR está representada en la tabla 3.

Las sondas Taqman® estuvieron guardadas en el congelador, protegidas de la luz, hasta que fueron utilizadas. El sistema TECAN robotic fue utilizado para distribuir la mezcla en cada uno de los pocillos de los platos de 384 pocillos. El sistema RapidPlate robotic se utilizó para añadir las muestras de ADN desde los platos de 96 pocillos a los nuevos platos de 384. El sistema GeneAmp®PCR 9700 thermal cycler fue usado para la amplificación. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

1. 5 minutos a 95 °C para la desnaturalización del ADN
2. 30 segundos a 95 °C para la desnaturalización del ADN
3. 1 minuto a 60°C para la unión de los primers al ADN
4. 30 segundos a 72 °C para la extensión de la polimerasa
5. Los pasos 2, 3 y 4 se repiten 40 veces
6. el equipo conserva la placa a 25 °C

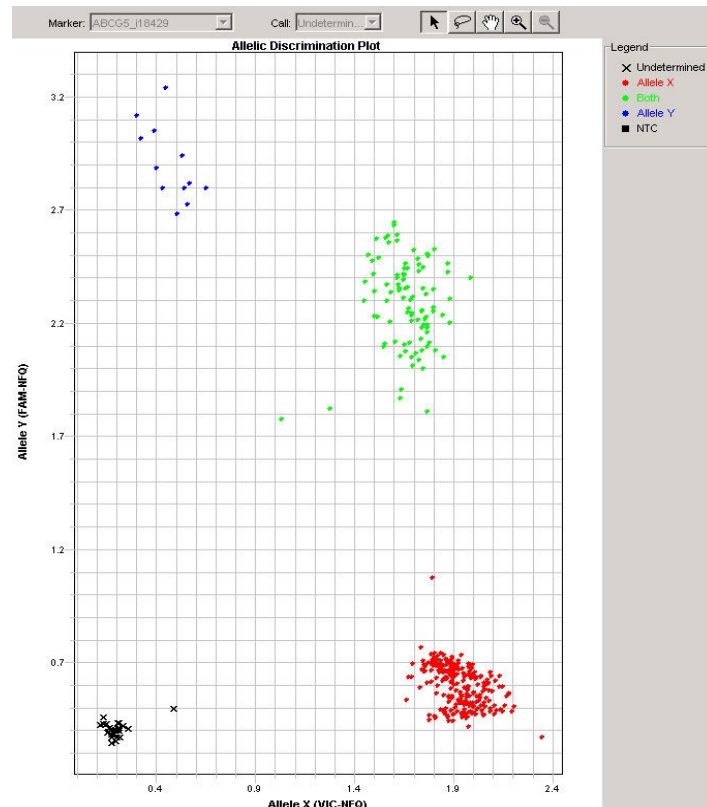


Figura 16. Ejemplo del resultado del análisis por Taqman del polimorfismo *CLOCK*.

En la figura 16 se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos mediante la validación por la técnica Taqman. En la figura, los puntos rojos representan a los individuos homocigotos

para el alelo de menor frecuencia; los verdes a los individuos heterocigotos; y los azules a los homocigotos para el alelo de mayor frecuencia.

REFERENCIAS

1. Pi-Sunyer FX. Obesity: criteria and classification. *Proc Nutr Soc.* 2000, 59(4):505-9.
2. National Institutes of Health. National Heart, Lung, and Blood Institute. Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults. The evidence report. Bethesda: National Heart, Lung, and Blood Institute. 1998; 1-228. Disponible en: www.nhlbi.nih.gov/nhlbi/nhlbi.htm
3. Salas-Salvadó J, Rubio MA, Barbany M, Moreno B; Grupo Colaborativo de la SEEDO. *Med Clin (Barc).* 2007 Feb 10;128(5):184-96 [SEEDO 2007 Consensus for the evaluation of overweight and obesity and the establishment of therapeutic intervention criteria].
4. Hume P, Marfell-Jones M. The importance of accurate site location for skinfold measurement. *J Sports Sci.* 2008 Oct;26(12):1333-40.
5. Davidson LE, Wang J, Thornton JC, Kaleem Z, Silva-Palacios F, Pierson RN, Heymsfield SB, Gallagher D. Predicting fat percent by skinfolds in racial groups: Durnin and Womersley revisited. *Med Sci Sports Exerc.* 2011 Mar;43(3):542-9.
6. Durnin JVGA, Rahaman MM. The assesment of the amount of fat in the human body measurements of skinfold thickness. *Br J Nutr.* 1967; 21: 681-689.

7. Siri WE. Body composition from fluid spaces and density: analysis of methods. In: Techniques for measuring body composition. Brozek J & Henschel A, Eds. 1961. Nacional Academy of Sciences. Washington DC. pp. 223-244.
8. Seidell JC, Cigolini M, Charcewska J, Contaldo F, Ellsinger BM, Björntorp P. Measurements of regional distribution of adipose tissue. In: Obesity in Europe 88. Proceedings of the 1st European Congress on Obesity. Björntorp P, Rösner S (Eds.) 1988. John Libbey. Estocolmo. 351-357.
9. Ferrario M, Carpenter MA, Chambless LE. Reliability of body fat distribution measurements, The ARIC Study Baseline Cohort results. *Int J Obes.* 1995; 19: 419-457.
10. Vague J. The degree of masculine differentiation in obesity, a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout and uric calculus. *Am J Clin Nutr.* 1956; 4: 20-34.
11. Garaulet M, Hernández-Morante JJ, Tébar FJ, Zamora S, Canteras M. Two-dimensional predictive equation to classify visceral obesity in clinical practice. *Obesity (Silver Spring)*. 2006 Jul;14(7):1181-91.
12. Egger G, Dobson A. Clinical measures of obesity and weight loss in men. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000 Mar;24(3):354-7
13. Nuñez C, Gallagher D, Visser M, Pi-Sunyer FX, Wang Z, Heymsfield SB. Bioimpedance analysis: evaluation of leg-to-leg system based on pressure contact footpad electrodes. *Med Sci Sports Exerc.* 1997 Apr;29(4):524-31
14. Roeschlau P, Bernt E, Gruber W. Z Klin Chem Klin Enzymatic determination of total cholesterol in serum. *Biochem.* 1974 May;12(5):226.
15. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972 Jun;18(6):499-502.
16. Bergmeyer HU, Scheibe P, Wahlefeld AW. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clin Chem.* 1978 Jan;24(1):58-73.
17. Lee HM, Wang G, Englander EW, Kojima M, Greeley GH Jr. Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric

- distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. *Endocrinology*. 2002 Jan;143(1):185-90.
18. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. IDF Epidemiology Task Force Consensus Group: The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet* 2005;366:1059-62.
 19. Pérez-Llamas F, Garaulet M, Herrero F, Palma JT, Pérez de Heredia F, Marín R, Zamora S. Multivalent informatics application for studies of the nutritional status of the population. Assessment of food intake]. *Nutr Hosp*. 2004 May-Jun;19(3):160-6.
 20. Mataix J, Mañas M, Llopis J, Martínez E. Tabla de composición de alimentos españoles. Granada: Instituto de Nutrición y Tecnología. Universidad de Granada. 1995.
 21. Moreiras O, Carvajal A, Cabrera L. Tablas de composición de alimentos. Ediciones Pirámide, S.A. Madrid. 1995.
 22. Olmedilla B, Granado F, Blanco I, Rojas-Hidalgo E. Evaluation of retinol, alpha-tocopherol, and carotenoids in serum of men with cancer of the larynx before and after commercial enteral formula feeding. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 1996 Mar-Apr;20(2):145-9.
 23. Parks DK, Yetman RJ, McNeese MC, Burau K, Smolensky MH Day-night pattern in accidental exposures to blood-borne pathogens among medical students and residents. *Chronobiol Int*. 2000 Jan;17(1):61-70.
 24. Horne JA, Ostberg O. A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. *Int J Chronobiol* 1976;4:97-110.
 25. De Bakker PIW, Yelensky R, Pe'er I, Gabriel SB, Daly MJ, Altshuler D. Efficiency and power in genetic association studies. *Nature Genetics*. 2005;37:1217-1223.
 26. Caucasian European Utah data. Internet: www.hapmap.org.
 27. Gruber AR, Lorenz R, Bernhart SH, Neuböck R, Hofacker IL. (2008). The Vienna RNA Websuite. *Nucleic Acids Res*. 36(Web Server issue):W70-4. Internet: <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>.

28. Carpen JD, Archer SN, Skene DJ, Smits M, von Schantz MJ. A single-nucleotide polymorphism in the 5'-untranslated region of the hPER2 gene is associated with diurnal preference. *Sleep Res.* 2005;14 (3):293-7.
29. Hamet P, Tremblay J. Genetics of the sleep-wake cycle and its disorders. *Metabolism.* 2006;55 (10 Suppl 2):S7-12. Review.
30. Partonen T, Treutlein J, Alpmann A, Frank J, Johansson C, Depner M, Aron L, Rietschel M, Wellek S, Soronen P, Paunio T, Koch A, Chen P, Lathrop M, Adolfsson R, Persson ML, Kasper S, Schalling M, Peltonen L, Schumann G. Three circadian *CLOCK* genes *Per2*, *Arntl*, and *Npas2* contribute to winter depression. *Ann Med.* 2007;39 (3):229-38.

RESULTADOS

Artículo 1**Differences in daily rhythms of wrist temperature between obese and normal weight women. Associations with Metabolic Syndrome features.**

**M^a Dolores Corbalán-Tutau. Juan Antonio Madrid. Jose M^a Ordovás. CE Smith,
Francisco Nicolás. Marta Garaulet.**

Chronobiology International. 2011;28 (5):425-33

<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/07420528.2011.574766>

Abstract

Circadian rhythm of core temperature is associated with widespread physiological effects. However, studies with other more practical temperature measures, such as wrist (WT) and proximal temperatures are still scarce. The aim of this study was to investigate whether obesity was associated with differences in mean WT values or in its daily rhythmicity patterns. Moreover, daily patterns of cortisol, melatonin and different metabolic syndrome (MetS) features were also analyzed in an attempt to clarify the potential association between chronodisruption and MetS. The study was conducted in 70 women, normal-weight women (n=20) (mean age: 38 ± 11) (mean BMI: 22±2.6 kg/m²) and obese women (n=50) (mean age: 42±10) (mean BMI: 33.5 ± 3.2 kg/m²). Skin

temperature was measured over a period of three days every 10 min with the “Thermochron iButton”. Rhythmic parameters were obtained using an integrated package for temporal series analysis “Circadianware®”.

Obese women displayed significantly lower mean WT ($34.1 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$) with a more flattened pattern, a lower-quality rhythm and a higher intraday variability (IV). Particularly interesting were the marked differences between obese and normal weight women in the secondary WT peak in the postprandial period (Second-Harmonic's-Power (P2)) considered a marker of chronodisruption and metabolic alterations. WT Rhythmicity characteristics were related to MetS features, obesity-related proteins and circadian markers such as melatonin.

In summary, obese women displayed a lower-quality WT daily rhythm with a more flattened pattern (particularly in the postprandial period) and increased IV in obese women, which suggests a greater fragmentation of the rest/activity rhythm than normal-weight women. These 24h changes were associated with higher MetS risk.

Artículo 2

**Daily profile in two circadian markers “melatonin and Cortisol” and associations with
Metabolic Syndrome components.**

M^a Dolores Corbalán-Tutau. Juan Antonio Madrid. Francisco Nicolás. Marta Garaulet.

Physiology and Behavior. 2012. (Epub ahead of print)

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031938412002296>

Abstract

Objective: The aim of the present work was to investigate associations in circadian markers, melatonin (MT) and cortisol, with Metabolic Syndrome (MetS) parameters, and with leptin, adiponectin and ghrelin plasma values.

Methods: The study was conducted in 70 women (mean age: 41 ± 10 y) that were classified without MetS (n=30) and with MetS (n=40). Blood collection, plasma separation and processing, and biochemical analyses for plasma lipids were performed. For measuring salivary melatonin, participants collected two samples. The first sample was obtained before lunch (at 14:00 p.m) and the second sample was taken at night (3:00 a.m). On a random working day, participants delivered repeated salivary cortisol samples. The first sample was obtained in the morning (09:00 a.m), then before lunch at (14:00 p.m), and finally just before bedtime (23:00 p.m).

Results: Significant differences were found between the MT measurements taken at night in women without and with MetS. With respect to cortisol, significant differences were found in the different times cortisol levels towards a more flattened pattern among MetS women. Both parameters were positive correlated between them. Of note MT and cortisol night/morning ratios were associated with MetS score and Metabolic Syndrome components.

Conclusion: The findings indicate that diminished daily amplitude in MT and cortisol circadian patterns was associated to metabolic disturbances in blood pressure, glucose and plasma lipids regulation, ghrelin and adipocyte-secreted hormones such as leptin and adiponectin.

Artículo 3

**Timing and duration of sleep and meals in obese and normal weight women.
Associations with increase blood pressure.**

M^a Dolores Corbalán-Tutau. Juan Antonio Madrid. Marta Garaulet.

Appetite. 2012; 59(1):9-16

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0195666312001158>

Abstract

The aim was to evaluate the efficiency and duration of sleep and meals in normal-weight and obese women and the impact of these factors on metabolic syndrome (MetS) variables. The study was conducted in 70 women, normal-weight women (n=20) and obese women (n=50). Anthropometric variables, plasma glucose, lipids and ghrelin concentrations were determined. Blood pressure measurement was performed before lunch and before dinner for a week on alternate days. Subjects were instructed to keep a sleep and feeding diary. In general, obese women displayed longer and a significantly higher number of awakenings per week than normal-weight women and a higher duration of naps. Sleep efficiency was significantly lower in obese women. The higher intake in energy in the obese women was due to snacking differences. Moreover, higher sleep efficiency was correlated with a decrease in the diastolic blood pressure evening/morning ratio. Interestingly, among normal-weight women, visceral fat increased with the number of awakenings while plasma ghrelin was inversely correlated with meal duration ($P=0.027$). In conclusion, obese women had lower sleep efficiency, ate more quickly and spent more time eating and sleeping during the daytime hours than normal-weight women. Of note, sleep efficiency was associated with MetS features. Further interventions in obesity could include educating patients in food timing and in healthier sleep-hygiene practices, helping them to modify bad sleep habits.

Artículo 4

***PER2* variants are associated with abdominal obesity, psycho-behavioral factors and attrition in the dietary treatment of obesity**

Marta Garaulet. M^a Dolores Corbalán-Tutau. Juan Antonio Madrid. Juan C. Baraza. Laurance D. Parnell. Yu-Chi Lee. Jose M^a Ordovás.

American Dietetic Association 2010;110:917-921.

<http://www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/yjada/article/S0002-8223%2810%2900237-3/fulltext>

Abstract

The purpose was to test for association between polymorphisms in the circadian clock-related gene *PER2* and attrition in patients prone to withdrawal from a behavioral weight-reduction-program based on the Mediterranean Diet. A total of 454 overweight/obese participants (women= 380, men= 74), aged 20-65 years, who attended outpatient clinics specializing in obesity between January and December, 2008, were studied. Anthropometric, biochemical and dietary-intake variables were analyzed. Effectiveness of the program was assessed and a questionnaire of barriers to weight loss was considered. Multivariate analysis and logistic regression models were performed. Results indicate that *PER2* polymorphisms rs2304672C>G and rs4663302C>T were associated with abdominal-obesity ($P<0.05$). Participants who withdrew from treatment were significantly more obese and had more barriers to lose weight ($P<0.05$). They also displayed a lower likelihood of “planning-eating in advance” and experiencing “stress with dieting” than those who completed treatment. Frequency of rs4663307 minor allele was significantly greater in withdrawers than in those who successfully completed treatment ($P<0.05$). Logistic regression analysis showed that rs2304672 C>G minor allele carriers had a greater probability of dropping out, displaying extreme snacking, experiencing stress with dieting, eating when bored and skipping breakfast than non-carriers. In conclusion, *PER2* is implicated in attrition in weight loss treatment and may modulate eating behavior-related phenotypes. These findings could represent a step towards personalized health care and nutrition based on a combination of genotyping and psycho-behavioral characterization.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

DISCUSIÓN GENERAL

Este trabajo proporciona evidencias de la importante y novedosa relación existente entre cronobiología y obesidad, así como la utilidad el uso de técnicas cronobiológicas en el tratamiento de la obesidad en la práctica clínica. En este sentido, se realizó un estudio comparativo de los ritmos circadianos en dos grupos de mujeres, uno de ellos normopeso y el otro con sobrepeso y/u obesidad. Los ritmos que se estudiaron fueron el de temperatura periférica, melatonina, cortisol, sueño y alimentación.

En el caso de la **temperatura periférica** se comprobó que ambos grupos de mujeres mostraban patrones diferentes. Las mujeres obesas presentaron un ritmo más fragmentado y aplanado, característico de poblaciones de edades más avanzadas. Además, el valor máximo de temperatura que alcanzaban estas mujeres durante el día era menor que los mujeres normopeso. Aunque las diferencias en los valores de temperatura medios entre los dos grupos parece insignificante (0,3 ° C), esta pequeña diferencia puede ser suficiente para perturbar el ritmo circadiano.

En este mismo grupo de población, a partir del estudio del **ritmo de melatonina**, concluimos que las mujeres con obesidad tenían un ritmo más sutil y valores de melatonina durante la madrugada significativamente más bajos que el grupo de mujeres normopeso. De tal manera que las diferencias entre noche y día en melatonina sólo fueron patentes en el grupo de mujeres normopeso, mientras que en las mujeres obesas estas diferencias dejaron de ser significativas.

En lo que se refiere al **ritmo de cortisol** salival se obtuvieron resultados muy similares a los de melatonina, Las mujeres con normopeso presentaron una curva diurna saludable, con concentraciones de hasta casi 5 veces más elevadas por la mañana que por la noche. Sin embargo, en el caso de las mujeres obesas, las diferencias en cortisol entre los valores de mañana y noche fueron menos acuciadas por lo que la amplitud de esta curva fue mucho menor presentándose ritmos de cortisol aplanados, lo que demuestra un estado de cronodisrupción.

Es de especial interés, resaltar que esta disrupción de los ritmos tanto de melatonina como de cortisol se asoció con valores elevados de circunferencia de cintura, de presión arterial, de glucosa y con alteraciones en las concentraciones de hormonas reguladoras del apetito.

Otro parámetro de interés en cronobiología es **el ritmo del sueño** ya que presenta un importante papel como modulador de las funciones neuroendocrinas y del metabolismo de la glucosa. En el presente trabajo, el análisis del ritmo entre ambos grupos de mujeres se mostró que la principal diferencia entre aquellas con normopeso y las de obesidad, estaba en la eficiencia del sueño. Además, el número de despertares de las pacientes obesas fue muy superior a los declarados por el grupo control. Es importante destacar, que esta disminución en la eficiencia del sueño resultó estar asociada con una ingesta de energía mayor.

Otra cuestión que nos planteamos fue conocer qué importancia tienen los **horarios de las comidas** en la obesidad y el síndrome metabólico y la rigurosidad que debemos seguir con los mismos. En los resultados que obtuvimos no se apreciaron diferencias significativas entre los horarios de comida de ambos grupos. En cambio, nos pareció muy interesante que

las mujeres con obesidad comiesen más rápido, la mayoría se saltara el desayuno e hicieran picoteos más frecuentes y ricos en grasa.

Con todos estos resultados, nos propusimos identificar cuáles eran las mejores **herramientas** para detectar la **cronodisrupción** asociada a la obesidad, y poder utilizar esto en la práctica clínica. Para ello, se realizó un análisis factorial entre todas las variables analizadas y los parámetros característicos del síndrome metabólico. El resultado que obtuvimos fue que con la determinación de la temperatura periférica, el conocimiento de los horarios de inicio y finalización del sueño y con una muestra de cortisol salival recogida por la mañana era suficiente para caracterizar la cronobiología asociada a la obesidad de cada individuo. La importancia de estas técnicas es que no son invasivas y son relativamente fáciles de determinar en los pacientes habituales en las consultas de nutrición. La colocación del ibutton con una muñequera durante una semana no llega a ser molesta para la paciente, el cortisol se determina en saliva, lo que no es invasivo y además resulta relativamente sencillo, y las dos cuestiones son muy fáciles de preguntar y contestar, con lo que creemos que en la práctica clínica sería fácil y de gran utilidad conseguir esta caracterización cronobiológica de la obesidad.

Finalmente, la última etapa de este trabajo, consistió en detectar hasta qué punto el cronotipo determinado a partir de ciertos polimorfismos en genes reloj, podría en parte explicar la obesidad en la población, lo que demostraría a su vez la asociación entre cronobiología y obesidad a través de la **nutrigenética**. En este sentido nuestros resultados apuntaron hacia la importancia de los polimorfismos del gen *PER2* (SNP rs2304672, SNP rs4663302) en su asociación con la obesidad y sobre todo en su relación con ciertas conductas obesogénicas como son: el abandono del tratamiento, el estrés por la dieta, el comer cuando se está aburrido, saltarse el desayuno, o la tendencia al picoteo, todas ellas importantes barreras en la pérdida de peso tal y como se ha demostrado en un trabajo paralelo realizado por nuestro grupo (ref). Con estos datos concluimos que con la detección del SNP rs2304672 podría ser útil en la predicción del éxito en el tratamiento de pérdida de peso y en la detección de individuos susceptibles al abandono del tratamiento en la práctica clínica.

B. DISCUSIÓN ESPECÍFICA POR ARTÍCULOS

B.1. Diferencias en los ritmos diarios de temperatura periférica entre mujeres obesas y normopeso. Asociación con las variables del Síndrome Metabólico.

En este estudio se comprobó si existía relación entre alteraciones en los patrones circadianos de temperatura periférica, la obesidad y el Síndrome Metabólico (SM).

Se efectuó un análisis específico de series temporales (2) de varios parámetros asociados a la temperatura, en el que se encontró una fuerte vinculación entre la obesidad y perturbaciones en los ritmos diarios de la temperatura periférica.

Los resultados obtenidos del análisis factorial, mostraron una correlación inversa y significativa entre la obesidad y la potencia del segundo armónico (P2). Este pico ultradiano es el marcador más importante de la fuerza de los ritmos de 12 horas. Estos datos se ratifican con los obtenidos del análisis del cronograma, ya que existieron diferencias marcadas en la amplitud de este pico postpandrial de temperatura periférica siendo la amplitud mayor en las mujeres normopeso, mientras que en las mujeres obesas se producía un aplanamiento significativo de la curva en este segmento (Figura 1).

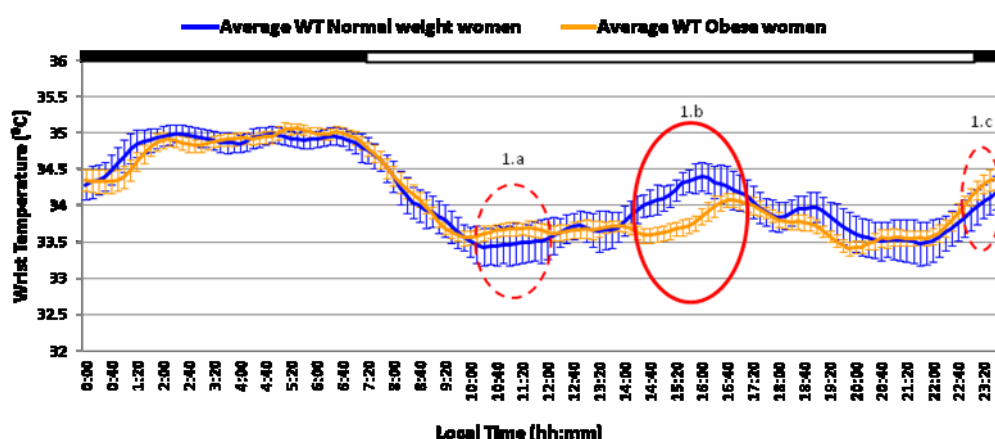


Figura 1. Representación gráfica de la temperatura media de la muñeca registrada durante un período de tres días en sujetos obesos y normopeso. La barra de color negro en la parte superior indica el período típico de dormir españoles (de 23:00 a 08:00 h). La sección de la

gráfica rodeada con una línea continua mostró diferencias significativas ($P < 0,05$) entre ambos grupos. Las secciones con líneas discontinuas no alcanzaron significaciones estadísticas.

Además, se observó que las mujeres normopeso presentaban un **marcado P2**, es decir, que tenían un ritmo de 12 horas bien diferenciado, por el contrario entre las mujeres obesas este ritmo fue significativamente menos pronunciado. Las causas que provocan esta diferencia podrían ser: las diferencias en la acción dinámica específica de los alimentos consecuentes a una ingesta de energía diferente entre ambos grupos de población, podrían ser en parte responsables de este aumento diferencial en la producción de calor postprandial entre mujeres obesas y normopeso (3). También se hipotetizó que un efecto termogénico de los alimentos menor (4, 5) o las diferencias encontradas en la duración de las siestas podrían ser las causas de la ausencia de P2 entre las mujeres obesas. Estudios previos han considerado esta variable como un marcador de cronodisrupción e incluso ha sido relacionada con alteraciones metabólicas (6).

Al seguir analizando variables de temperatura periférica, fue hallada otra relación importante, en este caso la obesidad se correlacionó positiva y significativamente con la **variabilidad intradiaria**, esta variable es indicativa de la fragmentación del ritmo, tener un valor cercano a cero es señal de un ritmo más fraccionado. Estudios realizados por otros autores, han asociado la variabilidad intradiaria con el envejecimiento (7). La población anciana suele presentar un mayor número de despertares nocturnos compensados con siestas diurnas, ambas cosas, presentes también en nuestro grupo de obesas, lo que podría explicar mayores valores de variabilidad intradiaria en dicho conjunto. Por otro lado, este aumento de variabilidad intradiaria también presentó una asociación con una disminución en la amplitud del ritmo diario de melatonina, una clara señal de cronodisrupción.

La tercera variable que mostró una correlación negativa con la obesidad en el análisis factorial fue el **valor máximo de temperatura**, los individuos obesos alcanzaron niveles máximos de temperatura menores que los normopeso. Esto puede ser debido a una disminución de la capacidad de los individuos obesos para disipar el calor a través de la vasodilatación de los vasos sanguíneos periféricos (8). En numerosos estudios, las variables de temperatura presentan un vínculo importante con alteraciones en el sueño. Los insomnes

y ancianos que duermen mal, exhiben generalmente, menores valores de temperatura periférica (9). Un buen funcionamiento de los sistemas nerviosos simpático (vasoconstricción) y parasimpático (vasodilatador) son un requisito imprescindible para un sueño equilibrado. Aunque las diferencias en los valores de temperatura medios entre obesas y normopeso puedan parecer insignificante ($0,3^{\circ}\text{C}$), esta pequeña diferencia parece ser suficiente para perturbar el ritmo circadiano. Existen estudios en los que la inducción de un ligero aumento en la temperatura de la piel ($0,4^{\circ}\text{C}$), suprime la vigilia nocturna e induce a etapas más profundas del sueño (10).

Por otro lado, investigaciones recientes apuntan que estos factores causantes de cronodisrupción no están únicamente asociados con la obesidad, también muestran relación con el Síndrome Metabólico (SM) (11). Nuestros resultados demostraron que la hora a la que un sujeto alcanza el valor máximo de temperatura periférica diaria (**acrofase**), estaba asociada con perturbaciones metabólicas características del SM. Estudios previos afirman que en sujetos denominados “vespertinos” es característico tener un retraso en la acrofase (12). Además, una mayor amplitud en los valores de temperatura periférica diaria y tener marcados ritmos de 12 horas (P2), se relacionaron significativamente con un menor riesgo de SM.

Otra observación importante de nuestro estudio, fue la encontrada al analizar la relación entre diversos reguladores hormonales de la ingesta y las variables de temperatura periférica. Los datos obtenidos mostraron que la ghrelina (hormona asociada con el apetito), estaba relacionada con la variabilidad de la temperatura. Ambos valores son marcadores tanto de ritmos circadianos como de ritmos ultradianos (13, 14, 15). Tanto la amplitud de la temperatura como el porcentaje del ritmo, indicadores de solidez circadiana, presentaron una correlación inversa con la ghrelina, datos consecuentes con estudios anteriores que muestran asociación entre aumentos de la hormona y la falta de sueño (15).

Por último, las variables de temperatura periférica se correlacionaron de manera significativa con la melatonina. Esta asociación se ratifica con estudios precedentes que muestran que el inicio de la secreción de melatonina promueve un aumento en la temperatura periférica a través de una vasodilatación cutánea (16). En este sentido, la asociación positiva que encontramos entre el **índice de melatonina**

(Medianoche/mediodía) y las variables de temperatura, corroboraría que medir la temperatura en la muñeca es un método de evaluación válido del sistema circadiano. De hecho, el ritmo diario de temperatura periférica está normalmente programado para estar en sincronía con las fases específicas del ciclo sueño-vigilia, el ritmo de melatonina pineal, y la capacidad de respuesta del marcapasos circadiano a la luz.

Una de los inconvenientes fue la realización de numerosas pruebas estadísticas lo que podría llevarnos a falsos positivos. Para abordar esta cuestión, redujimos sustancialmente el número de pruebas estadísticas, seleccionando sólo aquellas variables de temperatura periférica que mostraron máxima variabilidad en el análisis factorial.

En resumen, nuestros datos manifestaron una vinculación entre las alteraciones de la temperatura periférica y la obesidad. Las mujeres con sobrepeso/obesidad presentaron un ritmo de temperatura periférica fragmentado y aplanado, propios de un sistema circadiano envejecido. En conjunto, estos resultados fueron signo de una disminución en la capacidad de sincronización de los ritmos endógenos a través de sincronizadores externos, unos patrones de sueño y alimentación más irregulares, lo que en última instancia se traduce en un aumento del riesgo de padecer síndrome metabólico.

B.2. Perfil diario de dos marcadores circadianos “melatonina y cortisol” y sus asociaciones con los componentes del Síndrome Metabólico.

Una vez demostrada la relación entre obesidad, SM y un sincronizador externo como es la temperatura periférica, se investigó la asociación de otros marcadores importantes del sistema circadiano, como la melatonina y el cortisol y su relación con diferentes parámetros del SM y con hormonas tan relevantes en la obesidad y el SM como son la leptina, ghrelina y adiponectina.

Se observó una importante asociación entre la melatonina, el cortisol, y los parámetros que caracterizan al SM. Los patrones circadianos de melatonina y cortisol en aquellas mujeres que presentaron SM, fueron más aplanados y sutiles, además de tener valores de melatonina nocturnos significativamente más bajos. Según la bibliografía, esta alteración del patrón circadiano normal de melatonina podría ser una señal de cronodisrupción (17, 18). Estudios previos han situado las concentraciones plasmáticas

máximas de melatonina entre las 3 y las 4 horas de la madrugada, y valores muy bajos durante el día. Se ha descrito que la disminución de la concentración de melatonina durante la madrugada, propia de las mujeres con SM estudiadas, puede dar lugar a trastornos del sueño y contribuir a enfermedades crónicas relacionadas con alteraciones de los ritmos (19, 20) (Figura 2).

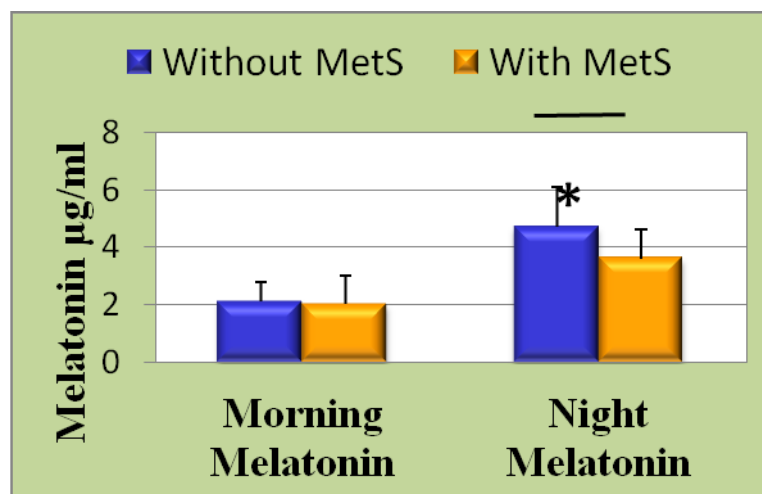


Figura 2. Diferencias entre los valores salivales de melatonina recogidos por la mañana y de madrugada en con y sin síndrome metabólico.

En muchos trastornos psiquiátricos como depresiones estacionales, trastornos bipolares, bulimia, anorexia y trastornos obsesivos compulsivos, también se ha encontrado una desincronización del patrón circadiano de melatonina (21). Sin embargo, se desconoce si estas alteraciones son causa o consecuencia de la disfunción, es un campo que se continúa investigando.

Por otro lado, se calculó la amplitud diaria de los valores salivales de cortisol medidos por la mañana y por la tarde. Se observó que las mujeres con SM mostraban una amplitud menor que el grupo control (Figura 3).

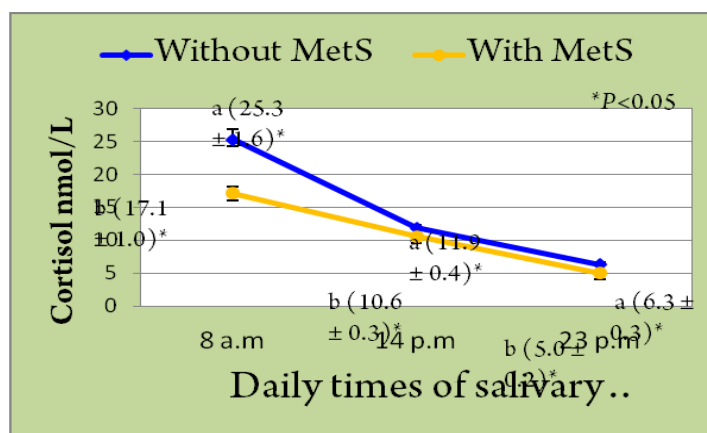


Figura 3. Diferencias en los valores de cortisol salival durante el día en los dos grupos de sujetos.

Una amplitud mayor es signo de una curva diurna normal, con picos en los valores de la mañana y bajos en la noche. Por el contrario, una amplitud media o baja, es indicativa de alteraciones en el ritmo circadiano (6).

Con el fin de investigar si existía o no una asociación entre la **melatonina**, el **cortisol**, y **las variables del SM**, se desarrolló una **puntuación** o “score” en el que se sumaba un punto por cada uno de los parámetros del SM que presentara el paciente (cintura, glucosa, triglicéridos, HDL colesterol y presión arterial) pudiendo sumar como máximo 5 puntos. El análisis de correlación de Pearson entre los cambios diarios de melatonina y de cortisol mostró que ambos marcadores circadianos estaban significativamente correlacionados entre sí, lo que nos sugirió que fisiopatológicamente afectaban de forma similar (Figura 4).

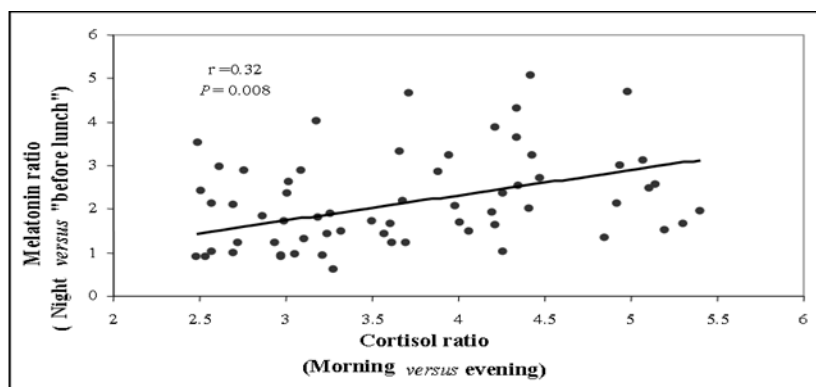


Figure 4. Correlación entre los ratios de melatonina y cortisol en las mujeres estudiadas.

Con respecto a las variables del SM, la circunferencia de la cintura se correlacionó negativamente con los valores de cortisol, melatonina y la amplitud de los mismos. El hecho que el aplanamiento del ritmo diario de cortisol se asociara con el acumulo de grasa abdominal en las mujeres estudiadas nos hizo pensar que aquellas mujeres con una respuesta patológica del eje Hipotalámico-Pituitario- Adrenal (HPA) desarrollaban una distribución androide de la grasa corporal (6). Una explicación a estos datos la podríamos encontrar en la actividad del cortisol, ya que es una hormona que activa la lipoproteína lipasa, la barrera responsable de la acumulación de lípidos en los adipocitos y con la presencia de la insulina, ya que el cortisol inhibe el sistema de movilización lipídica. Estos hechos están mediados por receptores de glucocorticoides, y se sabe que la densidad de estos receptores es más alta en grasa intra-abdominal que en otros depósitos de grasa (6).

La asociación encontrada entre la menor secreción de **melatonina** y el aumento de la obesidad abdominal, concuerda con un estudio reciente llevado a cabo en animales de experimentación, según el cual, la administración de melatonina inhibía tanto el aumento de peso corporal como los depósitos de grasa abdominal sin que influyera la ingesta de alimentaria (22). De todas formas es necesaria la realización de más estudios para explicar las vías metabólicas de esta acción.

En el caso de la **presión arterial y los lípidos plasmáticos**, obtuvimos una correlación inversa con la amplitud tanto de la melatonina como del cortisol. Estos resultados coinciden con los obtenidos en otro estudio de intervención, en el que se demostró que desajustes en el ritmo del cortisol diario, provocaban un aumento de la glucosa y de la presión arterial media, además de una reducción de la eficiencia del sueño (18, 23). Estos hallazgos ponen de manifiesto las consecuencias negativas que provocan sobre el sistema metabólico los desajustes de los ritmos circadianos, como ocurre con el jet lag y en el trabajo por turnos.

Particularmente en el caso de la melatonina, en la misma línea que nuestros resultados, diversos estudios han mostrado que las concentraciones séricas de melatonina durante la noche, se correlacionan de manera inversa tanto con el colesterol sérico total

como con el colesterol LDL, y positivamente con el HDL-colesterol (24). En este sentido, la administración oral de melatonina se ha relacionado con una disminución significativa de la presión arterial y la frecuencia cardiaca, la actividad del nervio simpático, el peso corporal, el consumo de alimentos, la cantidad de lípidos en suero, los valores de glucosa en sangre, el índice aterogénico y con mayores concentraciones de HDL. Todos estos datos corroboran la importancia del papel protector de la melatonina, y aunque los mecanismos subyacentes no están claros aún, podrían deberse a sus propiedades antioxidantes y/o a los efectos mediados por el receptor.

En definitiva, el conjunto de todos estos resultados nos confirmó que marcados ritmos circadianos tanto de melatonina como de cortisol, con amplias diferencias entre los valores diurnos y nocturnos están asociados con un estado metabólico más saludable.

En relación a la cuestión de si la leptina y la adiponectina, ambas con un importante papel en la patogénesis de la obesidad y del SM, mostraban o no asociación con la melatonina y el cortisol, obtuvimos que ambas hormonas estaban significativamente vinculadas con los valores de amplitud de ambos marcadores circadianos. Aunque los mecanismos subyacentes de dicha asociación siguen siendo desconocidos, es posible que la desregulación circadiana de ambos biomarcadores presente en las mujeres obesas, estuviera acompañada de patrones circadianos alterados de adipocinas lo que a su vez influyera sobre el equilibrio del apetito con implicaciones importantes para la aumento de la obesidad y las alteraciones del SM (25).

Por último es importante destacar la relación positiva hallada entre los valores de ghrelina y los de cortisol (Figura 5), y la ausencia de vínculo entre esta hormona con la obesidad, aunque las cantidades de ghrelina encontradas en las mujeres obesas fueron significativamente menores que en los sujetos normopeso.

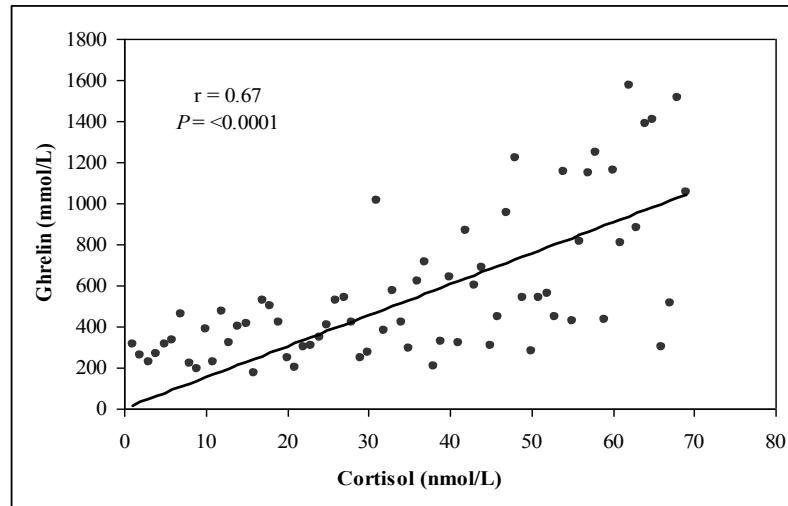


Figura 5. Correlación positiva entre el cortisol y los valores plasmáticos de ghrelina de la población estudiada.

La ghrelina es una hormona gastrointestinal que está generalmente influenciada por el equilibrio energético y se asocia de forma inversa con el índice de masa corporal (26) sin embargo, también es un secretagogo de cortisol que juega un importante papel en el apetito de los seres humanos. La administración intravenosa de ghrelina induce efectos endocrinos (aumento de ACTH y cortisol), así como un aumento del apetito y la ingesta de alimentos. La asociación entre la ghrelina y el cortisol en las mujeres estudiadas, es consecuente con trabajos previos que informan que estar sometido a un estrés psicológico puede inducir a un aumento en los niveles plasmáticos de ghrelina, el cual está asociado con una respuesta aguda del cortisol al estrés, pero este es un efecto independiente de la obesidad (27).

En resumen, nuestros resultados mostraron que una disminución en las amplitudes diarias de los patrones de melatonina y de cortisol, estaban asociadas a diversas alteraciones metabólicas, como un incremento de la circunferencia de la cintura, de la presión arterial y de la glucosa plasmática. Por otro lado, un aplanamiento de los ritmos también influyó sobre

la regulación de los lípidos, la ghrelina y los adipocitos secretores de hormonas como la leptina y la adiponectina

B.3. Horarios, duración del sueño y las comidas, en mujeres obesas y normopeso y su asociación con un incremento de la presión arterial.

En este estudio analizamos si existían diferencias entre los patrones de sueño y alimentación de mujeres con sobrepeso/obesidad en relación a las normopeso y si estas alteraciones en los mismos podían aumentar el riesgo de padecer síndrome metabólico.

El análisis del diario de sueño que cada paciente realizó durante 14 días mostró que tanto el inicio del sueño como la finalización del mismo eran similares entre los dos grupos, indicando por tanto que no existían diferencias significativas en **la duración total del sueño**. Sin embargo, es importante destacar, que hallamos un número de despertares semanales (cinco veces mayor) muy superior en el grupo de mujeres obesas (Figura 6).

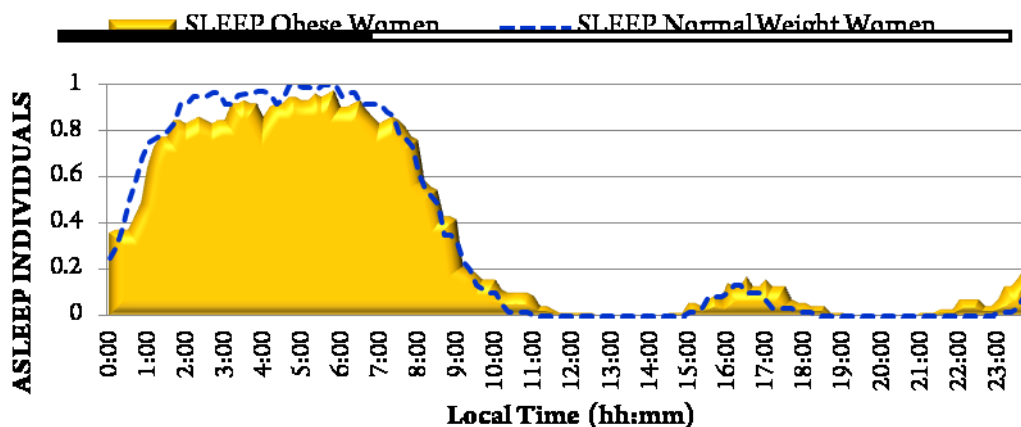


Figura 6. Representación gráfica del período de sueño recogido durante catorce días en mujeres obesas y normopeso. El valor 1 corresponde a estados de sueño y el valor 0 se refiere al periodos de despertares. La barra de color negro en la parte superior indica el intervalo de sueño habitual en España.

Estos resultados se traducen en una **disminución de la eficiencia del sueño** en los sujetos obesos, acompañado de una sensación de cansancio al despertarse por las mañanas,

compensada según el diario de sueño con siestas diurnas, ya que la duración de las siestas en este grupo también fue significativamente mayor que en mujeres normopeso.

El sueño de las mujeres obesas estudiadas se caracterizó por **una fragmentación** del mismo con despertares frecuentes y una tendencia a acostarse y levantarse más temprano. Existen estudios que avalan que despertarse frecuentemente durante la noche, es característico de un sueño menos consolidado, lo cual está asociado con el envejecimiento (28, 29, 30). En este sentido, los diarios de sueño de las mujeres obesas estudiadas, bien podían haber pertenecido a sujetos de edad avanzada. Observamos también que a diferencia del grupo control de mujeres normopeso, en el grupo de obesas no hubo ningún momento en el que todas estuvieran durmiendo a la vez, mostraron una menor eficiencia del sueño y una mayor variabilidad en el tiempo de vigilia y a la hora de acostarse. Además las mujeres obesas pasaron también, más tiempo durmiendo durante las horas diurnas que las mujeres normopeso (Figura 6).

Otro resultado notable, fue el hallazgo de una asociación significativa entre el **sueño y la ingesta de alimentos**. Las mujeres con un mayor número de despertares tendían a comer más. Estos resultados coinciden con numerosos estudios epidemiológicos realizados tanto en adultos como en niños de diferentes regiones, incluidos los países asiáticos, europeos y americanos (31, 32, 33, 34) los cuales, han descrito la existencia de un nexo entre las horas de sueño y la obesidad. Mientras que en niños las alteraciones del sueño más frecuentes han sido encontradas en la duración del sueño (35) en adultos obesos, las mayores diferencias se han debido a la eficiencia y calidad del mismo. En un estudio más reciente, Knutson y colaboradores asociaron trastornos respiratorios del sueño con la duración del sueño y la obesidad (36). No es de extrañar que esta pérdida de la eficiencia del sueño en general, se haya convertido en una queja frecuente de la población en general y sea descrita como un nuevo factor de riesgo para el desarrollo de la obesidad (37).

Al analizar la ingesta de alimentos encontramos que **comer rápido era una costumbre común en el grupo de mujeres obesas**, especialmente durante el desayuno. Estudios previos han demostrado que comer rápido está relacionado con la obesidad (38, 39). Una explicación a estos resultados podría estar en las emociones. Diversos

investigadores han descrito que las mujeres obesas, en muchos casos son comedoras emocionales (40) y tienden a comer con mayor impulsividad y ansiedad (41). En este sentido, resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación mostraban que algunas mujeres sufrían de estrés mientras comían (42), consideraban comer como una situación de estrés y, en consecuencia, tendían a comer más rápido para evitar este momento. El mecanismo de saciedad es complejo e involucra aspectos neurofisiológicos y hormonales regulados por el centro de la saciedad que tarda entre 20 y 25 minutos en aparecer, por lo tanto una comida debe durar al menos 30 minutos (43). Estos resultados podrían ayudar a entender por qué el estilo de vida actual contribuye a un consumo excesivo de alimentos en cada comida y en consecuencia a la obesidad.

Al examinar los hábitos dietéticos de ambos grupos, se observó que las mujeres obesas ingerían mayor cantidad de energía total, mayores ingestas de grasa, y un menor porcentaje de hidratos de carbono que las mujeres normopeso. Las principales diferencias las encontramos en los “snacks” (Figura 7), donde el consumo de grasas fue significativamente mayor (Figura 8).

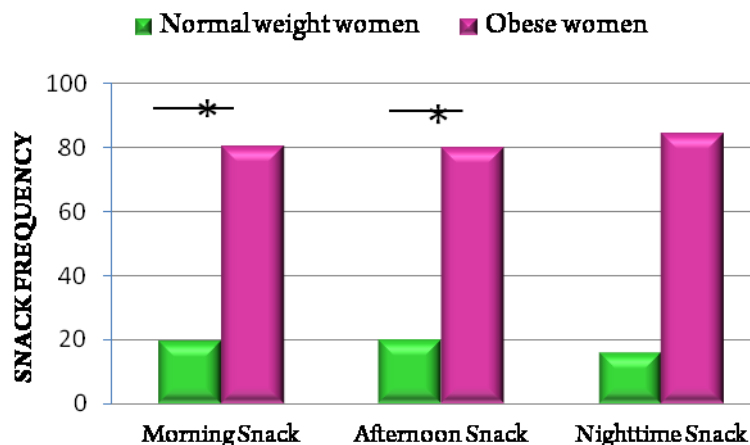


Figura 7. Porcentaje de mujeres en las los “snacks” forman parte de la dieta normal.

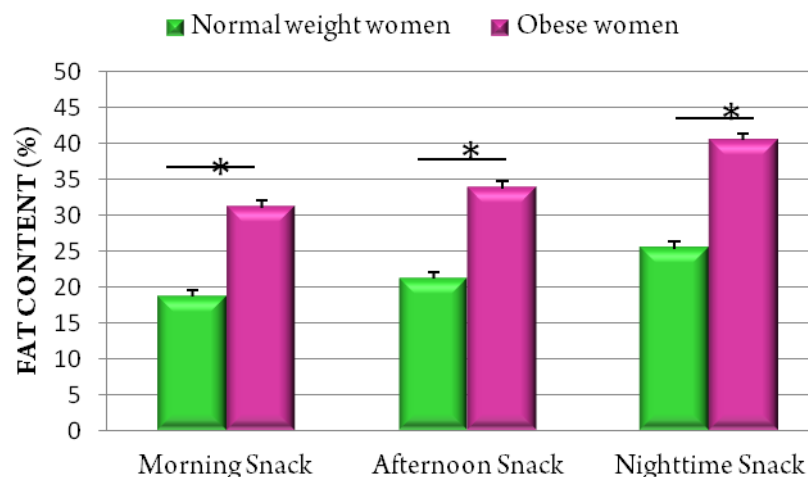


Figura 8. Diferencias en el contenido de grasa de los snacks tomados por mujeres normopeso y obesas.

Picotear durante las comidas da lugar a una mayor ingesta de grasas y de energía total, que no sería compensado por una reducción del consumo de energía durante las comidas principales. El picoteo realizado de forma frecuente tiene efectos perjudiciales sobre la termogénesis, los lípidos en ayunas y el perfil de insulina postprandrial (44).

Una de las principales cuestiones de nuestro estudio fue determinar si las **alteraciones en la eficiencia del sueño tenían algún impacto en los patrones de consumo de alimentos de nuestras pacientes**. A este respecto, se encontró que aquellas mujeres con un **mayor número de despertares nocturnos** también presentaban una **mayor ingesta de energía**. Como ya hemos mencionado, una deficiencia de sueño puede provocar aumento de peso por varias razones, entre ellas a) Tener más tiempo disponible para comer, puede aumentar la ingesta de energía total (45) b) Una disminución del gasto de energía debido al cansancio ocasionado por dormir de forma irregular (46), así como c) Cambios en la termorregulación (46). Recientemente, se han descrito estudios en los que aquellos adultos que se caracterizan por dormir poco, muestran un alto grado de desinhibición al comer, lo que conlleva un aumento del riesgo de comer demasiado y aumentar de peso (47).

Una explicación para la interacción entre el sueño y la conducta alimentaria podría ser la **ghrelina**, ya que los datos que obtuvimos mostraron una correlación inversa y

significativa entre los valores plasmáticos de **ghrelina y la duración de las comida** en las mujeres normopeso. Existen estudios que corroboran esta asociación entre la falta de sueño y la ghrelina, el hambre y el apetito se ven afectados y como resultado aumenta el riesgo de comer en exceso y aumentar de peso (46, 48, 49).

Por último, se analizó si estas alteraciones en los patrones de sueño e ingesta alimentaria podían aumentar el riesgo de padecer SM.

En primer lugar, se encontró que aquellas mujeres con un **sueño deficitario** tenían **mayores valores de grasa visceral**. Previamente, diversos autores han sugerido que posibles asociaciones entre el cortisol y la falta de vías de recuperación de la somnolencia podrían ser la causa de esta acumulación de grasa visceral (50). También es bien conocido que una mayor exposición al cortisol contribuye a mayores acúmulos de grasa en los depósitos viscerales (51). En segundo lugar, se halló otra asociación entre la eficiencia del sueño, el número de despertares y un aumento de la presión arterial. Estos resultados serían consecuentes con los obtenidos por otros estudios, entre ellos, The Sleep Heart Health Study en el que se observó una asociación entre la duración del sueño declarada por el paciente y la hipertensión (52). Otro estudio transversal francés presentó una significativa asociación negativa entre el tiempo de sueño medido por el sujeto y la presión arterial diastólica (PAD), pero no con la presión arterial sistólica (PAS) (53). Al igual que otro estudio japonés que reveló una asociación transversal entre una percepción de falta de sueño y el aumento de la PAD, pero no PAS. Nuestros datos manifestaron que el aumento de la presión arterial estaba más asociado a la eficiencia que a la duración del sueño, sin embargo en consonancia con los estudios previos nombrados, se encontró que esta asociación era más débil entre la eficiencia del sueño y la PAS que con la PAD. Una explicación fisiológica de esta asociación podría ser que la restricción del sueño provocara un aumento de la actividad del sistema nervioso simpático (54, 55, 56) y un trastorno de los ritmos circadianos (57). Para generar y organizar ritmos autónomos, el núcleo supraquiasmático requiere señales cíclicas metabólicas de la exposición a la luz, el sueño, la actividad y la alimentación. Por lo tanto, alteraciones graves en el sueño, podrían desembocar en un aplanamiento de los ritmos, provocando una alteración del ritmo circadiano de la presión arterial en individuos susceptibles (58). Estas referencias se corresponden con los resultados obtenidos, los cuales

sugieren que una mala eficiencia del sueño podría desempeñar un importante papel en la etiología de la hipertensión en algunos individuos. De todas formas, son necesarias más investigaciones para conocer con mayor exactitud los mecanismos biológicos que vinculan este proceso.

Una limitación de nuestro estudio fue que los diarios del sueño están realizados con la información facilitada por cada una de las pacientes, para futuros estudios sería más conveniente realizarlos mediante polisomnografías.

En resumen, las mujeres obesas presentaron una menor eficiencia del sueño, dormían más siestas, comían más rápido y pasaban más tiempo comiendo a lo largo del día que las mujeres normopeso. Además las mujeres obesas revelaron tener una ingesta de energía total superior, y realizar “picoteos” de forma más frecuente y con un mayor contenido en grasas que el grupo control. La eficiencia del sueño mostró estar asociada con variables del síndrome metabólico, en particular con la grasa visceral y la presión arterial.

Muchas de estos resultados son novedosas y podrían explicar las diferencias inter-individuales que existen en la ganancia de peso. Intervenciones en el tratamiento de la obesidad podrían incluir la educación de los pacientes a la hora de comer, con algunas recomendaciones como: comer sentado en la mesa, servirse pequeñas porciones, evitar distracciones como la televisión, etc. Una adecuada higiene del sueño también debe de fomentarse en la práctica clínica.

B.4. Hacia una caracterización cronobiológica de la obesidad en la práctica clínica.

Nos planteamos definir los mejores biomarcadores para detectar alteraciones circadianas relacionadas con la obesidad en la práctica clínica. Para este propósito, se estudió la obesidad desde un punto de vista cronobiológico. Se ensayaron técnicas no invasivas y fáciles de medir, las cuales se analizaron posteriormente mediante un análisis factorial.

En el **primer factor** del análisis factorial aparecieron la mayoría de las variables de **temperatura periférica**. Particularmente interesantes fueron la potencia del primer armónico (P1), la potencia del segundo armónico (P2), la amplitud, y la variabilidad intradiaria (VI). Los resultados obtenidos se corresponden con los del estudio anterior, en el que se explicó como la temperatura periférica era de gran utilidad para detectar cronodisrupción en la obesidad (18).

El segundo factor incluyó las tres medidas de **cortisol salival** (por la mañana, antes de comer y por la noche) y el índice de cortisol noche/mañana. Es significativo destacar la importancia del cortisol salival en los estudios de cronobiología, ya que puede ser recogido varias veces al día y proporciona importante información sobre el estado del sistema circadiano (59). Estudios previos han expuesto que las medidas de cortisol salival son una alternativa válida a las mediciones plasmáticas, utilizadas para determinar el grado de estrés en diferentes grupos de población (anorexia, obesidad, etc) (60, 61, 62). La principal ventaja es que las muestras salivales se obtienen mediante un procedimiento no invasivo, libre de estrés, y son más fáciles de recoger, incluso en casa, evitando muchos problemas como la falta de personal cualificado (63). Es importante resaltar que el dato que obtuvo una carga mayor en el análisis factorial, fue el del cortisol tomado por la mañana, cuando se levantaban los sujetos, lo que nos sugirió que esta primera muestra era la más útil para la práctica clínica. También es conveniente destacar que los datos de cortisol aparecieron en el mismo factor que el índice de masa corporal (IMC), la circunferencia de la cintura y el índice cintura/cadera, lo que confirmaría la relación entre el cortisol, la obesidad y la grasa abdominal.

El tercer factor del análisis contenía las **variables del diario del sueño**, en el que estaban registrados la duración total del sueño, los despertares nocturnos y las siestas. Las variables con una carga mayor fueron el inicio y el final del sueño junto con la variabilidad del mismo, que se calculó a partir de los otros dos valores. Por lo tanto, a partir de estos resultados, los pacientes, en lugar de tener que completar complicados diarios de sueño, sólo tendrían que registrar la hora a la que se acuestan y a la que se levantan. Diversos estudios revelan que un retraso en la hora habitual de irse a dormir es un importante cronodisruptor (64, 65, 66). Asimismo, tanto la exposición a la luz, como los patrones de sueño y vigilia son

dos aspectos muy relevantes del sistema circadiano y factores clave en la prevención y tratamiento de la obesidad. Por lo tanto, la mejora de la calidad y duración del sueño es un importante objetivo terapéutico en los pacientes obesos.

Por último, **el cuarto factor** incluyó la clasificación del cuestionario de Horne y Ostberg (67). Este cuestionario proporciona información acerca del cronotipo de los sujetos. Los individuos clasificados como “matutinos” experimentan durante las horas de la mañana, un mejor estado físico y mental y no presentan problemas para levantarse de la cama. Los clasificados como “vespertinos” suelen tener dificultades para levantarse por la mañana y funcionan mejor en las horas finales de la tarde o por la noche (68). Es de especial interés comentar que diversos estudios han asociado esta preferencia por las horas vespertinas a sujetos obesos, con dificultades para bajar de peso, y a algunas variantes genótípicas de los genes del reloj, tales como 3111C, también relacionados con la obesidad y el SM (49).

Un resultado sorprendente del análisis factorial fue que **la melatonina sólo apareció en el factor VIII**. Estos resultados difieren de estudios previos en los que los niveles de melatonina circulante han sido descritos como buenos marcadores biológicos de cronodisrupción y preferibles a otros marcadores circadianos al ser relativamente sólidos en presencia de diversas influencias externas (69).

Con todos estos resultados, se realizó una curva ROC (Figura 9).

Figure 1

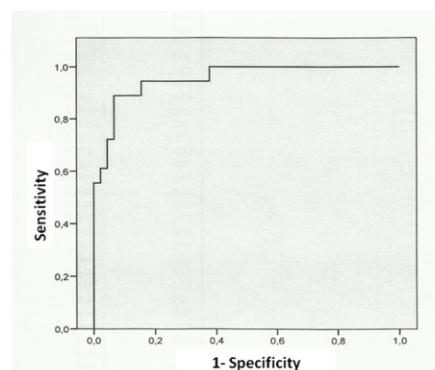


Figura 9. Receiving operator characteristic (ROC). Curva de las puntuaciones de los parámetros de la obesidad.

El análisis de la curva, mostró que las pacientes podían dividirse en dos poblaciones en función de sus alteraciones circadianas. El punto de corte para dividir a la población se encontró en un valor de 40,3 puntos, una puntuación más alta era indicativa de un riesgo importante de cronodisrupción.

Un análisis de correlación de Pearson confirmó que las puntuaciones más altas se correlacionaban positivamente con mayores porcentajes de grasa corporal, elevaciones de la presión arterial, mayores valores de glucosa y lípidos plasmáticos, excepto el colesterol HDL que se correlacionó con las puntuaciones más bajas (Figura 10).

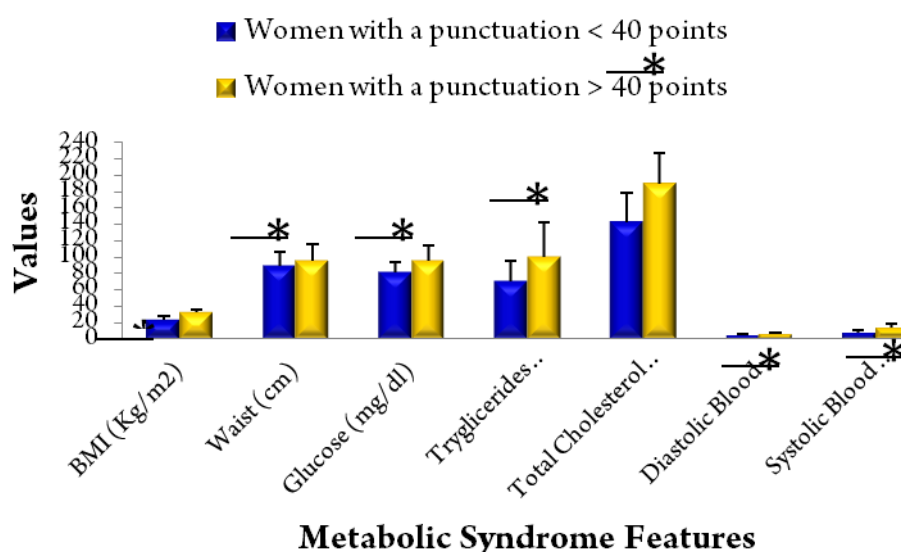


Figura 10. Características del síndrome metabólico obtenidas después de dividir a la población según la puntuación que obtuvimos (< o $\geq$ 40,3 puntos 40,3).

Por otro lado, la adiponectina también disminuyó en las mujeres con puntuaciones más altas de cronodisrupción. La adiponectina, es la proteína más abundante secretada por el tejido adiposo y está muy implicada en el metabolismo de la glucosa. Una disminución de la misma se asocia con un mayor riesgo de SM (70). La adiponectina podría ser un importante eslabón para conectar cronodisrupción y SM, aunque el mecanismo preciso que une ambos procesos no es bien conocido, las hipótesis apuntan a una desincronización interna entre diferentes ritmos circadianos (71).

Una limitación importante del estudio fue no haber podido medir la actividad física mediante un actímetro y el sueño mediante un polisomnógrafo, pero ambas técnicas son difíciles de incluir en una práctica clínica habitual.

En resumen, un registro de la temperatura periférica, junto con dos cuestiones de inicio y final del sueño, una medida de cortisol salival por la mañana y el cuestionario de Horne y Ostberg, fueron los biomarcadores más indicados para caracterizar la cronobiología de la obesidad. Estas nuevas técnicas podrían ayudarnos a utilizar nuevas herramientas terapéuticas basadas en la cronobiología para combatir esta epidemia que afecta actualmente a una gran parte de la población.

B5. Polimorfismos del gen reloj *PERIOD2* (*PER2*) en el tratamiento dietético y conductual de la obesidad. Asociación con obesidad abdominal, factores psicológicos y porcentaje de abandono.

A continuación estudiamos el gen *PER2*, diversos estudios han mostrado que la presencia de ciertos polimorfismos de este gen, se asocian con diversas alteraciones psicológicas entre las que destacan: la depresión estacional, y el trastorno bipolar (72, 73, 74). Esto nos hizo plantearnos, si en pacientes que presentaban sobrepeso u obesidad y sometidos a un tratamiento dietético, existirían alteraciones emocionales o psicológicas relacionadas con la obesidad y si estas alteraciones estarían asociadas a su vez con polimorfismos en el gen *PER2*.

Los polimorfismos estudiados del gen *PER2*, fueron el rs2304672 y el rs4663307, ambos mostraron estar asociados significativamente con la obesidad abdominal. Estos resultados se asemejan a los obtenidos en trabajos previos realizados por nuestro grupo, en los que los cultivos del tejido adiposo mostraron que del grado de expresión del *PER2* se correlacionaba inversamente con la obesidad abdominal (75).

Es de especial interés, la frecuencia del alelo menor rs2304672 fuera significativamente mayor que la del alelo mayor entre aquellos sujetos que abandonaron el tratamiento que en los que

lo completaron. Se ha demostrado que este polimorfismo da lugar a un cambio importante en la estructura del RNAm por lo que tanto la carga ribosómica como la transcripción del RNAm pueden verse afectados en estos sujetos portadores del alelo menor (76).

Curiosamente, el **cronotipo** también presentó relación con el índice cintura-cadera, los sujetos clasificados como “vespertinos” mostraron valores significativamente más altos. Lo que indica que aquellos sujetos más nocturnos presentan una mayor tendencia a la acumulación de grasa en el abdomen. Estos resultados se corresponden con los obtenidos a partir de diversos estudios epidemiológicos (77). El tratamiento de la obesidad debe tener en cuenta estos resultados y recomendar cambios de hábitos de la noche a la mañana.

Por otro lado, los pacientes que abandonaron el tratamiento, presentaron mayor obesidad, mayor número de barreras para perder peso y puntuaciones más altas en el cuestionario de “matutinidad y vespertinidad”. Existen estudios que demuestran que los sujetos “matutinos” tienden a ser más eficientes, metódicos y organizados. Mientras que los de tipo “vespertinos” son más originales, pero son más propensos a sufrir estrés (78). Estas características podrían influir en los datos. De hecho, los resultados de un modelo de regresión logística indicaron que aquellos participantes que abandonaban el tratamiento dietético presentaban menos probabilidades de planificar su alimentación, una clara señal de falta de organización.

Nuestros resultados para *PER2* rs2304672 mostraron que aquellos individuos portadores del alelo menor abandonaban con mayor frecuencia el tratamiento y presentaban en mayor medida: picoteo, estrés por la dieta, comían cuando estaban aburridos, lo que parecía indicar que presentaban ciertas características emocionales asociadas con el *PER2* (Figura 11).

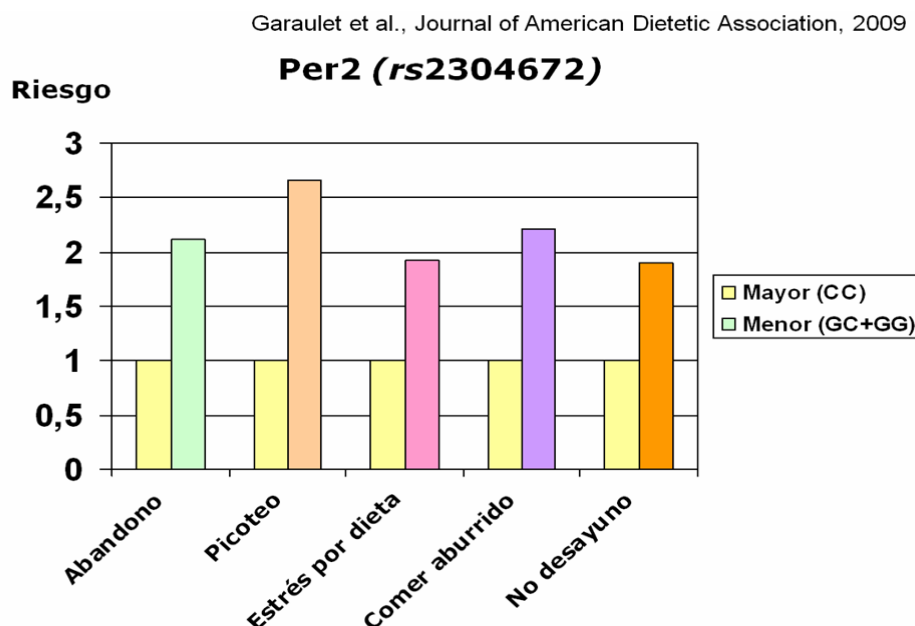


Figura 11: El análisis de regresión lineal, mostró que los sujetos portadores del alelo menor presentaron mayor probabilidad de abandono, mayor tendencia a comer entre horas, a sufrir estrés por la comida, comer cuando están aburridos y saltarse el desayuno, que aquellos sujetos que no eran portadores.

Estos resultados se podrían en parte explicar porque tanto la luz como la comida son los principales sincronizadores de los osciladores centrales y periféricos, respectivamente,, cuando comemos de forma constante, la señal periódica del tiempo de alimentación queda suprimida lo que lleva consigo la desincronización de los ritmos controlados por el Nucleo Supraquiasmático (77). Recientemente, ha sido demostrado en una gran población española que tanto comer de manera constante como saltarse el desayuno son ambos factores promotores de obesidad (79). Estas dos prácticas alimentarias las encontramos en los portadores del alelo menor del *PER2* rs2304672.

Este es el primer estudio que ha demostrado un gen reloj como el *PER2* está relacionado con el abandono del tratamiento, con conductas obesogénicas y con barreras de la pérdida de peso. Diferentes estudios indican que otros genes pueden modular la conducta alimentaria relacionados con fenotipos, tanto en niños como en adultos (80). Tal es el caso para los portadores del alelo menor del *MC4R* rs17782313-C que mostraron una tendencia mayor hacia el consumo de

bocadillos que los portadores del alelo mayor, y esto sucedió tanto en niños obesos franceses y suizos adultos obesos, así como en los adolescentes de la población general finlandesa (81).

En resumen, el gen *PER2* está implicado en el abandono del tratamiento dietético de obesidad y en los fenotipos relacionados con el comportamiento alimentario. Estos resultados podrían representar un paso hacia una atención nutricional personalizada, utilizando una caracterización genotípica y cronobiológica del individuo.

B6. El gen *CLOCK* está implicado en la peso de pacientes obesos que seguían un tratamiento dietético basado en la dieta mediterránea.

Por último examinamos los diferentes polimorfismos del gen reloj "*CLOCK*" y su posible asociación con la obesidad, la ingesta de energía y grasa.

Nuestros resultados confirmaron el importante papel del gen reloj "*CLOCK*" en la regulación del peso corporal. En concreto, cuatro de los cinco polimorfismos estudiados, **rs3749474**, **rs1801260**, **rs4864548** y **rs1464490**, se asociaron significativamente con la obesidad y el quinto (**rs4580704**) mostró una tendencia. Estos datos se corresponden con otros estudios que muestran que existe una asociación entre los polimorfismos del "*CLOCK*" rs4864548 y rs4580704 y la obesidad (82, 83).

En el caso del polimorfismo **rs3749474**, los portadores del alelo menor T mostraron un grado de obesidad y una circunferencia de cintura significativamente mayor que los portadores del alelo más importante (Figura 12).

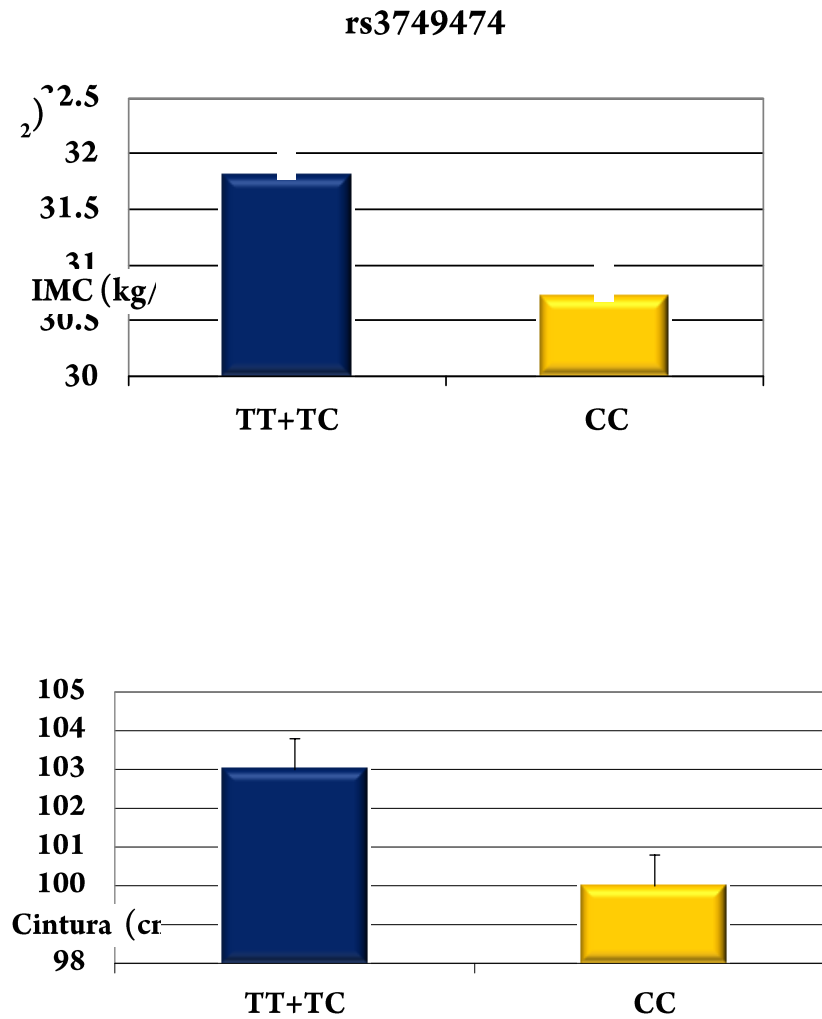


Figura 12. Asociaciones significativas entre el polimorfismo del *CLOCK* rs3749474 el IMC y la circunferencia de la cintura.

El mecanismo a través del cual este polimorfismo muestra esta particular asociación con la obesidad podría atribuirse a cambios en la estructura de ARNm. Estas asociaciones se podrían explicar porque el polimorfismo estudiado, en particular el **rs3749474**, da lugar a un cambio en la estructura del ARNm que lo hace menos viable, y por tanto el gen pierde capacidad en su función (Figura 13).

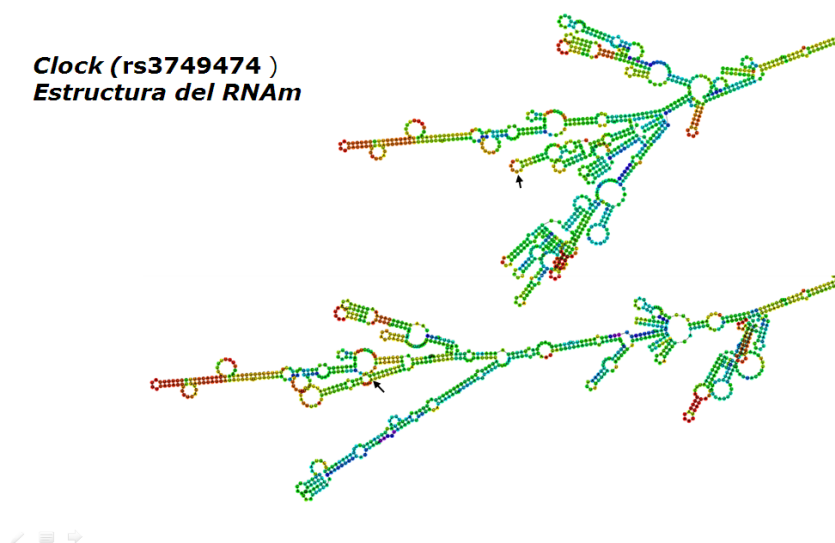


Figura 13: Estructura del mRNA (segmento 3'-UTR) del gen *CLOCK* (rs3749474).

Estos hallazgos apoyan la idea de que la evolución del oscilador circadiano tiene un papel importante en el desarrollo de la obesidad y el síndrome metabólico (71). Estudios recientes han sugerido que alteraciones en el sistema circadiano pueden contribuir a la obesidad (84). El trabajo por turnos, privaciones del sueño y la exposición a la luz brillante durante la noche se han relacionado con un aumento de la adiposidad (85). Investigaciones previas realizadas en animales de experimentación han demostrado que el ratón mutado del gen *CLOCK* es también más obeso, come más, ingiere más grasa y duerme peor (86).

En concordancia con los resultados anteriores, en un estudio previo, nuestro grupo de investigación halló evidencias que mostraban que la expresión génica del gen *CLOCK* estaba asociada con la circunferencia de la cintura y con diferentes componentes del síndrome metabólico (87). Los mecanismos que vinculan el síndrome metabólico con la interrupción del sistema circadiano aun son desconocidos. Sin embargo, la mayoría de las hipótesis sugieren que una desincronización interna entre los diferentes ritmos circadianos involucrados en el metabolismo es un factor clave en el desarrollo de dicho síndrome (88).

Por otro lado, el estudio de intervención dietética que realizamos, reveló que aquellos sujetos portadores del alelo menor en el polimorfismo **rs1801260** perdían peso con mayor dificultad a lo largo de las 30 semanas de tratamiento, en respuesta a una dieta hipocalórica, que los sujetos homocigóticos AA (Figura 14).

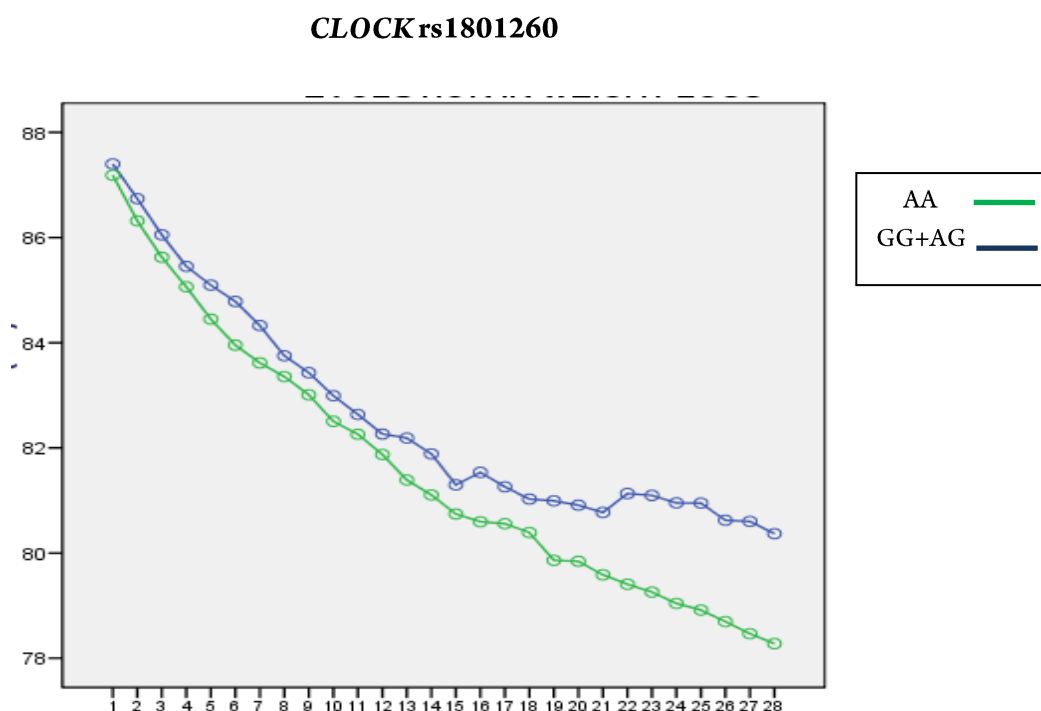


Figura 14. Variante génica del *CLOCK* rs1801260 y evolución de la pérdida de peso durante 30 semanas de tratamiento

Investigaciones previas apoyan la hipótesis de que distintos genotipos del gen *CLOCK* influyan en diferentes variables del comportamiento tanto en individuos sanos como en los que padecen alguna enfermedad mental (89). En concreto para el polimorfismo **rs1801260**, se ha demostrado que está relacionado con trastornos del estado de ánimo y con alteraciones en las fases del sueño en personas con desordenes de bipolaridad (90, 91). De hecho, nuestros pacientes informaron que la mayoría de los obstáculos que presentaban a la hora de perder peso estaban relacionados con conductas alimentarias y características psicológicas.

Es interesante resaltar que aquellos sujetos portadores del alelo menor de la variante **rs1801260** también mostraron una tendencia a dormir menos que los que portaban el alelo mayor. Estos datos coinciden con otros estudios que asocian este polimorfismo al insomnio (89) y también con estudios epidemiológicos que indican que la privación del sueño puede aumentar el riesgo de obesidad y la ganancia de peso (92). Aunque los mecanismos moleculares subyacentes a los resultados obtenidos siguen siendo desconocidos, se puede plantear la hipótesis de que los portadores del alelo menor de la variante génica **rs1801260** experimentan una interrupción en el sistema cronobiológico, similar a la experimentada por los ratones knock-out, en los cuales la pérdida del gen *CLOCK* afectaba a los comportamientos relacionados con el sueño y la alimentación (86).

Este estudio es particularmente interesante porque el tratamiento de pérdida de peso duró 30 semanas. Sorenson y cols. (93) recomiendan que para evaluar de una forma eficaz el papel de diversos polimorfismos en la pérdida de peso y detectar diferencias entre las distintas variables, son necesarias intervenciones prolongadas. De hecho, en este estudio, la las diferencias más importantes de las variantes génicas del **rs1801260**, relacionadas con las variaciones de pérdida de peso, se identificaron en el tercer mes de tratamiento. Otros estudios que también han identificado asociaciones entre variantes genéticas y la pérdida de peso en poblaciones obesas tienen duraciones de tiempo similares a los utilizados en nuestro estudio (94).

En resumen, se ha realizado un estudio de intervención en una población mediterránea que muestra una relación entre diversos polimorfismos del gen *CLOCK* y la obesidad. La variante génica **rs1801260** puede influir en los resultados de tratamientos de pérdida de peso basados en dietas hipocalóricas, ya que los portadores del alelo menor G muestran un mayor grado de obesidad y mayores dificultades en la pérdida de peso. Las diferencias se observaron durante todo el tratamiento, aunque fueron más evidentes durante el tercer mes. Estos datos sugieren que los polimorfismos del gen *CLOCK* pueden predecir la magnitud de pérdida de peso en respuesta a una dieta hipocalórica.

REFERENCIAS

1. Corbalán MD, Morales EM, Canteras M, Espallardo A, Hernández T, Garaulet M. (2009). Effectiveness of cognitive-behavioral therapy based on the Mediterranean diet for the treatment of obesity. *Nutrition*. 25(7-8):861-9.
2. Ortiz-Tudela E, Martinez-Nicolas A, Campos M, Rol MÁ, Madrid JA. (2010). A new integrated variable based on thermometry, actimetry and body position (TAP) to evaluate circadian system status in humans. *PloS Comput Biol*. 6(11):e1000996
3. Sarabia JA, Rol MA, Mendiola P, Madrid JA. (2008). Circadian rhythm of wrist temperature in normal-living subjects. A candidate of new index of the circadian system. *Physiology & Behavior*. 95:570–580.
4. Sims EA. (1989). Storage and expenditure of energy in obesity and their implications for management. *Med. Clin. North. Am.* 73:97-110.
5. Welle S. (1995). Sympathetic nervous system response to intake. *Am. J. Clin. Nutr.* 62:1118S-1122S.
6. García-Prieto MD, Tébar FJ, Nicolás F, Larqué E, Zamora S, Garaulet M. (2007). Cortisol secretory pattern and glucocorticoid feedback sensitivity in women from a Mediterranean area: relationship with anthropometric characteristics, dietary intake and plasma fatty acid profile. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 66:185-91.
7. Huang YL, Liu RY, Wang QS, Van Someren EJ, Xu H, Zhou JN. (2002). Age-associated difference in circadian sleep-wake and rest-activity rhythms. *Physiol. Behav.* 76:597-603.
8. Raymann RJ, Swaab DF, Van Someren EJW. (2007a). Skin temperature and sleep-onset latency: changes with age and insomnia. *Physiol. Behav.* 90:257–66.
9. Kistler A, Mariauzouls C, Von Berlepsch K. (1998). Fingertip temperature as an indicator for sympathetic responses. *Int. J. Psychophysiol.* 29:35–41.
10. Raymann RJ, Swaab DF, Van Someren EJW. (2008b). Skin deep: enhanced sleep depth by cutaneous temperature manipulation. *Brain*. 131:500-13.
11. Eckel RH, Alberti KGMM, Grundy SM. (2010). The metabolic syndrome. *Lancet*. 375:181-183.

12. Jauch-Chara K, Hallschmid M, Gais S, Oltmanns KM, Peters A, Born J, Schultes B. (2007). Awakening and counterregulatory response to hypoglycaemia during early and late sleep. *Diabetes*. 56:1938-42.
13. Drazen DL, Vahl TP, D'Alessio DA, Seeley RJ, Woods SC. (2006). Effects of a fixed meal pattern on ghrelin secretion: evidence for a learned response independent of nutrient status. *Endocrinology*. 147:23-30.
14. Kluge M, Schüssler P, Bleninger P, Kleyer S, Uhr M, Weikel JC, Yassouridis A, Zuber V, Steiger A. (2008). Ghrelin alone or co-administered with GHRH or CRH increases non-REM sleep and decreases REM sleep in young males. *Psychoneuroendocrinology*. 33:497-506.
15. Motivala SJ, Tomiyama AJ, Ziegler M, Khandrika S, Irwin MR. (2009). Nocturnal levels of ghrelin and leptin and sleep in chronic insomnia. *Psychoneuroendocrinology*. 34:540-545.
16. Cagnacci A. (1997). Influences of melatonin on human circadian rhythms. *Chronobiol. Int.* 14:205–220.
17. Larkin LM, Moore BJ, Stern JS, Horwitz BA. Effect of photoperiod on body weight and food intake of obese and lean Zucker rats. *Life Sci* 1991;49:735-745.
18. Corbalán-Tutau MD, Madrid JA, Ordovás JM, Smith CE, Nicolás F, Garaulet M. Differences in daily rhythms of wrist temperature between obese and normal-weight women: associations with metabolic syndrome features. *Chronobiol Int* 2011;28(5):425-33.
19. Prunet-Marcassus B, Desbazeille M, Bros A, Louche K, Delagrangé P, Renard P. Melatonin reduces body weight gain in Sprague Dawley rats with diet-induced obesity. *Endocrinology* 2003;144:5347-52.
20. Garaulet M, Ordovás JM, Madrid JA. Chronobiology, Etiology and Pathophysiology of Obesity. *Int J Obesity* 2010;34:1667-83.
21. Haus E, Smolensky M. Biological *CLOCKS* and shift work: circadian dysregulation and potential long-term effects. *Cancer Causes Control* 2006;17:489–500.
22. Pacchierotti C, Iapichino S, Bossini L, Pieraccini F, Castrogiovanni P. Melatonin in psychiatric disorders: a review on the melatonin involvement in psychiatry. *Front Neuroendocrinol* 2001;22:18-32.

23. Scheer FA, Hilton MF, Mantzoros CS, Shea SA. Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. *Proc Natl Acad Sci* 2009;106:4453-8.
24. Tamura H, Nakamura Y, Narimatsu A, Yamagata Y, Takasaki A, Reiter. Melatonin treatment in peri- and postmenopausal women elevates serum high-density lipoprotein cholesterol levels without influencing total cholesterol levels. *J Pineal Res* 2008;45:101-105.
25. Shea SA, Hilton MF, Orlova C, Ayers RT, Mantzoros CS. Independent circadian and sleep/wake regulation of adipokines and glucose in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:2537-44.
26. Suzuki K, Simpson KA, Minnion JS, Shillito JC, Bloom SR. The role of gut hormones and the hypothalamus in appetite regulation. *Endocr J* 2010;57:359-72.
27. Rouach V, Bloch M, Rosenberg N, Gilad S, Limor R, Stern N, Greenman Y. The acute ghrelin response to a psychological stress challenge does not predict the post-stress urge to eat. *Psychoneuroendocrinology* 2007;32:693-702.
28. Dijk, D.J., Duffy, J.F., Riel, E., & Shanahan, T.L, & Czeisler, C.A. (1999a). Ageing and the circadian and homeostatic regulation of human sleep during forced desynchrony of rest, melatonin and temperature rhythms. *The Journal of Physiology*, 516, 611–627.
29. Dijk, D.J., Duffy, J.F., & Czeisler, C.A. (2001b). Age-related increase in awakenings. Impaired consolidation of NREM sleep at all circadian phases. *Sleep*, 24, 565–577.
30. Hofman, M.A., & Swaab, D.F. (2006). Living by the *CLOCK*: the circadian pacemaker in older people. *Ageing Research Reviews*, 5, 33–51.
31. Taheri, S. (2006b). The link between short sleep duration and obesity: we should recommend more sleep to prevent obesity. *Archives of Disease in Childhood*, 91, 881–884.
32. Sun, Y., Sekine, M., & Kagamimori, S. (2009). Lifestyle and overweight among Japanese adolescents: the Toyama Birth Cohort Study. *Journal of Epidemiology*, 19, 303–310.

33. Shaikh, W.A., Patel, M., & Singh, S. (2009). Sleep deprivation predisposes gujarati Indian adolescents to obesity. *Indian Journal of Community Medicine*, 34, 192–194.
34. Patel, S.R., & Hu, F.B. (2008). Short sleep duration and weight gain: a systematic review. *Obesity (Silver Spring)*, 16, 643–653.
35. Garaulet, M., FB Ortega, F.B., Ruiz J.R., Rey-Lopez, P., Beghin, L., Manios, Y., Cuenca-Garcia, M., Plada, M., Diethelm, K., Kafatos, A., Molnar, D., Al-Tahan, J., & Moreno, L.A. (2011b). Short sleep duration is associated with increased obesity markers in European adolescents: effect of physical activity and dietary habits. The HELENA study. *International Journal of Obesity*, 1–10.
36. Knutsson, K.L., Zhao, X., Mattingly, M., Galli, G., & Cizza, G. (2012d). Predictors of sleep-disordered breathing in obese adults who are chronic short sleepers. *Sleep Medicine*. (Epub ahead of print).
37. Beccuti, G., & Pannain, S. (2011). Sleep and obesity. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 14, 402–412.
38. Maruyama K, Sato S, Ohira T, Maeda K, Noda H, Kubota Y, Nishimura S, Kitamura A, Kiyama M, Okada T, Imano H, Nakamura M, Ishikawa Y, Kurokawa M, Sasaki S, Iso H. (2008). The joint impact on being overweight of self reported behaviours of eating quickly and eating until full:cross sectional survey. *BMJ (Clinical Research ed.)*, 337, a2002.
39. Hashimoto H., & Ueta Y. (2011). Central effects of ghrelin, a unique peptide, on appetite and fluid/water drinking behavior. *Current protein & peptide science*, 1,12, 280-7.
40. Darby A., Hay P., Mond J., Rodgers B., & Owen C. (2007). Disordered eating behaviours and cognitions in young women with obesity: relationship with psychological status. *International Journal of Obesity*, 31, 876-82
41. Wolf E.M., & Crowther J.H. (1983). Personality and eating habit variables as predictors of severity of binge eating and weight. *Addictive behaviors*, 8, 335-44.
42. Corbalán M.D., Morales E.M., Canteras M., Espallardo A., Hernández T., & Garaulet M. (2009). Effectiveness of cognitive-behavioral therapy based on the Mediterranean diet for the treatment of obesity. *Nutrition*, 25, 861-9.

43. Gerace, T.A., & George, V.A. (1996). Predictors of weight increases over 7 years in fire fighters and paramedics. *Preventive Medicine*, 25, 593-600.
44. Farshchi, H., Taylor, M., & Macdonald, I. (2005). Beneficial metabolic effects of regular meal frequency on dietary thermogenesis, insulin sensitivity, and fasting lipid profiles in healthy obese women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 16–24.
45. Torres, S.J., & Nowson, C.A. (2007). Relationship between stress, eating behavior, and obesity. *Nutrition*, 23, 887-94.
46. Van Cauter, E., & Knutson, K.L. (2008d). Sleep and the epidemic of obesity in children and adults. *European Journal of Endocrinology*, 159, 59–66.
47. Chaput, J.P., Després, J.P., Bouchard, C., & Tremblay, A. (2011). The association between short sleep duration and weight gain is dependent on disinhibited eating behavior in adults. *Sleep*, 34, 1291-7.
48. Taheri, S., Lin L., Austin, D., Young, T., Mignot, E. (2004a). Short sleep duration is associated with reduced leptin, elevated ghrelin, and increased body mass index. *PloS Medicine*, 1, e62.
49. Garaulet, M., Sanchez-Moreno, C., Smith, C.E., Lee, Y.C., Nicolas, F., & Ordovas, J.M. (2011c). Ghrelin, Sleep Reduction and Evening Preference: Relationships to *CLOCK* 3111 T/C SNP and Weight Loss. *PloS ONE*, 6, 17435.
50. Eek, F., Karlson, B., Garde, A.H., Hansen, A.M., & Orbæk, P. (2011). Cortisol, sleep, and recovery – Some gender differences but no straight associations. *Psychoneuroendocrinology*.
51. Anagnostis, P., Athyros, V.G., Tziomalos, K., Karagiannis, A., Mikhailidis, D.P. (2009). Clinical review: The pathogenetic role of cortisol in the metabolic syndrome: a hypothesis. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, 94, 2692-701.
52. Gottlieb, D.J., Redline, S., Nieto, F.J., Baldwin, C.M., Newman, A.B., Resnick, H.E., & Punjabi, N.M. (2006b). Association of usual sleep duration with hypertension: the Sleep Heart Health Study. *Sleep*, 29, 1009–14.

53. Houyez, F., Degoulet, P., Cittee, J., Fouriaud, C., Jacquinet-Salord, M.C., Lang, T., & Aimé, F. (1990). Sleep and hypertension. An epidemiologic study in 7.901 workers. *Archives des Maladies du Coeur et des Vaisseaux*, 83, 1085–8.
54. Lusardi, P., Mugellini, A., Preti, P., Zoppi, A., Derosa, G., & Fogari, R. (1996^a). Effects of a restricted sleep regimen on ambulatory blood pressure monitoring in normotensive subjects. *American Journal of Hypertension*, 9, 503–505.
55. Lusardi, P., Zoppi, A., Preti, P., Pesce, R.M., Piazza, E., & Fogari, R. (1999b). Effects of insufficient sleep on blood pressure in hypertensive patients: a 24-h study. *American Journal of Hypertension*, 12, 63–68.
56. Beihl, D.A., Liese, A.D., & Haffner, S.M. (2009). Sleep duration as a risk factor for incident type 2 diabetes in a multiethnic cohort. *Annals of Epidemiology*, 19, 351–357.
57. Gangwisch, J.E., Heymsfield, S.B., Boden-Albala, B., Buijs, R.M., Kreier, F., Pickering, T.G., Rundle, A.G., & Zammit, G.K. & Malaspina, D. (2006a). Short sleep duration as a risk factor for hypertension: analyses of the first National Health and Nutrition Examination Survey. *Hypertension*, 47, 833–839.
58. Kreier, F., Yilmaz, A., Kalsbeek, A., Romijn, J.A., Sauerwein, H.P., Fliers, E., & Buijs, R.M. (2003). Hypothesis: shifting the equilibrium from activity to food leads to autonomic unbalance and the metabolic syndrome. *Diabetes*, 52, 2652–2656.
59. Castro M, Elias P, Quidute A, Halah F, Moreira A. (1999). Out-Patient Screening for Cushing's Syndrome: The Sensitivity of the Combination of Circadian Rhythm and Overnight Dexamethasone Suppression Salivary Cortisol Tests. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84:878-882.
60. Castro M, Elias PC, Martinelli Jr CE, Antonini SR, Santiago L, Moreira AC. (2000). Salivary cortisol as a tool for physiological studies and diagnostic strategies. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33:1171-1175.
61. Walker RF, Riad-Fahmy D, Read GF. (1978). Adrenal status assessed by direct radioimmunoassay of cortisol in whole saliva or parotid saliva. *Clin. Chemistry* 24:1460-1463.

62. Umeda T, Hiramatsu R, Iwaoka T, Shimada T, Miura F, Sato T. (1981). Use of saliva for monitoring unbound free Cortisol levels in serum. *Clin. Chim. Acta.* 110:245-253.
63. Luthold WW, Marcondes JAM, Wajchenberg BL. (1985). Salivary cortisol for the evaluation of Cushing's syndrome. *Clin. Chim. Acta.* 151: 33-39.
64. Karlsson B, Knutsson A, Lindahl B. (2001). Is there an association between shift work and having a metabolic syndrome? Results from a population based study of 27.485 people. *Occup. Environ. Med.* 58:747-752.
65. Eisenmann JC, Ekkekakis P, Holmes M. (2006). Sleep duration and overweight among Australian children and adolescents. *Acta Paediatric.* 95:956-963.
66. Snell EK, Adam EK, Duncan GJ. (2007). Sleep and the Body Mass Index and overweight status of children and adolescents. *Child. Dev.* 78:309-323.
67. Horne JA, Ostberg O. (1976). A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. *Int. J. Chronobiol.* 4:97-110.
68. Goldstein D, Hahn CS, Hasher L, Wiprzycka UJ, Zelazo PD. (2007). Time of day, Intellectual Performance, and Behavioral Problems in Morning Versus Evening type Adolescents: Is there a Synchrony Effect? *Pers. Individ. Dif.* 42:431-440.
69. Wetterberg L. (1999). Melatonin and clinical application. *Reprod. Nutr. Dev.* 39:367-82.
70. Garaulet M, Hernandez-Morante JJ, de Heredia FP, Tebar FJ. (2007a). Adiponectin, the controversial hormone. *Public. Health. Nutr.* 10:1145-1150.
71. Garaulet M, Madrid JA. (2009b). Chronobiology, genetics and metabolic syndrome. *Curr. Opin. Lipidol.* 20: 127-134.
72. Carpen JD, Archer SN, Skene DJ, Smits M, and von Schantz MJ (2005) A single-nucleotide polymorphism in the 5'-untranslated region of the hPER2 gene is associated with diurnal preference. *Sleep Res* 14(3):293-7.
73. Hamet P, and Tremblay J (2006) Genetics of the sleep-wake cycle and its disorders. *Metabolism* 55(10 Suppl 2):S7-12. Review.

74. Partonen T, Treutlein J, Alpmann A, Frank J, Johansson C, Depner M, Aron L, Rietschel M, Wellek S, Soronen P et al (2007) Three circadian *CLOCK* genes *Per2*, *Arntl*, and *Npas2* contribute to winter depression. *Ann Med* 39(3):229-38.
75. Gómez-Abellán P, Hernández-Morante JJ, Luján JA, Madrid JA, and Garaulet M (2008) *CLOCK* genes are implicated in the human metabolic syndrome. *Int J Obes* 32(1):121-8.
76. Carpen JD, Archer SN, Skene DJ, Smits M, and von Schantz MJ (2005) A single-nucleotide polymorphism in the 5'-untranslated region of the *hPER2* gene is associated with diurnal preference. *Sleep Res* 14(3):293-7.
77. Garaulet M, and Madrid JA (2009) Chronobiology, genetics and Metabolic Syndrome. Current opinion in lipidology. In press
78. Azevedo C, Sousa I, Ketema P, MacLeish M, Mondéjar MT, Sarabia JA, Rol MA, and Madrid JA (2008) Teaching Chronobiology and Sleep Habits in School and University. *Mind, Brain, and Education* 2(1):34-48
79. Marín-Guerrero AC, Gutiérrez-Fisac JL, Guallar-Castillón P, Banegas JR, and Rodríguez-Artalejo F (2008) Eating behaviours and obesity in the adult population of Spain. *Br J Nutr* 100(5):1142-8.
80. Hauner H, Hanisch J, Bramlage P, Steinhagen-Thiessen E, Schunker H, Jöckel KH, Wasem J, and Moebus S (2007) Prevalence of undiagnosed Type-2-diabetes mellitus and impaired fasting glucose in German primary care: data from the German Metabolic and Cardiovascular Risk Project (GEMCAS). *Clin Endocrinol Diabetes* 116(1):18-25.
81. Stutzmann F, Cauchi S, Durand E, Calvacanti-Proença C, Pigeyre M, Hartikainen AL, Sovio U, Tichet J, Marre M, Weill J et al (2009) Common genetic variation near *MC4R* is associated with eating behaviour patterns in European populations. *Int J Obes*. Epub ahead of print.
82. Scott EM, Carter AM, Grant PJ. Association between polymorphisms in the *CLOCK* gene, obesity and the metabolic syndrome in man. *Int J Obes* 2008; 32: 658–662.
83. Sookoian S, Gemma C, Gianotti TF, Burgueno A, Castan˜o G, Pirola CJ. Genetic variants of *CLOCK* transcription factor are associated with individual susceptibility to obesity. *Am J Clin Nutr* 2008; 87: 1606–1615.

84. Hamet P, Tremblay J. Genetics of the sleep–wake cycle and its disorders. *Metabolism* 2006; 55 (Suppl 2): S7–S12.
85. Kohler HP, Grant PJ. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2000; 342: 1792–1801.
86. Turek FW, Joshu C, Kohsaka A. Obesity and metabolic syndrome in circadian *CLOCK* mutant mice. *Science* 2005; 308: 1043–1045.
87. Gomez-Abellan P, Hernandez-Morante JJ, Lujan JA. *CLOCK* genes are implicated in the human metabolic syndrome. *Int J Obesity* 2008; 32: 121–128.
88. Hernandez-Morante JJ, Gomez-Santos C, Milagro F. Expression of cortisol metabolism-related genes show circadian rhythmic patterns in human adipose tissue. *Int J Obes* 2009.
89. Benedetti F, Radaelli D, Bernasconi A, Dallaspezia S, Falini A, Scotti G, Lorenzi C et al. *CLOCK* genes beyond the *CLOCK*: *CLOCK* genotype biases neural correlates of moral valence decision in depressed patients. *Genes Brain Behav* 2008; 7: 20–25.
90. Benedetti F, Dallaspezia S, Fulgosi MC, Lorenzi C, Serretti A, Barbini B et al. Actimetric evidence that *CLOCK* 3111 T/C SNP influences sleep and activity patterns in patients affected by bipolar depression. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2007; 144B: 631–635.
91. Lee HJ, Paik JW, Kang SG, Lim SW, Kim L. Allelic variants interaction of *CLOCK* gene and G-protein beta3 subunit gene with diurnal preference. *Chronobiol Int* 2007; 24: 589–597.
92. Van Cauter E, Knutson KL. Sleep and the epidemic of obesity in children and adults. *Eur J Endocrinol* 2008; 159 (Suppl 1): S59–S66.
93. Sørensen TI, Boutin P, Taylor MA, Larsen LH, Verdich C, Petersen L et al. NUGENOB Consortium. Genetic polymorphisms and weight loss in obesity: a randomised trial of hypo-energetic high- versus low-fat diets. *PLoS Clin Trials* 2006; 1: e12.
94. Hainer V, Zamrazilova H, Spalova J, Hainerova I, Kunesova M, Aldhoon B et al. Role of hereditary factors in weight loss and its maintenance. *Physiol Res* 2008; 57: S1–S15.

CONCLUSIONES

CONCLUSION 1: Existe una vinculación entre las alteraciones de la temperatura periférica y la obesidad. Las mujeres con sobrepeso/obesidad presentan un ritmo de temperatura periférica fragmentado y aplanado, característicos de un sistema circadiano envejecido. En conjunto, estos resultados son signo de una disminución en la capacidad de sincronización de los ritmos endógenos a través de sincronizadores externos, unos patrones de sueño y alimentación más irregulares, lo que en última instancia se traduce en un aumento del riesgo de padecer síndrome metabólico.

CONCLUSION 2: Las mujeres con sobrepeso/obesidad presentan una disminución en las amplitudes diarias de los patrones de melatonina y de cortisol, asociadas a su vez con diversas alteraciones metabólicas, como un incremento de la circunferencia de la cintura, de la presión arterial y de la glucosa plasmática. Este aplanamiento de los ritmos también influye sobre la regulación de los lípidos, la ghrelina y los adipocitos secretores de hormonas como la leptina y la adiponectina

CONCLUSIÓN 3: Las mujeres obesas presentan una menor eficiencia del sueño, duermen más siestas, comen más rápido y pasan más tiempo comiendo a lo largo del día que las mujeres normopeso. Tienen una ingesta de energía total superior, y realizan “picoteos” de forma más frecuente y con un mayor contenido en grasas. La eficiencia del sueño muestra

estar asociada con variables del síndrome metabólico, en particular con la grasa visceral y la presión arterial.

CONCLUSIÓN 4: Intervenciones en el tratamiento de la obesidad podrían incluir la educación de los pacientes a la hora de comer, con algunas recomendaciones como: comer sentado en la mesa, servirse pequeñas porciones, evitar distracciones como la televisión... Una adecuada higiene del sueño también debe de fomentarse en la práctica clínica.

CONCLUSIÓN 5: Un registro de la temperatura periférica, junto con dos cuestionarios de inicio y final del sueño, una medida de cortisol salivar por la mañana y el cuestionario de Horne y Ostberg, son los biomarcadores más indicados para caracterizar la cronobiología de la obesidad. Estas técnicas podrían ser utilizadas como nuevas herramientas terapéuticas basadas en la cronobiología.

CONCLUSIÓN 6: El gen *PER2* está implicado en el abandono del tratamiento dietético de obesidad y en los fenotipos relacionados con el comportamiento alimentario. Estos resultados podrían representar un paso hacia una atención nutricional personalizada, utilizando una caracterización genotípica y cronobiológica del individuo.

CONCLUSIÓN 7: La variante génica **rs1801260** del gen *CLOCK* puede influir en los resultados de tratamientos de pérdida de peso basados en dietas hipocalóricas, ya que los portadores del alelo menor G muestran un mayor grado de obesidad y mayores dificultades en la pérdida de peso. Las diferencias más evidentes se muestran durante el tercer mes. Por tanto, los polimorfismos del gen *CLOCK* podrían predecir la magnitud de pérdida de peso en respuesta a una dieta hipocalórica.

VALORACIÓN ANTROPOMÉTICA

Nombre:

Edad:

Código:

Fecha:

Diestro:

Zurdo:

Medidas	1	2	3
Peso (kg)			
Impedancia (%)			
Talla (cm)			
Cintura1(ombligo)			
Cintura2 (crestas)			
Cintura3(estrecha)			
Cadera(cm)			
Muslo(cm)			
Pliegue Bicipital(mm)			
Pliegue Tricipital(mm)			
Pliegue Suprailiaco(mm)			
Pliegue Subescapular(mm)			
Diametro Sagital(cm)			
Diámetro Coronal(cm)			

ANEXO II

Nombre y apellidos:

Código:

Fecha:

CUESTIONARIO INTERNACIONAL DE ACTIVIDAD FÍSICA

Las preguntas se referirán acerca del tiempo que usted utilizó siendo físicamente activo(a) en los **últimos 7 días**. Por favor responda cada pregunta aún si usted no se considera una persona activa. Por favor piense en aquellas actividades que usted hace como parte del trabajo, en el jardín y en la casa, para ir de un sitio a otro, y en su tiempo libre de descanso, ejercicio o deporte.

Piense acerca de todas aquellas actividades **vigorosas** y **moderadas** que usted realizó en los **últimos 7 días**. Actividades **vigorosas** son las que requieren un esfuerzo físico fuerte y le hacen respirar mucho más fuerte que lo normal. Actividades **moderadas** son aquellas que requieren un esfuerzo físico moderado y le hacen respirar algo más fuerte que lo normal.

PARTE 1: ACTIVIDAD FÍSICA RELACIONADA CON EL TRABAJO

La primera sección es relacionada con su trabajo. Esto incluye trabajos con salario, agrícola, trabajo voluntario, clases, y cualquier otra clase de trabajo no pagado que usted hizo fuera de su casa. No incluya trabajo no pagado que usted hizo en su casa, tal como limpiar la casa, trabajo en el jardín, mantenimiento general, y el cuidado de su familia. Estas actividades serán preguntadas en la parte 3.

1. ¿Tiene usted actualmente un trabajo o hace algún trabajo no pagado fuera de su casa?

☐ Sí

☐ No →
Pase a la PARTE 2: TRANSPORTE

Las siguientes preguntas se refieren a todas las actividades físicas que usted hizo en los **últimos 7 días** como parte de su trabajo pagado o no pagado. Esto no incluye ir y venir del trabajo.

2. Durante los **últimos 7 días**, ¿Cuántos días realizó usted actividades físicas **vigorosas** como levantar objetos pesados, excavar, construcción pesada, o subir escaleras **como parte de su trabajo**? Piense solamente en esas actividades que usted hizo por lo menos 10 minutos continuos.

_____ días por semana

☐

Ninguna actividad física vigorosa relacionada con el trabajo

**Pase a la pregunta 4**☐

No sabe/No está seguro(a)

3. ¿Cuánto tiempo en total usualmente le toma realizar actividades físicas **vigorosas** en uno de esos días que las realiza como parte de su trabajo?

horas por día

minutos por día☐

No sabe/No está seguro(a)

4. Nuevamente, piense solamente en esas actividades que usted hizo por lo menos 10 minutos continuos. Durante **los últimos 7 días**, ¿Cuántos días hizo Usted actividades físicas **moderadas** como cargar cosas ligeras **como parte de su trabajo**? Por favor no incluya caminar.

días por semana☐

No actividad física moderada relacionada con el trabajo

**Pase a la pregunta 6**

5. ¿Cuánto tiempo en total usualmente le toma realizar actividades físicas **moderadas** en uno de esos días que las realiza como parte de su trabajo?

horas por día

minutos por día☐

No sabe/No está seguro(a)

6. Durante **los últimos 7 días**, ¿Cuántos días **caminó** usted por lo menos 10 minutos continuos **como parte de su trabajo**? Por favor no incluya ninguna caminata que usted hizo para desplazarse de o a su trabajo.

días por semana☐

Ninguna caminata relacionada con trabajo

**Pase a la PARTE 2: TRANSPORTE**

7. ¿Cuánto tiempo en total pasó generalmente **caminado** en uno de esos días como parte de su trabajo?

horas por día

minutos por día

☐ No sabe/No está seguro(a)

PARTE 2: ACTIVIDAD FÍSICA RELACIONADA CON TRANSPORTE

Estas preguntas se refieren a la forma como usted se desplazó de un lugar a otro, incluyendo lugares como el trabajo, las tiendas, el cine, entre otros.

8. Durante los **últimos 7 días**, ¿Cuántos días **viajó usted en un vehículo de motor** como un tren, bus, automóvil, o tranvía?

_____ **días por semana**

☐

No viajó en vehículo de motor



Pase a la pregunta 10

9. Usualmente, ¿Cuánto tiempo gastó usted en uno de esos días **vijando** en un tren, bus, automóvil, tranvía u otra clase de vehículo de motor?

_____ **horas por día**

_____ **minutos por día**

☐

No sabe/No está seguro(a)

Ahora piense únicamente acerca de **montar en bicicleta** o **caminatas** que usted hizo para desplazarse a o del trabajo, haciendo mandados, o para ir de un lugar a otro.

10. Durante los **últimos 7 días**, ¿Cuántos días **montó usted en bicicleta** por al menos 10 minutos continuos para **ir de un lugar a otro**?

_____ **días por semana**

☐

No montó en bicicleta de un sitio a otro



Pase a la pregunta 12

11. Usualmente, ¿Cuánto tiempo gastó usted en uno de esos días **montando en bicicleta** de un lugar a otro?

_____ **horas por día**

_____ **minutos por día**

☐

No sabe/No está seguro(a)

12. Durante los **últimos 7 días**, ¿Cuántos días caminó usted por al menos 10 minutos continuos para ir **de un sitio a otro**?

_____ **días por semana**

☐

No caminatas de un sitio a otro



***Pase a la PARTE 3:
TRABAJO DE LA CASA,
MANTENIMIENTO DE
LA CASA, Y CUIDADO
DE LA FAMILIA***

13. Usualmente, ¿Cuánto tiempo gastó usted en uno de esos días **caminando** de un sitio a otro?

_____ **horas por día**

_____ **minutos por día**

☐

No sabe/No está seguro(a)

PARTE 3: TRABAJO DE LA CASA, MANTENIMIENTO DE LA CASA, Y CUIDADO DE LA FAMILIA

Esta sección se refiere a algunas actividades físicas que usted hizo en los **últimos 7 días** en y alrededor de su casa tal como como arreglo de la casa, jardinería, trabajo en el césped, trabajo general de mantenimiento, y el cuidado de su familia.

14. Piense únicamente acerca de esas actividades físicas que hizo por lo menos 10 minutos continuos. Durante los **últimos 7 días**, ¿Cuántos días hizo usted actividades físicas **vigorosas** tal como levantar objetos pesados, cortar madera, palear nieve, o excavar **en el jardín o patio**?

_____ **días por semana**

☐

Ninguna actividad física vigorosa en el jardín o patio



Pase a la pregunta 16

15. Usualmente, ¿Cuánto tiempo dedica usted en uno de esos días haciendo actividades físicas **vigorosas** en el jardín o patio?

_____ **horas por día**

_____ **minutos por día**

☐

No sabe/No está seguro(a)

16. Nuevamente, piense únicamente acerca de esas actividades físicas que hizo por lo menos 10 minutos continuos. Durante los **últimos 7 días**, ¿Cuántos días hizo usted actividades físicas **moderadas** tal como cargar objetos livianos, barrer, lavar ventanas, y rastrillar **en el jardín o patio**?

_____ **días por semana**

☐

Ninguna actividad física moderada en el jardín o patio



Pase a la pregunta 18

17. Usualmente, ¿Cuánto tiempo dedica usted en uno de esos días haciendo actividades físicas **moderadas** en el jardín o patio?

_____ **horas por día**

_____ **minutos por día**

☐

No sabe/No está seguro(a)

18. Una vez más, piense únicamente acerca de esas actividades físicas que hizo por lo menos 10 minutos continuos. Durante los **últimos 7 días**, ¿Cuántos días hizo usted actividades físicas **moderadas** tal como cargar objetos livianos, lavar ventanas, estregar pisos y barrer **dentro de su casa**?

_____ **días por semana**

☐

Ninguna actividad física moderada dentro de la casa



**Pase a la PARTE 4:
ACTIVIDADES FÍSICAS
DE RECREACIÓN,
DEPORTE Y TIEMPO
LIBRE**

19. Usualmente, ¿Cuánto tiempo dedica usted en uno de esos días haciendo actividades físicas **moderadas** dentro de su casa?

_____ **horas por día**

_____ **minutos por día**

☐

No sabe/No está seguro(a)

PARTE 4: ACTIVIDADES FÍSICAS DE RECREACIÓN, DEPORTE Y TIEMPO LIBRE

Esta sección se refiere a todas aquellas actividades físicas que usted hizo en los **últimos 7 días** únicamente por recreación, deporte, ejercicio o placer. Por favor no incluya ninguna de las actividades que ya haya mencionado.

20. Sin contar cualquier caminata que ya haya usted mencionado, durante los **últimos 7 días**, ¿Cuántos días **caminó** usted por lo menos 10 minutos continuos **en su tiempo libre**?

_____ **días por semana**

☐

Ninguna caminata en tiempo libre



Pase a la pregunta 22

21. Usualmente, ¿Cuánto tiempo gastó usted en uno de esos días **caminando** en su tiempo libre?

_____ **horas por día**

_____ **minutos por día**

☐

No sabe/No está seguro(a)

22. Piense únicamente acerca de esas actividades físicas que hizo por lo menos 10 minutos continuos. Durante los **últimos 7 días**, ¿Cuántos días hizo usted actividades físicas **vigorosas** tal como aeróbicos, correr, pedalear rápido en bicicleta, o nadar rápido en su **tiempo libre**?

_____ **días por semana**

☐

Ninguna actividad física vigorosa en tiempo libre



Pase a la pregunta 24

23. Usualmente, ¿Cuánto tiempo dedica usted en uno de esos días haciendo actividades físicas **vigorosas** en su tiempo libre?

_____ **horas por día**

_____ **minutos por día**

☐

No sabe/No está seguro(a)

24. Nuevamente, piense únicamente acerca de esas actividades físicas que hizo por lo menos 10 minutos continuos. Durante los **últimos 7 días**, ¿Cuántos días hizo usted actividades físicas **moderadas** tal como pedalear en bicicleta a paso regular, nadar a paso regular, jugar dobles de tenis, **en su tiempo libre**?

_____ **días por semana**

☐

Ninguna actividad física moderada en tiempo libre



Pase a la PARTE 5: TIEMPO DEDICADO A ESTAR SENTADO(A)

25. Usualmente, ¿Cuánto tiempo dedica usted en uno de esos días haciendo actividades físicas **moderadas** en su tiempo libre?

_____ **horas por día**

_____ **minutos por día**

☐

No sabe/No está seguro(a)

PARTE 5: TIEMPO DEDICADO A ESTAR SENTADO(A)

Las últimas preguntas se refieren al tiempo que usted permanece sentado(a) en el trabajo, la casa, estudiando, y en su tiempo libre. Esto incluye tiempo sentado(a) en un escritorio, visitando amigos(as), leyendo o permanecer sentado(a) o acostado(a) mirando televisión. No incluya el tiempo que permanece sentado(a) en un vehículo de motor que ya haya mencionado anteriormente.

26. Durante los **últimos 7 días**, ¿Cuánto tiempo permaneció **sentado(a)** en un **día en la semana**?

_____ **horas por día**

_____ **minutos por día**

☐

No sabe/No está seguro(a)

27. Durante los **últimos 7 días**, ¿Cuánto tiempo permaneció **sentado(a)** en un **día del fin de semana**?

_____ **horas por día**

_____ **minutos por día**

☐

No sabe/No está seguro(a)

Este es el final del cuestionario, gracias por su participación.

ANEXO III

Día	TENSION ARTERIAL		PRESIO N ARTER IAL EN DIAS ALTER NOS NOMB RE:
(poner la fecha)	Antes de comer	Antes de cenar	
1º			
2º			
3º			
4º			

CODIGO:

ANEXO IV**REGISTRO DE CONSUMO DE ALIMENTOS DURANTE 7 DÍAS**

Nombre y apellidos:

Código:

Fecha:

DÍA (Día de la semana:)**DESAYUNO**

Hora :

Tiempo de duración:

Nº de comensales:

Lugar:

ALMUERZO

Hora :

Tiempo de duración:

Nº de comensales:

Lugar:

COMIDA

Hora :

Tiempo de duración:

Nº de comensales:

Lugar:

MERIENDA

Hora :

Tiempo de duración:

Nº de comensales:

Lugar:

DIA	SUEÑO NOCTURNO	SIESTA	HORARIO DE COMIDAS	OBSERVACIONES
-----	----------------	--------	-----------------------	---------------

CENA

Hora :

Tiempo de duración:

Nº de comensales:

Lugar:

	H. INIC	H. FINAL	DURAC	H. INIC	H. FINAL	DURAC	HORARIO INICIO	DE	
							DES COMIDA CENA		
							DES COMIDA CENA		
							DES COMIDA CENA		
							DES COMIDA CENA		
							DES COMIDA CENA		
							DES COMIDA CENA		
							DES COMIDA CENA		
							DES COMIDA CENA		
							DES COMIDA CENA		

Nombre y apellidos:

Código:

Fecha:

VERSIÓN CASTELLANA DEL CUESTIONARIO DE MATUTINIDAD-VESPERTINIDAD DE HORNE Y OTSBERG**Nombre y apellidos:****Código:****Fecha:****PROCEDIMIENTO.**

A continuación, individualmente, deberá contestar el cuestionario de Horne y Ostberg para conocer el grado de matutinidad-vespertinidad de cada sujeto. Se trata del cuestionario mas ampliamente utilizado para conocer las tendencias comportamentales de las personas.

INSTRUCCIONES.

- Antes de contestar cada pregunta léala atentamente, por favor.
 - Conteste a todas las preguntas.
 - Conteste las preguntas consecutivamente una tras otra.
 - Debe contestar cada pregunta independientemente de las demás. No vuelva atrás para verificar sus respuestas.
 - Todas las preguntas contienen respuestas preestablecidas. En cada pregunta ponga una cruz al lado de una sola respuesta. Algunas preguntas muestran una escala, en este caso ponga una cruz en el lugar apropiado de la escala.
 - -Conteste con toda sinceridad. Tanto las respuestas como los resultados se mantendrán en estricta reserva.
 - -Si lo desea, puede escribir comentarios en el espacio existente debajo de cada pregunta.
1. Si sólo pensaras en cuando te sentirías mejor y fueras totalmente libre de planificarte el día. ¿A qué hora te levantarías?
- 5 ☐ Entre las 5 y 6: 30 de la mañana.
 - 4 ☐ Ente las 6:30 y las 8.
 - 3 ☐ Entre las 8 y 9:30 de la mañana.
 - 2 ☐ Entre las 9:30 y 11 de la mañana.
 - 1 ☐ Entre las 11 y las 12.
2. Si sólo pensaras en cuando te sentirías mejor y fueras totalmente libre de planificarte el día. ¿A qué hora te acostarías?
- 5 ☐ A las 8 - 9p.m.
 - 4 ☐ A las 9-10:30 p.m.
 - 3 ☐ A las 10:30-12:30 p.m.

- 2 ☐ A las 12:30-1:30 p.m.
1 ☐ A las 1:30-3 p.m.
3. Para levantarte por la mañana a una hora específica. ¿Hasta qué punto necesitas que te avise el despertador?
- 4 ☐ No lo necesito.
3 ☐ Lo necesito poco.
2 ☐ Lo necesito bastante.
1 ☐ Lo necesito mucho.
4. En circunstancias ambientales normales. ¿Qué tal te resulta levantarte por las mañanas?
- 1 ☐ Nada fácil.
2 ☐ No muy fácil.
3 ☐ Bastante fácil.
4 ☐ Muy fácil.
5. Una vez levantado por las mañanas. ¿Qué tal te encuentras durante la primera media hora?
- 1 ☐ Nada alerta.
2 ☐ Poco alerta.
3 ☐ Bastante alerta.
4 ☐ Muy alerta.
6. Una vez levantado por las mañanas. ¿Cómo es tu apetito durante la primera media hora?
- 1 ☐ Muy escaso.
2 ☐ Bastante escaso.
3 ☐ Bastante bueno.
4 ☐ Muy bueno.
7. Una vez levantado por las mañanas. ¿Qué tal te sientes durante la primera media hora?
- 1 ☐ Muy cansado.
2 ☐ Bastante cansado.
3 ☐ Bastante descansado.
4 ☐ Muy descansado.
8. Cuando no tienes compromisos al día siguiente. ¿A qué hora te acuestas en relación con tu hora habitual?
- 4 ☐ Raramente o nunca más tarde.
3 ☐ Menos de 1 hora más tarde.
2 ☐ De 1 a 2 horas más tarde.
1 ☐ Más de 2 horas más tarde.

9. Has decidido hacer un poco de ejercicio físico. Un amigo te propone hacerlo una hora dos veces por semana y según él la mejor hora sería de 7 a 8 de la mañana. ¿Cómo crees que te encontrarías?
- 4 ☐ Estaría en buena forma.
 - 3 ☐ Estaría en una forma aceptable.
 - 2 ☐ Me resultaría difícil.
 - 1 ☐ Me resultaría muy difícil.
10. ¿A qué hora de la noche te sientes cansado y como consecuencia necesitas dormir?
- 5 ☐ A las 8-9 p.m.
 - 4 ☐ A las 9-10:30 p.m.
 - 3 ☐ A las 10:30 pm -12:30 am
 - 2 ☐ A la 1-2 am.
 - 1 ☐ A las 2-3 am.
11. Quieres estar en tu punto máximo de rendimiento para una prueba de dos horas que va a ser mentalmente agotadora. Siendo totalmente libre de planificar el día y pensando sólo en cuando te sentirías mejor. ¿Qué horario elegirías?
- 6 ☐ De 8 a 10 de la mañana.
 - 4 ☐ De 11 de la mañana a 1 del mediodía.
 - 2 ☐ De 3 a 5 de la tarde.
 - 1 ☐ De 7 de la tarde a 9 de la noche.
12. Si te acostaras a las 11 de la noche. ¿Qué nivel de cansancio notarías?
- 0 ☐ Ningún cansancio.
 - 2 ☐ Algún cansancio.
 - 3 ☐ Bastante cansancio.
 - 5 ☐ Mucho cansancio.
13. Por algún motivo te has acostado varias horas más tarde de lo habitual, aunque al día siguiente no has de levantarte a ninguna hora en particular. ¿Cuándo crees que te despertarías?
- 4 ☐ A la hora habitual y ya no dormiría más.
 - 3 ☐ A la hora habitual y luego dormiría.
 - 2 ☐ A la hora habitual y volvería a dormirme.
 - 1 ☐ Más tarde de lo habitual.

14. Una noche tienes que permanecer despierto de 4 a 6 de la madrugada debido a una guardia nocturna. Sin tener ningún compromiso al día siguiente, ¿qué preferirías?

- 1 ☐ No acostarme hasta pasada la guardia.
 2 ☐ Echar un sueñecito antes y dormir después.
 3 ☐ Echar un buen sueño antes y un sueñecito después.
 4 ☐ Hacer toda la dormida antes de la guardia.

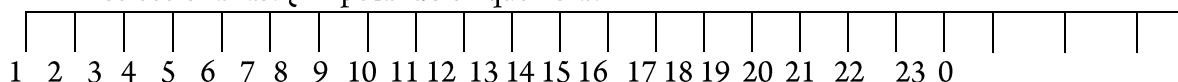
15. Tienes que hacer dos horas de trabajo físico pesado. Eres totalmente libre para planificarte el día. Pensando sólo en cuando te sentirías mejor, ¿qué horario escogerías?

- 4 ☐ De 8 a 10 de la mañana.
 3 ☐ De 11 de la mañana a 1 del mediodía.
 2 ☐ De 3 a 5 de la tarde.
 1 ☐ De 7 de la tarde a 9 de la noche.

16. Has decidido hacer ejercicio físico intenso. Un amigo te sugiere practicar una hora dos veces por semana de 10 a 11 de la noche. ¿Cómo crees que te sentaría?

- 1 ☐ Estaría en buena forma.
 2 ☐ Estaría en una forma aceptable.
 3 ☐ Me resultaría difícil.
 4 ☐ Me resultaría muy difícil.

17. Imagínate que puedes escoger tu horario de trabajo. Supón que tu jornada es de CINCO horas (incluyendo los descansos) y que tu actividad es interesante y remunerada según tu rendimiento. ¿Qué CINCO HORAS CONSECUTIVAS seleccionarías? ¿Empezando en qué hora?



- 1 ☐ Entre las 12 p.m. y las 3 a.m.
 5 ☐ Entre las 3 a.m. y las 7 a.m.
 4 ☐ A las 7
 3 ☐ Entre las 8 a.m. y la 1 p.m.
 2 ☐ Entre las 1 p.m. y las 5 p.m.
 1 ☐ Entre las 5 p.m. y las 12 p.m.

18. ¿A qué hora del día crees que alcanzas tu cota máxima de bienestar?

- 1 ☐ Entre las 12 p.m. y las 4 a.m.
- 5 ☐ Entre las 4 a.m. y las 7 a.m.
- 4 ☐ Entre las 7 a.m. y las 9 a.m.
- 3 ☐ Entre las 9 a.m. y las 4 p.m.
- 2 ☐ Entre las 4 p.m. y las 9 p.m.
- 1 ☐ Entre las 9 p.m. y las 12 p.m.

19. Se habla de personas de tipo matutino (que se encuentran más activas por la mañana) y vespertino (que se sienten más activas por la noche). ¿Cuál de estos tipos te consideras ser?

- 6 ☐ Un tipo claramente matutino.
- 4 ☐ Un tipo más matutino que vespertino.
- 2 ☐ Un tipo más vespertino que matutino.
- 0 ☐ Un tipo claramente vespertino.

CARTAS DE ACEPTACIÓN DE LOS TRABAJOS PUBLICADOS

ANEXO VII

Decision Letter (LCBI-2010-0162.R1)

From: yvan.touitou@chronobiology.fr

To: garaulet@um.es

CC: yvan.touitou@chronobiology.fr

Subject: Chronobiology International - Decision on Manuscript ID LCBI-2010-0162.R1

Body: @@date to be populated upon sending@@

Dear Dr Garaulet ,

Ref: Differences in circadian rhythms of wrist temperature between obese and normal weight women. Associations with Metabolic Syndrome features

The review of your manuscript has been completed and I am pleased to say that your paper is accepted for publication in Chronobiology International. It will be published in issue 5 of 2011. Thank you for submitting this interesting paper to Chronobiology International.

I am sending it to Dr M. Smolensky for potential English editing and formatting. After your approval of the corrections the paper will be sent to the publisher for copy editing and typesetting.

You will receive proofs for checking in due time. The publisher requests that proofs are checked and returned within 48 hours of receipt.

Besides, it is with great pleasure that I inform you of the impact factor of the journal: 3.98.

I look forward to receiving your future biological rhythm research papers

for consideration in the future.

Kind regards

Prof. Yvan Touitou, Editor in Chief
Chronobiology International

Date Sent: 12-Mar-2011

Jun 06, 2012

To: "MARTA GARAULET" garaulet@um.es

From: Randall R. Sakai physiolbehav@uc.edu

Subject: Your Submission

Ms. Ref. No.: PHB-D-11-00823

Title: Daily profile in two circadian markers "melatonin and cortisol" and associations with Metabolic Syndrome components.

Physiology & Behavior

Dear Dr. Garaulet,

I am pleased to confirm that your paper "Daily profile in two circadian markers "melatonin and cortisol" and associations with Metabolic Syndrome components." has been accepted for publication in Physiology & Behavior. I reviewed it myself. I apologize for the delay in processing your manuscript. As previously discussed, it be published in a regular issue.

Thank you for submitting your work to this journal.

A feature of Physiology & Behavior is that the journal changes the cover design of every issue. Accordingly, we would like to invite you to submit an illustration for consideration for the cover of a future issue. Illustrations should be related to your submitted article, representing the subject matter of the article, but the image need not be included in the paper. Please include the name(s) of persons who should be credited for the image on the cover, should the image be chosen. Although we cannot guarantee your illustration will be selected, the more colourful and exciting the design, the greater the chance it will be.

Cover art should be sent to: coverpicture@rug.nl.

File format should be tif or jpeg, colour mode CMYK, at around 300dpi (but 250 dpi would be OK), or eps. Dimensions (at 300dpi) should be around 125 x 95mm but any shape that fits in the space would be OK. Square or circular would be fine.

With kind regards,

Randall R. Sakai, PhD
Editor-in-Chief
Physiology & Behavior

For further assistance, please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Asunto:Acceptance of APPETITE-D-11-00561R2

Fecha: 16 Mar 2012 21:25:23 +0000

De: Nigel Bond <n.bond@uws.edu.au>

Para: garaulet@um.es

Ms. Ref. No.: APPETITE-D-11-00561R2

Title: Timing and duration of sleep and meals in obese and normal weight women. Association with increase blood pressure.

Dear Marta Garaulet,

As Action Editor for the paper on which you are Corresponding Author, I am pleased to accept for publication in Appetite the version currently under consideration with the title above. If any comments were given from review, then they are appended below.

I would like to thank you for the hard work you have put into the revised version of the manuscript. Similarly, I would like to thank the reviewers for their contribution, which I am sure you will agree has improved the final copy. I wish you all the best with your future research and hope that you will consider Appetite as an outlet for your future endeavours.

The accepted MS is subject to adjustment if there are aspects not in standard form.

The comments below may include notification of such matters. Please check the Proofs carefully for any errors that may have introduced by such amendment or other aspects of production.

Please note that you are allowed to mount the accepted version of the text of your paper on personal or institutional websites free of charge.

Thank you very much for sending your work to this journal.

With kind regards,

Nigel Bond, BSc (Hons), PhD, FAPS, FASSA

Co-Executive Editor

Appetite

Any comments by Reviewer(s) and/or Editor

Nov 17 2009

4:00PM

To: "Marta Garaulet" garaulet@um.es,lola80ct@hotmail.com

From: "Journal of the American Dietetic Association" c-zulkey@northwestern.edu

Subject: Your Submission

Ref.: Ms. No. ADAJ-D-09-00375R2

PER2 variants are associated with abdominal obesity, psycho-behavioral factors and attrition in the dietary treatment of obesity

Journal of the American Dietetic Association

Dear Dr Garaulet,

Thank you for submitting your manuscript, "PER2 variants are associated with abdominal obesity, psycho-behavioral factors and attrition in the dietary treatment of obesity," to the Journal of the American Dietetic Association. I am pleased to inform you that your revised manuscript has been accepted for publication. We appreciate your hard work and attention to reviewers' comments.

If you care to make any other significant edits prior to publication, it is imperative that you let us know immediately. Specifically we encourage you to double check the following criteria:

- * Current affiliation and job title information (and previous affiliation info if authors have changed affiliations since the submission of the article).
- * Complete, correctly formatted references with none missing, duplicated or out of order.
- * Detailed table titles and figure legends.
- * All necessary permissions obtained for tables/figures/acknowledgments.

Please remember that manuscript content and accuracy are the authors' responsibility (as well as correct contact and biographical information, including credentials and RD status).

Otherwise, we will alert you when your manuscript is scheduled for publication and when you will be receiving your PDF proofs to approve. Please note, when the proofs arrive, only minor edits, such as spelling, correction of numbers or modifying existing references, will be allowed. No rewording, redrafting or further modification of text, tables, figures or graphs can be accommodated. Making major edits close to the date of publication can delay or compromise the status of your manuscript. We urge you to please review your manuscript now and consider any final changes.

The Journal of the American Dietetic Association is officially published on the first of every month, and articles within are embargoed until that date. The American Dietetic Association may provide members of the media advance copies of articles as deemed appropriate with the expectation that reporters, journalists or other publicity agents will strictly honor the embargo. Based on their professional judgment, authors may respond to media inquiries and discuss their research with media and other publicity agents but release of embargoed articles is strictly prohibited. Rather than jeopardizing their publication status, authors are encouraged to contact the office of either the Editor-in-Chief or the Association headquarters editorial staff regarding any questions about publicizing their work.

Should you have any questions, please contact Claire Zulkey at c-zulkey@northwestern.edu (312/908-5749) . We look forward to publishing your paper and reviewing future manuscripts from you. Thank you for your interest and cooperation.

Sincerely,

Linda Van Horn, PhD, RD
Editor-in-Chief
Journal of the American Dietetic Association

