

# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

## **ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**

**Aspectos cronobiológicos de la obesidad infantil:  
relación con horarios de comida,  
actividad física y luz**

**Dña. Nuria Martínez Lozano  
2020**





Memoria presentada por

**Gda. D<sup>a</sup> NURIA MARTÍNEZ LOZANO**

para optar al GRADO DE DOCTOR por la

Universidad de Murcia, 2020.

Esta Tesis Doctoral ha sido dirigida por:

**Dra. MARTA GARAULET AZA**

Catedrática de Fisiología. Departamento de Fisiología

Universidad de Murcia, España



*El título más valioso que puedes conseguir en esta vida  
es el de ser buena persona. No lo dan las universidades,  
sólo lo otorgan los valores.*

*Anónimo.*





D<sup>a</sup>. Marta Garaulet Aza, Catedrática de Universidad del Área de Fisiología en el Departamento de Fisiología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Aspectos cronobiológicos de la obesidad infantil: relación con horarios de comida, actividad física y luz", realizada por D<sup>a</sup> Nuria Martínez Lozano, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 11 de Marzo de 2020



*A mi familia y a Oliver,  
por enseñarme el significado de amor incondicional.*



## AGRADECIMIENTOS

Nunca llegué a pensar que la parte más complicada de escribir una memoria de tesis iba a ser este apartado. Quizás es más fácil plasmar los conocimientos que aquello que nos roza el alma. Son muchos años de trabajo y emociones para expresar en tan poco espacio.

En primer lugar, quiero agradecer por el apoyo recibido a la Catedrática de Fisiología de la Universidad de Murcia y directora de esta tesis, **Marta Garaulet Aza**. Gracias por confiar tanto en mí, sabes perfectamente que has cambiado mi vida y soy otra persona años después de conocerte. Siempre he admirado esa facilidad que tienes de generar ideas tan brillantes, tu capacidad de trabajo y tu ilusión permanente por aportar ese granito de arena a la ciencia. Gracias por dejarme formar parte de tus clínicas, por descubrir un mundo que me apasiona y me ilusiona al mismo tiempo como es la Nutrición. Gracias por tanto Marta, eres una referencia para mí como para el resto del mundo.

En segundo lugar, quiero agradecer a **Gloria Barraco** el haber sido el motor de este trabajo, esta tesis es en gran medida gracias a ti. Esa italiana que vino con una beca, rebosante de alegría e ilusión y me dejó uno de los mayores regalos que pude tener en la vida, el inicio de esta aventura. Gracias Gloria por esa mente tan brillante que ideó junto a Marta este maravilloso proyecto y que con mucho esfuerzo hemos podido sacar adelante. Sabes que te quiero mucho y vas a tener una amiga siempre en España.

Y cómo no agradecer su ayuda a mi grupo de investigación, mi familia científica. Si algo tengo claro es que sin ellos yo no hubiera podido sacar esto adelante. Este puesto está muy debatido Ver-Jes, así no hay peleas, los dos en uno porque no sé cuál de ellos ha sido más importante. Nos ha unido la ciencia, pero nadie podrá separar al trío de géminis. **Jesús**, he aprendido tanto de ti, gracias por enseñarme todo lo que sabías en cronobiología desde el primer minuto que pisé el departamento y sobre todo gracias por ser tan buen amigo y buena persona. A mi **Vero**, te echo tanto de menos, gracias por alegrarme los días nublados, por ser incondicional, me has ayudado mucho tanto personal como profesionalmente y te querré eternamente.

A mi **Puri**, eres una máquina y mejor amiga. Gracias por ayudarme tanto, te mereces todo lo bueno que te pase, me vas a tener siempre, y que sepas que te quiero muchísimo. A **Bea**, otra máquina, vas a llegar donde te propongas; gracias amiga por tu apoyo incondicional. A **Maria Paz**, si algo nos caracteriza a las dos es que no hacemos mucho ruido, pero siempre conseguimos lo que nos proponemos, me alegro mucho que te vaya tan bien en Valencia. A **Laura**, gracias por apoyarme con tanto cariño, por verme mal y decirme que no te gusta verme así. Eres un encanto y sé que te van a pasar muchas cosas buenas este año. A **Teresa**, una mujer impresionante, ¡cuánto te admiro! con todas las cosas que llevas adelante y siempre con una sonrisa, transmites mucha luz, gracias por ayudarme y apoyarme en cada momento. A **Jazmín** con la que he podido formar algo que veía muy complicado, un equipo, eres una chica espectacular. A **Cristina**, con la que he llorado de la risa, por ayudarme con la cronobiología en mis inicios.

Quiero agradecer también a cada una de las personas que han pasado estos años por el equipo de investigación **Patricia, Carol, Álvaro, Susana, Nieves, Manuel, Uri y Gema** gracias por hacerme disfrutar cada momento junto a vosotros. También a todas las alumnas internas que me han ayudado, **Claudia, Ángela...** gracias de verdad, sois una parte fundamental en esta tesis.

A **Asta y Jose Cerón**, por ser incondicionales, ¡me habéis ayudado tanto con este trabajo! y siempre con una sonrisa, que estaré eternamente agradecida ¡qué suerte he tenido de conocerlos!

A **Rafael Ríos**, otra persona fundamental en esta tesis doctoral, por no admitir un “no” por respuesta y por hacer tan bien tu trabajo desde los inicios. Gracias Rafael por confiar en nuestro trabajo y ejecutarlo mejor aún.

Gracias **Pepe y Juana** del SACE, por proporcionarme todos los medios para llevar a cabo los análisis necesarios para esta tesis doctoral. A **María Dolores y Régulo** del servicio de radioprotección, verdaderos profesionales y mejores personas.

Quiero agradecer también su apoyo a todos los profesores del Departamento de Fisiología, **Elvira, Paquita, Javier, Jorge, Pilar, Juan Fran, Salvador y Jose Ángel** y a compañeros de sus grupos en especial a **Antonio, Domingo y María**.

A **Juan Antonio Madrid**, la primera persona a la que escuché hablar de cronobiología, dije que ni de broma me iba a dedicar a esto, y mirad donde estoy. Gracias por hacer de la ciencia un cuento, como profesor y científico eres maravilloso.

A los colegios que han aceptado participar en este proyecto (**San Pablo, San Antonio y Maristas**) y sobre todo a **Mari Carmen Blaya, María José Martínez y Jose Ignacio Peña** gracias por recibirnos siempre con las puertas abiertas, todo es mucho más sencillo por personas como vosotros.

A mis **niños** de los colegios, por la ilusión transmitida con sus “relojes mágicos”, nunca se me olvidará lo bien que lo hicieron. Tampoco me quiero olvidar de sus padres que ayudaron en todo momento a la recogida de datos, lo peor sin duda comentado por muchos era levantar a esas criaturas a la 01:00h de la madrugada para recoger saliva en un algodón. Gracias porque sin vosotros esto nunca hubiera sido posible.

A todos los **pacientes de la Clínica Garaulet** por hacerme crecer tanto profesional como personalmente. Ellos hacen que disfrute y ame mi trabajo.

A mis amigas, que son la base de mi infancia **Juani, Sonia, Paqui y Gregorio** os quiero tanto que por mucho tiempo que pase siempre será así, y mis amigas de Biología, **Nkiru, Inma, Raquel, Sara, y Mahe**, grandes profesionales y mejores personas, por demostrarme que el tiempo no es impedimento de una amistad verdadera, os quiero mucho.

A mis abuelas, **Isabel y Águeda**, esta tesis va por vosotras, ejemplo de mujeres trabajadoras y luchadoras, y a mis abuelos **Pedro y Juan**, que desde alguna parte seguro que estarán muy contentos de verme tan feliz y orgullosos de mi trabajo, cuánto os echo de menos y cuánta falta me hacéis.

A mi suegra **Inés**, gracias por tratarme como una hija más, eres maravillosa, normal que todo el mundo te quiera. A mis **cuñados y mis sobrinos** por abrirme las puertas de su casa desde el primer día, os quiero mucho.

A **Bambi, Dolce y Chanel** mis compañeros más incondicionales, gracias por alegrarme los momentos más tristes y no hacerme sentir sola nunca.

A mis hermanos, **Álvaro y Antonio**, sois mi vida, espero haber estado a la altura de ser vuestra hermana mayor, siempre he intentado cuidaros, protegeros y quiero lo mejor para vosotros, tengo mucha suerte de teneros.

Agradecer a toda mi familia, tíos, primos, en especial a mis padrinos **Manolo y Antonia**, a mis primos **Vero y Juan Manuel** y a mis tíos **Ana y Domingo** por confiar siempre en mí.

Esta tesis también va por ti, **Amanda**, porque tú también has sido ejemplo de esfuerzo y superación, tu familia nunca te olvidará.

Por último, agradecerle todo a mis padres, **Antonio**, mi mayor ejemplo de humildad y trabajo. Quiero que sepas que te quiero con todo mi corazón, papá, aunque no te lo diga muy a menudo, y a mi madre, **Mercedes**, mi pilar fundamental y el otro yo, gracias por tanto mamá. Gracias a los dos por luchar por mí, por darme la mejor educación que he podido tener y por confiar y apoyarme en cada una de mis decisiones. Y a ti **Oliver**, por ser mi apoyo más incondicional, gracias por cuidarme, protegerme y tirar de mí en mis momentos de flaqueza, eres el causante de mis días más felices.



Rosalie Durand, 10 años, Niza, Francia, fotografiada el 18 de agosto de 2017, rodeada de su alimentación habitual. Daily Bread, serie fotográfica de Gregg Segal.

Link: <https://www.greggsegal.com/P-Projects/Daily-Bread/22/thumbs>.

## ÍNDICE



<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Cronobiología.....</b>	<b>3</b>
1.1. ¿Qué es la cronobiología? .....	3
1.2. Organización del sistema circadiano .....	4
<b>2. ¿Qué es el cronotipo? Y ¿cómo se evalúa? .....</b>	<b>6</b>
2.1. Cronotipo subjetivo .....	7
2.2. Cronotipo objetivo.....	8
<i>a) Inicio de la subida de melatonina con luz tenue (Dim Light Melatonin Onset (DLMO)).....</i>	<i>8</i>
<i>b) Actimetría .....</i>	<i>9</i>
<i>c) Temperatura corporal .....</i>	<i>10</i>
<i>d) TAP (Temperatura, actividad y Posición). .....</i>	<i>12</i>
<i>e) Cortisol.....</i>	<i>13</i>
<i>f) Melatonina .....</i>	<i>14</i>
<b>3. Sincronizadores externos del reloj interno.....</b>	<b>15</b>
3.1. La hora de la comida como sincronizador.....	15
3.2. La actividad física como sincronizador .....	16
3.3. La luz como sincronizador .....	17
<b>4. Cronodisrupción: obesidad y salud cardiometabólica.....</b>	<b>18</b>
4.1. Cronodisrupción .....	18
4.2. Obesidad .....	21
4.3. Salud cardiometabólica .....	22
<b>5. El uso de saliva para la determinación de la salud cardiometabólica: biomarcadores de inflamación .....</b>	<b>23</b>
<b>6. Cronobiología en niños.....</b>	<b>24</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>1</b>
<b>I. Estado actual y objetivo general.....</b>	<b>31</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>32</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Material y métodos comunes a todos los objetivos .....</b>	<b>35</b>
1.1. Población de estudio.....	35
1.2. Mediciones antropométricas y composición corporal.....	35
1.3. Herramientas circadianas en la población infantil.....	36
<i>a) Cuestionarios de alimentación y sueño .....</i>	<i>36</i>
<i>b) Cronotipo subjetivo .....</i>	<i>36</i>
<i>c) Cortisol y melatonina .....</i>	<i>36</i>
<i>d) Medida de la temperatura corporal periférica, actividad física y posición corporal. ....</i>	<i>37</i>
<i>e) Variable integradora TAP (Temperatura, Actividad y Posición) y sueño... ..</i>	<i>38</i>
<b>2. Material y métodos específicos según los objetivos .....</b>	<b>39</b>
2.1. Población adulta ( <i>Objetivo 1</i> ).....	39
2.2. Medición de la luz ( <i>Objetivo 1 y 3</i> ) .....	39
2.3. Cronotipo objetivo ( <i>Objetivo 3</i> ) .....	39
2.4. Clasificación en cenadores tardíos (LDE) y tempranos (EDE) ( <i>Objetivo 4</i> ) ..	39
2.5. Biomarcadores en saliva y suero ( <i>Objetivo 2, 3, 4 y 5</i> ).....	40
2.6. Notas académicas ( <i>Objetivo 4</i> ).....	41
<b>3. Análisis estadísticos .....</b>	<b>41</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
<b>1. Resultados específicos para el objetivo 1.....</b>	<b>51</b>
<b>2. Resultados específicos para el objetivo 2.....</b>	<b>57</b>

3. Resultados específicos para el objetivo 3 .....	66
4. Resultados específicos para el objetivo 4 .....	73
5. Resultados específicos para el objetivo 5 .....	78
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>91</b>
1. Discusión general .....	93
2. Sobre el desarrollo de un score circadiano constituido por técnicas no invasivas y la diferente salud circadiana entre niños y niñas. ....	95
3. Sobre el uso de la saliva como herramienta no invasiva para la evaluación de biomarcadores metabólicos e inflamatorios en niños.....	99
4. Sobre el papel del cronotipo evaluado objetivamente en niños y la relación con el riesgo metabólico, jet lag social, alteraciones del sueño y notas académicas	102
5. Sobre la importancia de una alimentación tardía, la relación con la obesidad y alteraciones metabólicas y circadianas en niños de edad escolar .....	106
6. Sobre la importancia del ritmo de actividad, la relación con la obesidad y alteraciones metabólicas en niños .....	109
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>111</b>
Conclusión general .....	120
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>115</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>137</b>
<b>PRODUCCIÓN CIENTÍFICA</b> .....	<b>145</b>
<b>CUESTIONARIOS</b> .....	<b>151</b>



Frank Fadel Agbomenou, 8 años, Dakar, Senegal, fotografiado el 30 de agosto de 2017, rodeado de su alimentación habitual. Daily Bread, serie fotográfica de Gregg Segal.

Link: <https://www.greggsegal.com/P-Projects/Daily-Bread/22/thumbs>

## ABREVIATURAS



## **ABREVIATURAS**

<b>A</b>	Actividad
<b>AR</b>	Amplitud relativa
<b>CFI</b>	Índice de Funcionalidad Circadiana
<b>CI</b>	Intervalo de confianza
<b>DE</b>	Desviación estándar
<b>DIT</b>	Termogénesis Inducida por la Dieta
<b>EDE</b>	Early Dinner Eaters (cenadores tempranos)
<b>HGF</b>	Factor de crecimiento de hepatocitos
<b>IL1 <math>\beta</math></b>	Interleuquina 1 $\beta$
<b>IL6</b>	Interleuquina 6
<b>IL8</b>	Interleuquina 8
<b>IMC</b>	Índice de Masa Corporal
<b>IS</b>	Estabilidad interdiaria
<b>LDE</b>	Late Dinner Eaters (cenadores tardíos)
<b>MCP1</b>	Proteína quimioatrayente de monocitos-1
<b>MCTQ</b>	Cuestionario de Munich
<b>NGF</b>	Factor de crecimiento nervioso
<b>ONTIME-Jr</b>	Obesidad, Nutrigenética, Tiempo, Mediterránea, Junior
<b>OR</b>	Odds ratio
<b>P</b>	Posición
<b>PCR</b>	Proteína C reactiva
<b>PR</b>	Porcentaje de ritmicidad
<b>T</b>	Temperatura

**TAP**            Temperatura, Actividad, Posición

**TNF  $\alpha$**         Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$

## GLOSARIO

- **Acrofase:** período de tiempo durante el cual el ciclo diario de una variable alcanza su punto máximo.
- **Amplitud:** diferencia entre el valor máximo (o mínimo) de la función coseno y el mesor.
- **Amplitud relativa (RA):** diferencia entre el promedio de las mediciones hechas durante las 5 horas consecutivas de máximos valores (M5) y la media de las mediciones hechas durante las 10 horas consecutivas con el mínimo valor (L10), dividido por la suma de ambos valores (M5+L10).
- **Contraste día-noche:** diferencia entre el promedio de mediciones durante las 5 horas consecutivas de máximo TAP y el promedio de mediciones realizadas durante las 10 horas consecutivas del mínimo TAP dividido por la suma de ambos valores.
- **Cosinor:** procedimiento para el análisis de ritmos biológicos basado en la adaptación de una onda cosenoidal a los datos brutos.
- **Cronobiología:** (“kronos” de tiempo, “bios” de vida y “logos” de estudio) es la ciencia que estudia todos estos fenómenos periódicos o ritmos biológicos que se producen en los seres vivos.
- **Cronotipo matutino:** característica del sujeto que encuentra su estado de máximo rendimiento por la mañana.
- **Cronotipo vespertino:** característica del sujeto que encuentra su estado de máximo rendimiento por la noche.
- **Cuestionario de Munich (MCTQ):** consta de 17 preguntas simples sobre el comportamiento del ciclo sueño y vigilia. Estas preguntas abordan la hora de acostarse, y hora de levantarse por separado para días laborables y días libres. Utiliza los centros del sueño para la clasificación del sujeto.
- **Cuestionario matutino-vespertino (MEQ):** consta de una escala de 19 ítems desarrollado por Horne y Östberg, con la que se obtiene una puntuación que clasifica al sujeto en matutino, indefinido o vespertino.
- **Estabilidad interdiaria (IS):** regularidad del ritmo. Sus valores oscilan entre 0 y 1. Cuanto más se acerque al valor 1 el ritmo presenta una mejor estabilidad, es decir, se repite exactamente día tras día.
- **Factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ):** proteína del grupo de las citoquinas liberadas por las células del sistema inmunitario que interviene en la inflamación y en la

apoptosis. En la obesidad se produce por el tejido adiposo y presenta acciones proinflamatorias locales y sistémicas.

**-Fase del ritmo o acrofase:** hora en el que ritmo alcanza su máximo valor.

**-Hábitos regulares:** derivado de la estabilidad interdiaria (IS), determina la constancia del patrón rítmico de 24 h durante los 7 días. Un ritmo estable se caracteriza por un perfil de 24 horas muy similar día a día.

**-HOMA-IR:** representa las siglas en inglés del modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina ("homeostatic model assessment").

**-Interleuquina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ):** citocina proinflamatoria implicada en las respuestas inmunes agudas y en las enfermedades inflamatorias crónicas. Se libera ante el daño celular o en caso de infecciones por diferentes células inmunes, entre ellas los monocitos y los macrófagos

**-Interleuquina 6 (IL-6):** citocina proinflamatoria cuya función más importante es ser la principal reguladora de la respuesta inflamatoria aguda. Es una citocina pleiotrópica que juega un papel crítico en la inflamación crónica al estimular la síntesis de Proteína C reactiva (PCR). Es producida por células endoteliales, fibroblastos, monocitos, y macrófagos en respuesta a diferentes estímulos (IL-1 $\beta$ , IL-17, y TNF- $\alpha$ ) durante la inflamación sistémica.

**-Interleuquina 8 (IL8):** citocina proinflamatoria producida por una variedad de células después de la estimulación con IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17, TNF- $\alpha$  entre otras. Es un potente factor quimiotáctico de neutrófilos, que induce la expresión de integrinas, favoreciendo su adhesión a células endoteliales.

**-Índice de funcionalidad circadiana (CFI):** índice numérico que determina la robustez circadiana basado en tres parámetros circadianos: estabilidad interdiaria, variabilidad intradiaria y la amplitud relativa. CFI se calculó como el promedio de estos tres parámetros. En consecuencia, CFI oscila entre 0 (ausencia de ritmicidad circadiana) y 1 (ritmo circadiano robusto).

**-Inmunoglobulina A (IgA):** es una inmunoglobulina dominante de las superficies mucosas, pero también está presente en el plasma. Su función fisiológica principal es la defensa de las superficies mucosas contra la infección. El efecto antiinflamatorio de la IgA desempeña un papel crucial en la fisiología y en la prevención del daño tisular en múltiples enfermedades autoinmunes e inflamatorias en adultos.

**-Jet lag social:** síndrome que ocurre cuando el reloj biológico de nuestro cuerpo y nuestros horarios sociales no coinciden. Se refiere a la diferencia entre el centro del

sueño de los días no laborables y los laborables. Cuando esta diferencia es mayor a 2h se considera que existe jet lag social.

**-L10:** promedio de las diez horas consecutivas de valores mínimos del ritmo de temperatura y su hora TL10.

**-TL5:** promedio de las cinco horas consecutivas de valores mínimos del ritmo de actividad y posición y su hora TL5.

**-M10:** promedio de las diez horas consecutivas de valores máximos del ritmo de actividad y posición y su hora TM10.

**-M5:** promedio de las cinco horas consecutivas de valores máximos del ritmo de temperatura y su hora TM5.

**-Mesor:** valor medio del ritmo ajustado a una función coseno que por lo general coincide con la media.

**-Núcleo supraquiasmático (NSQ):** también llamado reloj central, está formado por un conjunto de neuronas situadas en el hipotálamo, y se encarga de regular los ciclos circadianos y el control de la secreción de melatonina. Es el principal reloj biológico interno o marcapasos en los mamíferos.

**-Factor de crecimiento nervioso (NGF):** es una proteína presente en el sistema nervioso y otros sistemas del cuerpo humano, necesaria para la supervivencia y desarrollo de las neuronas en el período embrionario.

**-Porcentaje del ritmo (PR):** porcentaje de varianza de datos explicado por la función sinusoidal. Valores más altos de este parámetro significan una curva más sinusoidal.

**-Profundidad de sueño (%):** promedio de las cinco horas de mínimos valores del TAP. La profundidad del sueño es más elevada cuando los valores de TAP son más bajos. Se expresa en tanto por ciento.

**-Proteína C reactiva (PCR):** es una proteína de fase aguda y sus valores aumentan dramáticamente durante los procesos inflamatorios que ocurren en el cuerpo. Este incremento se debe a un aumento en la concentración plasmática de IL-6, que es producida por macrófagos, células endoteliales y linfocitos T y adipocitos.

**-Proteína-1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1 / CCL2):** quimiocinas clave que regula la migración y la infiltración de monocitos/macrófagos. Surge en respuesta a la inflamación.

**-Rayleigh:** evalúa la distribución de la acrofase dentro de un período de 24 horas. Esta prueba proporciona un vector  $r$  con su origen en el centro de una circunferencia de radio igual a uno. La longitud del vector  $r$  (entre 0 y 1) es proporcional al grado de

homogeneidad de fase durante el período analizado y puede considerarse como una medida de la estabilidad de fase del ritmo durante los 7 días sucesivos.

**-Ritmos circadianos:** procesos que ocurren o funcionan en ciclos de aproximadamente 24 horas.

**-Sincronizador:** estímulo capaz de restablecer un marcapasos o sincronizar una oscilación con el medio ambiente.

**-TM5:** Hora media de las cinco horas de máximo valor de un ritmo. Se utiliza como marcador de fase para el ritmo de temperatura.

**-TM10:** hora media de las diez horas de mínimo valor de un ritmo. Se utiliza como marcador de fase para el ritmo de actividad.

**-Variabilidad intradiaria (IV):** fragmentación del ritmo. Sus valores oscilan entre 0 y 2. Cuanto más se acerque al valor 0 la onda es perfectamente sinusoidal y el ritmo es menos fragmentado.

**-Zeitgebers:** señales ambientales rítmicas capaces de modificar la duración del ciclo o período al que oscila el reloj endógeno y que en su conjunto se actúan como entradas al reloj.



Andrea Testa, 9, Catania, Italia, fotografiado el 23 de agosto de 2017.  
rodeado de su alimentación habitual. Daily Bread, serie fotográfica de Gregg Segal.  
Link: <https://www.greggsegal.com/P-Projects/Daily-Bread/22/thumbs>

## INTRODUCCIÓN



# 1. Cronobiología

## 1.1. ¿Qué es la cronobiología?

La vida puede entenderse como un fenómeno rítmico. Cuando estudiamos cualquier actividad vital relacionada con el tiempo, nos encontramos con oscilaciones que indican que estas actividades no siempre se desarrollan de manera continua. Esto es debido a que los organismos vivos presentan un gran número de procesos periódicos y previsible que se denominan ritmos biológicos (1). Los ritmos biológicos se definen como oscilaciones de las variables biológicas en intervalos regulares de tiempo. Gracias a la correcta oscilación cíclica de estos ritmos, los organismos pueden predecir y anticiparse a los cambios medioambientales, así como adaptar temporalmente sus funciones conductuales y fisiológicas a estos cambios (1).

La ciencia que estudia todos estos fenómenos periódicos o ritmos biológicos que se producen en los seres vivos se denomina **Cronobiología** (“kronos” de tiempo, “bios” de vida y “logos” de estudio) (2).

Los ritmos biológicos se pueden clasificar en función del tiempo en el que transcurre su periodo, así aquellos con un periodo próximo a 24h se denominan *circadianos*, aquellos con un periodo de menos de 24h se denominan *ultradianos* y los que presentan un periodo de más de 24h, *infradianos* (3). En la presente tesis doctoral nos centraremos en el estudio de los ritmos circadianos (del latín *circa*, que significa ‘alrededor de’ y *dies*, que significa ‘día’).

El primer informe específico de un ritmo biológico fue proporcionado por el astrónomo francés Jean Jacques d'Ortois De Marian en 1729 (4), quien estudió los movimientos foliculares de la planta *Mimosa pudica*. En sus experimentos, logró demostrar que las hojas seguían oscilando siguiendo el ritmo circadiano incluso en una oscuridad permanente. La importancia de este trabajo es que De Marian demostró por primera vez que existían unos ritmos biológicos en la naturaleza, en este caso en la función del movimiento de las hojas, y además que estos ritmos biológicos eran endógenos, es decir, que ocurrían incluso fuera de la influencia del ambiente en este

caso del efecto de la luz solar. Al mismo tiempo, mostró que era un ritmo que se repetía cada 24h y por tanto circadiano. Con este estudio nació la ciencia de la cronobiología.

Los primeros datos relacionados con los ritmos circadianos se remontan al siglo XVIII, tal y como demuestra Linneo, que dibujó un reloj floral en función de la hora de la máxima apertura de las flores en su jardín. Sin embargo, la cronobiología, entendida como ciencia es relativamente nueva, y no fue hasta mediados del siglo XX cuando emergió como un nuevo campo. Algunos de los primeros estudios se realizaron por el ecologista Colin S. Pittendrigh (5) en la mosca de la fruta *Drosophila*. Colin, gracias al estudio de los ritmos biológicos en este insecto, asentó los principios básicos en los que se basa la cronobiología moderna.

A partir de entonces esta nueva ciencia ha ido alcanzando reconocimiento entre profesionales sanitarios, investigadores y poco a poco entre la población en general hasta el punto que en 2017, se concedió el Premio Nobel de Medicina a los investigadores que sentaron las bases científicas del reloj biológico. Los investigadores estadounidenses Jeffrey C. Hall, Michael Rosbash y Michael W. Young consiguieron este reconocimiento por sus descubrimientos en los mecanismos moleculares que controlan el ritmo circadiano (6). Desde entonces, el concepto del “tiempo” es reconocido en la fisiología, en la ciencia y en la medicina. La elección del «momento correcto» es relevante para alcanzar una adecuada salud (7).

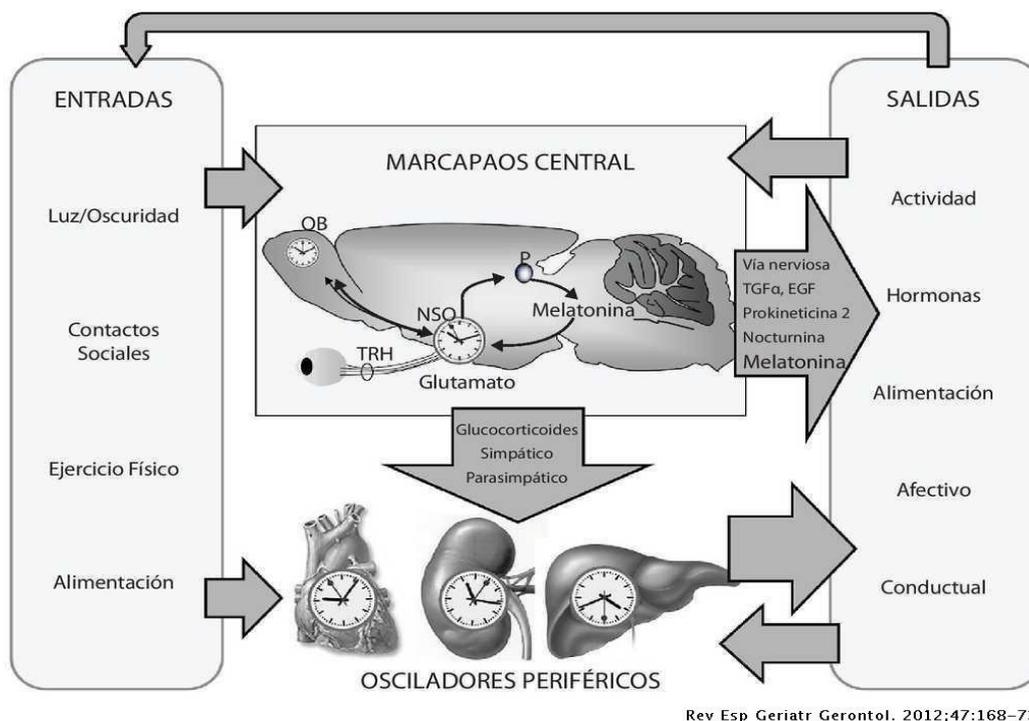
## **1.2. Organización del sistema circadiano**

El sistema circadiano es el responsable de la generación y mantenimiento de los ritmos circadianos del organismo y de su sincronización con el medio ambiente. Sin embargo, los ritmos de los organismos vivos no son consecuencia pasiva de las condiciones externas, sino que tienen un origen endógeno (8). Este sistema circadiano en mamíferos está compuesto por un reloj biológico principal llamado núcleo supraquiasmático (NSQ) localizado en el hipotálamo, que tiene capacidad intrínseca de oscilar funcionando como un marcapasos central (9). La actividad del NSQ es suficiente para que aparezcan los ritmos circadianos. Aun así, es necesario que este reloj esté adecuadamente sincronizado con el medio que le rodea. Para ello, el NSQ presenta unas vías de entrada de la información desde los receptores que captan las señales externas y

unas vías de salida dirigidas a los sistemas fisiológicos responsables de manifestar los ritmos biológicos del individuo (9).

Las señales ambientales rítmicas capaces de modificar el reloj endógeno actúan como “entradas” al reloj (10). Entre estos sincronizadores, el más importante es el ciclo de luz-oscuridad, pero además, los horarios de las comidas y la actividad física también actúan como sincronizadores del sistema circadiano, principalmente de los órganos periféricos.

Y es que el marcapasos central no es el único reloj que posee el organismo, ya que, subordinados a él, existen multitud de osciladores periféricos en prácticamente todos los órganos y células del cuerpo (11). El corazón, hígado y páncreas, entre otros, presentan sus propios relojes, capaces de funcionar de forma autónoma mediante la expresión circadiana de sus «genes reloj», aunque modulados y sincronizados por el reloj central (12). De especial importancia son los relojes hepático y cardíaco, que a su vez pueden sincronizarse con señales externas, tales como el horario de alimentación (ingesta/ayuno) o el ejercicio físico (actividad/reposo), respectivamente (9).



Rev Esp Geriatr Gerontol. 2012;47:168-73

**Figura1.** Organización del sistema circadiano. Modificado de Garaulet M, *et al* (13)

Por otra parte, no podemos olvidar el descubrimiento por parte de nuestro grupo de investigación de la presencia de un reloj en el tejido adiposo, demostrando que es capaz de sincronizarse independientemente del NSQ (14) . La **Figura 1** representa un esquema del funcionamiento y los principales componentes del sistema circadiano en el humano.

Hoy en día se sabe que el funcionamiento del reloj central y de los periféricos está basado en la expresión e inhibición de una serie de genes llamados genes reloj, y de la generación de proteínas que derivan de estos genes. En cada una de las células del organismo existe un reloj molecular basado en una serie de bucles de retroalimentación positiva y negativa que dan lugar a ritmos de expresión génica (15). Éste es un sistema muy complejo que sigue esclareciéndose en la actualidad. Hasta el momento, los genes reloj más estudiados son *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2*, *Bmal1*, *RevErb* y *Clock*. Los genes *Clock* y *Bmal1*, actúan como elementos positivos, es decir activadores del reloj, y los genes *Per* (*Per1*, *Per2* y *Per3*) y los criptocromos (*Cry1* y *Cry2*), como elementos negativos, es decir, inhibidores del reloj. Dichos genes reloj codifican una serie de proteínas que generan mecanismos de autorregulación (16) que hacen que en general estos ritmos biológicos tengan una duración de aproximadamente 24h.

## 2. ¿Qué es el cronotipo? Y ¿cómo se evalúa?

El resultado fenotípico de este reloj circadiano resulta en el cronotipo del individuo, que se entiende como una característica que ayuda a determinar la preferencia circadiana del sujeto (16, 17). Las diferencias entre el horario endógeno de un individuo y la hora local externa dan como resultado cronotipos que van desde matutinos (cronotipo temprano) hasta vespertinos (cronotipo tardío), pasando por un cronotipo intermedio también llamado indefinido (18). Los cronotipos tempranos tienden a funcionar mejor en la mañana, mientras que los cronotipos tardíos funcionan mejor en la noche (18).

Los estudios realizados en población adulta apuntan a que el cronotipo vespertino o tardío, o también llamado nocturno, se asocia con complicaciones de salud incluyendo baja actividad física, corta duración de sueño y mayor jet lag social (19). Sin embargo, los resultados siguen siendo contradictorios (20), y hacen falta nuevas

investigaciones que determinen el cronotipo de manera objetiva. Además, los estudios se han realizado principalmente en individuos adultos y en edades tempranas, como niños en edad preescolar, adolescentes o adultos jóvenes, sin embargo, en niños de edad escolar la contribución del cronotipo al riesgo metabólico sigue siendo una cuestión por resolver.

La mayoría de estos estudios que se han realizado en adultos se han hecho mediante cuestionarios, por lo que la determinación del cronotipo de un individuo suele ser subjetiva (21), mientras que las herramientas objetivas capaces de capturar el cronotipo de una forma simple, continua y no invasiva en condiciones de vida libre, son escasas y en niños casi inexistentes. Estudios recientes han encontrado una asociación entre el cuestionario de cronotipo de Munich (uno de los cuestionarios más usados para determinar el cronotipo del individuo, y que es de fácil determinación en niños) y la actimetría (medición de actividad durante un tiempo prolongado, normalmente una semana, que se está utilizando para evaluar objetivamente el cronotipo del individuo) (22). Sin embargo, los datos de los ritmos de 24h recogidos por el actímetro, aunque presentan muchas ventajas ya que permiten la recogida de datos en condiciones de vida libre del individuo, y de manera no invasiva, pueden estar afectados por factores ambientales, retirada de dispositivo, etc., y pueden ser no fiables.

A la hora de determinar el cronotipo del individuo, las técnicas más utilizadas en la actualidad en investigación son las que se exponen a continuación:

### **2.1. Cronotipo subjetivo**

Se basa en la obtención del cronotipo a través del uso de cuestionarios que clasifican al sujeto según su tipología circadiana. Las técnicas más utilizadas han sido el cuestionario matutino-vespertino (Morning-Evening Questionnaire (MEQ)) y el cuestionario de Munich (MCTQ). Cada instrumento evalúa un aspecto diferente del cronotipo. Se considera que MEQ evalúa las preferencias de tiempo y horarios del comportamiento del individuo durante las 24 horas de un día; mientras que el MCTQ determina el cronotipo tras calcular la fase o centro del sueño para los días libres y de trabajo. Una revisión previa sugiere que MCTQ es el mejor instrumento para evaluar la fase de sueño

por lo que es útil en investigaciones que se ocupan de la desincronización entre las conductas del individuo, su reloj interno, y el ambiente que le rodea.

El **cuestionario de Munich (MCTQ)** consta de 17 preguntas simples sobre el comportamiento del ciclo sueño y vigilia. Estas preguntas abordan la hora de acostarse, y hora de levantarse por separado para días laborables y días libres (17). Además, existe una versión reducida para niños. El MCTQ usa el centro del sueño de los días libres y los días de trabajo para evaluar el cronotipo (17). Se ha descubierto que el centro del sueño es uno de los más precisos marcadores para la fase circadiana, definida como la hora en el que ritmo alcanza su máximo valor (23). La elección para usar el centro del sueño días libres y de trabajo fue debido a las diferencias entre el reloj biológico y el social.

El **cuestionario matutino-vespertino** (Morning-Evening Questionnaire (MEQ)) consta de una escala de 19 ítems desarrollada por Horne y Östberg, con la que se obtiene una puntuación que clasifica al sujeto en matutino, indefinido o vespertino. Estudios en adultos han utilizado este cuestionario para identificar el cronotipo del individuo y ver su asociación con diversas patologías. Este tipo de cuestionarios se utiliza para valorar las características del cronotipo que cambian en situaciones específicas, por ejemplo tras un cambio de edad, tras una intervención, o tras un cambio de vida (24).

## **2.2. Cronotipo objetivo**

Las técnicas objetivas nacen por la necesidad de encontrar herramientas más fiables, no invasivas, fáciles de obtener y que no interfieran en la vida del sujeto. Entre ellas las que más están siendo utilizadas actualmente por los investigadores son:

### **a) Inicio de la subida de melatonina con luz tenue (Dim Light Melatonin Onset (DLMO))**

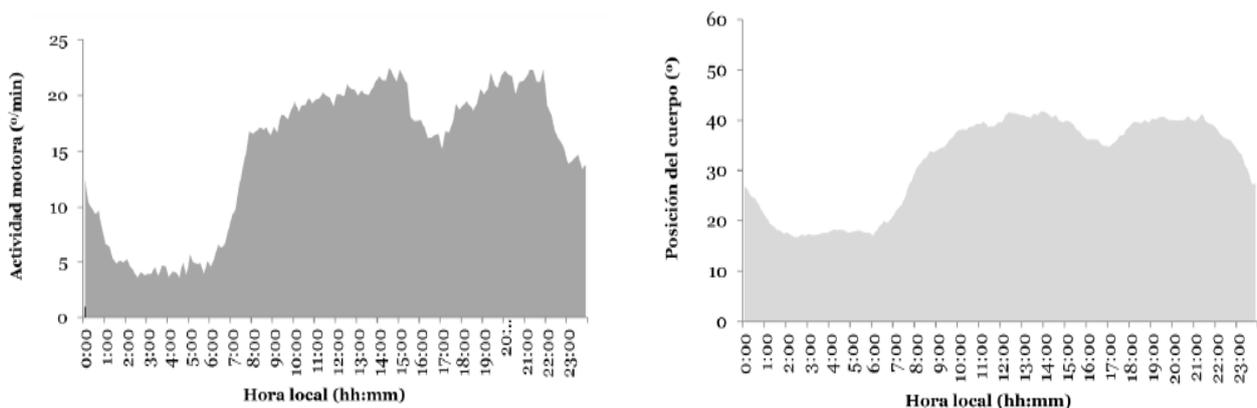
El Dim Light Melatonin Onset (DLMO) es una herramienta para medir la fase circadiana, es decir, el momento en que los valores de melatonina ascienden y mantienen sus concentraciones superiores a un umbral determinado que suele estimarse

en 5 pg/ml (25). Se realiza en condiciones de luz tenue ya que la luz intensa es capaz de suprimir la secreción de melatonina. Un número sustancial de estudios ha demostrado que, dentro de este perfil rítmico, el inicio de la secreción de melatonina en condiciones de luz tenue o DLMO es el marcador más preciso para evaluar la fase del marcapasos circadiano (26).

Sin embargo, esta técnica no es utilizada de forma usual como marcador circadiano debido a varios factores que impiden su implantación. Entre ellas destacamos que la recolección de muestras debe realizarse durante un mínimo de 5 horas, en las horas previas al inicio habitual del sueño, lo que conlleva un esfuerzo considerable por parte de los participantes y es costoso pues se suelen analizar por cada individuo un total de 10 muestras de melatonina (cada media hora) (27).

## b) Actimetría

La actimetría tiene como objetivo evaluar la actividad y la posición del sujeto. Es un método simple y no invasivo. Consiste en la obtención de un registro prolongado de datos mediante el empleo de un dispositivo denominado actímetro, que registra y almacena información sobre el movimiento y la posición corporal. La monitorización se basa en cuantificar los movimientos realizados por el sujeto mediante medidas de la aceleración resultante de dichos movimientos. A partir de la información proporcionada por el actímetro, obtenemos dos variables: actividad motora (A) y posición del cuerpo (P). La representación gráfica del patrón de 24h de actividad y posición en adultos, se caracteriza por presentar valores bajos durante la noche (descanso) y valores más elevados durante el día (vigilia) en adultos (**Figura 2**).



**Figura 2.** Ritmo de 24h de actividad y posición en adultos. Datos tomados del Departamento de Fisiología de la Universidad de Murcia. Grupo de Nutrición.

El rápido desarrollo de dispositivos por la industria ha proporcionado una medición fácil y objetiva de los ritmos de actividad de 24 h en condiciones de vida libre lo que ha hecho que los actímetros estén siendo utilizados frecuentemente tanto en la población adulta (28), adolescente (29) e infantil (30) como marcador de alteraciones en el sistema circadiano y su posible asociación con la enfermedad.

En esta búsqueda de biomarcadores de la salud circadiana, se han desarrollado algoritmos que cuantifican la robustez, la fase y la estabilidad de los ritmos de actividad/reposo. Entre ellos, el modelo cosinor paramétrico y el modelo no paramétrico son dos enfoques matemáticos que se utilizan en la actualidad y que son capaces de captar anormalidades en los ritmos de actividad/reposo asociadas con obesidad (31, 32).

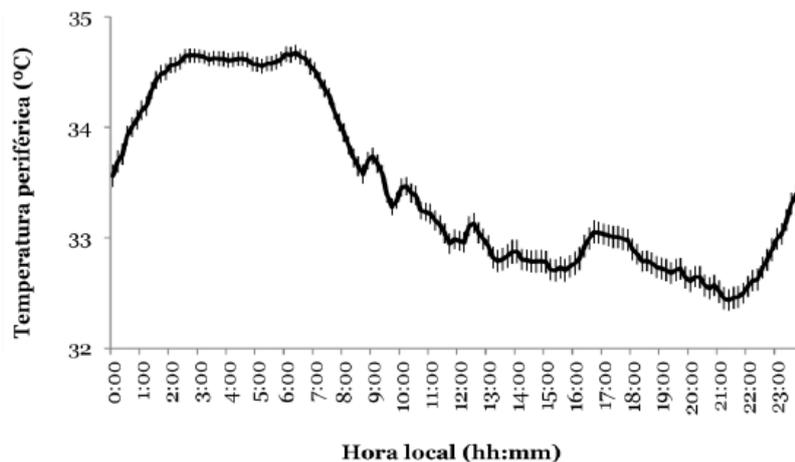
### **c) Temperatura corporal**

La temperatura corporal se puede considerar como una salida del reloj circadiano y se utiliza en cronobiología como un marcador del estado general del sistema circadiano (33).

La temperatura corporal, medida de forma “central”, ha demostrado ser un marcador adecuado de los ritmos circadianos del individuo, sin embargo, su medición continua no siempre es posible en la práctica diaria, pues requiere la ingesta de una cápsula termómetro, cuyas mediciones cambian en función de la velocidad de tránsito intestinal, que varía según los individuos, o el uso de una sonda rectal durante 24h, lo que sólo es posible en complicados experimentos de laboratorio en condiciones controladas, con lo que no son representativas de la vida real del individuo (34, 35). Una aproximación podría ser la medición de la temperatura periférica en la muñeca, o la medición de la temperatura distal, mediante el uso de dos dispositivos separados en el cuerpo, que midan la diferencia de temperatura entre ellos y permitan así eliminar el efecto de la temperatura ambiental (36, 37). Se considera, con algunas salvedades, que el ritmo circadiano de temperatura corporal central y periférica son inversos, por lo que el máximo valor de un ritmo podría corresponderse con el mínimo para el otro (38), aunque no debemos olvidar que la temperatura periférica, resulta también de la disipación por la piel de la temperatura central, por lo que a veces sus valores elevados son consecuencia también de un incremento de temperatura central. Para evaluar el

ritmo de temperatura periférica en adultos se ha utilizado un sensor de temperatura denominado ibutton (39) (Thermochron iButton DS1921H, Dallas, Maxim, Dallas, T). Este dispositivo también se ha usado para evaluar la temperatura periférica en adolescentes (40) y en niños (41).

La representación gráfica del patrón circadiano de temperatura periférica en adultos medido en la muñeca (**Figura 3**), se caracteriza por presentar una elevación de los valores de temperatura por la noche, con un patrón estable en forma de meseta durante el sueño nocturno con altas temperaturas y un descenso pronunciado de la misma al despertar. Por la mañana permanecerá estable con valores bajos de temperatura y con una elevación en las horas posteriores asociada a la siesta, y coincidente con el periodo postprandial. Por último, se produce una zona del máximo del despertar que corresponde a los valores mínimos temperatura y que prepara para el sueño, ya que a partir de esta caída, la temperatura volverá a subir nuevamente con la entrada de la noche. En niños no se conoce cuál es el patrón de temperatura periférica durante 24h, y puede que difiera con el del adulto, tanto en horas de sueño como de vigilia.



**Figura 3.** Ritmo de 24h de temperatura periférica en adultos. Datos tomados del Departamento de Fisiología de la Universidad de Murcia. Grupo de Nutrición.

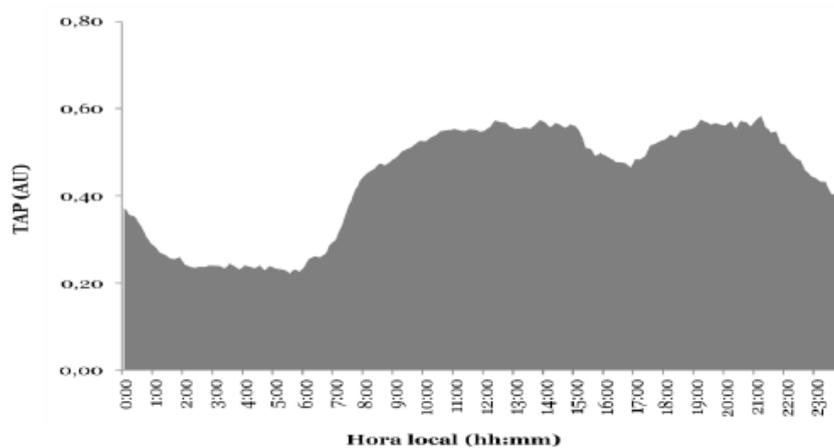
**d) TAP (Temperatura, actividad y Posición).**

La temperatura, actividad y posición, en sí mismas presentan cualidades diferentes a la hora de captar la salud circadiana, o el sueño. Se entiende que la temperatura periférica tiene un carácter más endógeno o fisiológico, mientras que la actimetría y la posición captan en mayor medida las conductas del individuo. Además, ninguno de ellos por sí solo está exento de problemas, como son los factores de enmascaramiento a la hora de captar la temperatura periférica, cuando existen temperaturas ambientales elevadas, o fallos en el dispositivo a la hora de captar el movimiento. Para tratar de superar estas barreras metodológicas, Ortiz-Tudela y *col.* (42) propusieron la integración de estas tres variables en una sola que evaluara el estado del sistema circadiano humano en condiciones normales de vida, a esta variable integradora le denominaron TAP ya que combina la temperatura de la muñeca (T), la actividad física (A) y la posición (P) y ha demostrado ser un método adecuado para evaluar el cronotipo del individuo, el estado del sistema circadiano y las características del sueño en adultos.

Algunos de los problemas que presenta la actimetría, además de los fallos en su funcionamiento es que, a la hora de medir el centro del sueño, tiende a subestimar el tiempo de vigilia y por tanto a sobreestimar el sueño (43). Además, con el actímetro no es posible saber cuándo los sujetos se quitan sus dispositivos (44). La utilización conjunta de la actimetría con la temperatura periférica puede ser muy útil ya que esta última se considera como un buen marcador de sueño (45). Un reciente documento de consenso respaldado por el Instituto Nacional del Corazón, Pulmones y Sangre, el Instituto Nacional sobre el Envejecimiento y la Sociedad de Investigación del Sueño (45), ha declarado que la temperatura periférica es un método novedoso y no invasivo para medir la hora de la fase circadiana y los estados de sueño y vigilia.

En comparación con la actimetría convencional, se ha demostrado que el TAP es clínicamente superior en la evaluación objetiva del sueño (44). Mejora la sensibilidad, la especificidad y la precisión en comparación con la actividad, la posición o la temperatura corporal, por separado y minimiza los efectos de enmascaramiento (42). TAP ha sido validado en adultos sanos y enfermos (46) con determinaciones de melatonina con luz tenue (DLMO) y con polisomnografía. También ha sido utilizado

como herramienta para determinar el cronotipo endógeno (heredable) y la salud circadiana en gemelos (47).



**Figura 4.** Ritmo de 24h de la variable integradora TAP en adultos. Datos tomados del Departamento de Fisiología de la Universidad de Murcia. Grupo de Nutrición.

La **Figura 4** muestra el ritmo diario de la variable TAP en adultos valores bajos de TAP implican la coexistencia de baja actividad, posición horizontal y alta temperatura. Este método sencillo y no invasivo, permite la evaluación del estado circadiano en condiciones de vida libre (48).

#### e) Cortisol

El cortisol es la hormona circadiana por excelencia, es decir sus concentraciones van variando a lo largo de día y se considera un marcador del funcionamiento del reloj central. La gran ventaja de su determinación es que, aunque hay que hacer diferentes medidas a lo largo del día, se pueden realizar en saliva y por tanto de manera no invasiva.

El cortisol también se conoce como la hormona del estrés. Sin embargo, tiene muchas más funciones, incluidos efectos reguladores importantes en todo el organismo, incluido el cerebro. También presenta un impacto en la regulación de energía y en los procesos metabólicos y en el funcionamiento del sistema inmune e inflamatorio, entre

otros (49). El cortisol se considera un marcador adecuado para la evaluación de la salud cronobiológica, debido a que presenta un patrón circadiano robusto que alcanza su máximo a la hora del despertar y va disminuyendo a lo largo del día, por lo que por la noche sus valores suelen ser menores. Es por ello que en cronobiología interesa determinar al menos el cortisol al despertar y al final del día. Un ritmo con poco cambio o aplanado, se considera como marcador de cronodisrupción.

A la hora de utilizar los ritmos de cortisol como un marcador del sistema circadiano, no debemos olvidar que puede verse afectado por factores externos como los horarios de ingesta de alimentos (50), la presencia de situaciones estresantes, la exposición a la luz en determinados momentos del día (51) o situaciones patológicas como la obesidad (52).

Estudios previos han relacionado el cronotipo del sujeto con los valores de cortisol. Se ha estudiado la relación entre cronotipo y el patrón durante 24h del cortisol en mujeres trabajadoras (53). También se ha evaluado la asociación entre el cronotipo, la temperatura de la piel y los valores de cortisol (54) y la relación del cronotipo vespertino con el aumento del cortisol (55) entre otros.

#### **f) Melatonina**

Otra hormona muy utilizada en cronobiología es la melatonina, también llamada hormona de la noche, que se libera en la glándula pineal como respuesta simpática a la acción del núcleo supraquiasmático. La melatonina es el marcador circadiano por excelencia, sobre todo el inicio de su secreción DLMO, por lo que sus valores deberán presentarse elevados por la noche y bajos por el día. Sin embargo, hay que tener en cuenta que su actividad está condicionada por agentes ambientales como la luz (56), consumo de estimulantes como la cafeína (57), algunos fármacos (58) etc.

La secreción de melatonina se relaciona con el sueño, coincide con una caída de temperatura corporal central y con una disminución en el grado de excitación y en el rendimiento del individuo (59). Estudios previos han confirmado que las concentraciones de melatonina son un buen marcador del cronotipo (60). Además en

adolescentes con sobrepeso y obesidad se han evaluado las concentraciones de melatonina para valorar el sueño (61). También se han determinado sus valores en niños pequeños (62), sin embargo, en niños sanos de edad escolar, los estudios que miden la concentración de melatonina como marcador del cronotipo, son escasos.

### 3. Sincronizadores externos del reloj interno

Se denominan *zeitgebers* a los estímulos externos o señales ambientales rítmicas capaces de modificar la duración del ciclo o período al que oscila el reloj endógeno. En su conjunto actúan como “entradas” al reloj, (10). Entre estos sincronizadores, el más importante es el ciclo de luz-oscuridad. Además, el horario de las comidas (ingesta/ayuno) y la actividad física (actividad/reposo), también actúan como sincronizadores del sistema circadiano, pero su efecto se realiza sobre relojes periféricos que se encuentran en otros órganos y tejidos, y que a su vez se comunican y sincronizan por el reloj central.

#### 3.1. La hora de la comida como sincronizador

Sabemos que un horario de comidas inusual puede producir una alteración del sistema circadiano y puede tener consecuencias sobre la salud del individuo. Diversos trabajos de investigación muestran una relación entre el momento de la alimentación y la regulación del peso corporal (63).

Los retrasos en la ingesta de los alimentos y del sueño se han relacionado con la alteraciones metabólicas y de obesidad (64, 65). En adultos, una alimentación tardía se ha asociado con hiperglucemia (66), intolerancia a la glucosa (67) y mayor riesgo cardio-metabólico (68). Un horario tardío en la comida o cena también se ha relacionado con peores patrones de sueño (68) y con irse a la cama más tarde en adultos (69).

Nuestro grupo de investigación demostró en el año 2013 que el momento de la **comida principal** del día, que es la comida del mediodía en España, era predictivo de la pérdida de peso (70). En 420 pacientes que seguían un programa de pérdida de peso

durante 22 semanas, aquellos pacientes que comieron antes de las 15:00h de la tarde perdieron más peso que los que comieron después de las 15:00h de la tarde. Resultados parecidos se obtuvieron en una población sometida a cirugía bariátrica (70) aquellos pacientes que comían antes de las 15:00h perdían un 80% de su exceso de peso durante los 6 meses después de la operación, y además mantenían el peso perdido durante los 6 años posteriores, mientras que aquellos pacientes que comían habitualmente tarde en la comida principal del mediodía (después de las 15:00 h) perdieron menos sólo un 40% de su exceso de peso durante los 6 meses iniciales, y recuperaron el peso perdido durante los 6 años de seguimiento. Estos resultados muestran que la hora de la comida es importante a la hora de perder peso no sólo cuando se sigue un tratamiento dietético, sino también tras un método más drástico y que se supone menos conductual como es la cirugía de obesidad. Además una reciente revisión recopila datos sobre la importancia de los horarios de desayuno, comida y cena, ya que horarios tardíos de ingesta de alimentos se han asociado con alteraciones en el metabolismo, un aumento de la grasa corporal (65) y factores relacionados con la obesidad (71).

De la misma manera, un tema de actualidad es el papel que tiene una **cena tardía** sobre nuestra salud. Es preciso recordar que la melatonina empieza a aumentar sus valores conforme nos vamos acercando a la noche, como ya hemos visto. Estudios recientes muestran que cuando se cena tarde y además se presenta un determinado polimorfismo del receptor de la melatonina (*MTNR1B*), que se asocia con un aumento de la función del receptor de melatonina, se produce una reducción de la tolerancia a la glucosa, pudiendo a la larga generar problemas de diabetes u obesidad (67).

### **3.2. La actividad física como sincronizador**

La actividad física desde el punto de vista cronobiológico, se puede entender, tal y como hemos explicado en apartados anteriores, como una salida del reloj interno, que nos permite la evaluación de la salud circadiana del individuo. Sin embargo, la actividad física también se puede considerar como una “entrada” al sistema circadiano, y por tanto como un sincronizador. Los horarios de actividad física tienen un papel relevante en el sistema circadiano, por lo que un horario inadecuado de actividad puede dar lugar a efectos negativos en la salud del individuo (72).

Un estudio por parte de nuestro equipo de investigación demostró que el mismo ejercicio realizado en diferentes momentos del día presenta un efecto diferente sobre nuestro sistema circadiano (72). En este estudio, una muestra de mujeres deportistas que jugaban al rugby fue sometida a realizar el ejercicio a diferentes horas del día. Cuando las rugbistas realizaban el ejercicio por la mañana, la temperatura corporal periférica presentaba un ritmo diario mejorado respecto a la semana control. Sin embargo, cuando lo realizaban por la noche, presentaba alteraciones en el ritmo de temperatura.

El ciclo de actividad/reposo, engloba todas las actividades que se llevan a cabo a lo largo del día, como la actividad física, abarcando también la duración y regularidad del sueño. La investigación centrada en las alteraciones del ritmo de actividad/reposo, se ha llevado a cabo principalmente en adultos o en poblaciones con muestras pequeñas (73-76). Pocos estudios han estudiado este tema en adolescentes, y los que lo han hecho, han evaluado escasos aspectos relacionados con los ciclos de actividad/reposo (29, 77). Por lo que se necesario adoptar un enfoque más integral para identificar los parámetros de la actividad que están asociadas con obesidad y alteraciones metabólicas en poblaciones pediátricas.

### **3.3. La luz como sincronizador**

La luz es el principal sincronizador externo del reloj biológico. Los ciclos de luz-oscuridad pueden poner en hora este reloj y cuando no son adecuados pueden producir alteraciones del mismo. La luz entra por el ojo y a través del tracto retinohipotalámico (TRH), una ruta no visual basada en las células ganglionares que están provistas del pigmento melanopsina, ejerce su acción sobre el NSQ (78).

Un buen estado circadiano se caracteriza por una adecuada exposición a los cambios de luz-oscuridad. En general se recomienda una elevada exposición a la luz durante el día y una baja exposición durante la noche. Hoy en día sabemos que la iluminación artificial nocturna con luz blanca desencadena la inhibición de melatonina, ya que esta es una hormona fotosensible, lo que puede conllevar un retraso en la hora del sueño o producir insomnio.

Estudios previos recogen la importancia de una adecuada exposición a la luz. Tanto en intensidad, en tipo de luz, como en horario. Investigaciones recientes en niños sugieren que la luz blanca, tiene un mayor impacto sobre la melatonina que las luces más amarillas o rojizas, e inhibe el aumento de la somnolencia durante la noche (79). También se ha estudiado el efecto de la luz en niños con hiperactividad (80), como agente sincronizador en terapias sobre alteraciones del ciclo sueño-vigilia (81). Basados en estos conceptos se están mejorando los dispositivos electrónicos, tanto los teléfonos móviles como las pantallas de ordenador para que regulen el tipo y la intensidad de luz utilizada en función de las horas del día, y para que no emitan luz blanca por las noche y así evitar la cronodisrupción (82) entre otros.

En la literatura también hay estudios que han abordado el efecto de la luz en relación con el cronotipo. Los adolescentes que viven en zonas urbanas y expuestos a luz artificial blanca durante la noche tienen un cronotipo más vespertino, evaluado por el cuestionario de Munich (MCTQ) y cuestionario matutino-vespertino (MEQ), comparado con aquellos que viven en entornos más rurales. Además, la luz por la mañana se ha utilizado como terapia para adelantar los horarios de sueño en pacientes con alteraciones de la fase sueño-vigilia (83) y más recientemente para tratar el jet lag social (84).

## **4. Cronodisrupción: obesidad y salud cardiometabólica**

### **4.1. Cronodisrupción**

La cronodisrupción se define como la ruptura de la sincronización entre los ritmos circadianos internos y los ciclos de 24 horas medioambientales (85). La alteración de estos ritmos circadianos puede impulsar el desarrollo de diferentes tipos de patologías (86). Una perturbación del orden temporal interno de los ritmos circadianos fisiológicos, bioquímicos y de conducta puede dar lugar a una situación de cronodisrupción.

Actualmente está habiendo un aumento de alteraciones circadianas en niños de edad escolar, debido a la luz artificial, los medios digitales, los horarios escolares exigentes y las actividades extraescolares (87-89). El sistema circadiano desempeña un

papel importante en la regulación del ciclo sueño-vigilia que puede desencadenar alteraciones metabólicas perjudiciales para la salud. Estos datos están respaldados por investigaciones en adultos donde se expone una fuerte asociación entre trabajadores por turnos, cronotipos tardíos y jet lag social con la obesidad (90-92).

Además, los estudios experimentales demuestran que las alteraciones en el sistema circadiano producen un elevado apetito y un metabolismo energético alterado en adultos sanos (93, 94). De la misma manera que ocurre en adultos, se sospecha que la cronodisrupción puede dar como resultado la presencia de enfermedades o alteraciones también a edades más tempranas en relación con diferentes áreas de la salud (95).

Ciertos estudios ya han sido capaces de demostrar la relación entre la cronodisrupción y el deterioro de salud en niños y adultos:

a) Una de las causas de la cronodisrupción está relacionada con la **privación de sueño** o con **el momento** en el que este ocurre. Estudios recientes muestran que alteraciones en el ciclo sueño/vigilia pueden provocar problemas de salud tales como mayor morbilidad cardiovascular (96) o mayor riesgo cardiometabólico (97). Además una reducción de la duración del sueño ha sido asociada con un aumento de la obesidad tanto en estudios transversales (98) como longitudinales (99) en niños y adultos. Una duración insuficiente de sueño también se ha asociado con diabetes tipo II (98), riesgo de pre-hipertensión e hipertensión (100), síntomas gastrointestinales (101), resistencia a la insulina y aumento del riesgo metabólico (100) en poblaciones infantiles. Además otros estudios aseguran que la mala calidad del sueño durante la infancia, parece estar asociada con sobrepeso/obesidad siendo esta asociación independiente de la duración (102).

b) Por otro lado, conocer los horarios de sueño entre semana y los fines de semana también es importante, por el denominado **jet lag social**. El jet lag social se define como la diferencia entre los centros del sueño de semana y de los fines de semana. Es una medida que muestra la interrupción circadiana crónica causada por la discrepancia entre nuestros relojes internos y hábitos sociales. Se considera que se tiene jet lag social cuando la diferencia del centro del sueño

entre semana y fin de semana es mayor a 2h ya que estudios recientes han sugerido que jet lag tiene un impacto negativo en la salud física y mental de los niños con edad escolar. Entre sus consecuencias, los niños que presentan jet lag social muestran mayores signos de depresión (103) y menor rendimiento académico (104). Estudios previos han encontrado que los individuos adultos que sufren de obesidad presentan mayor jet lag social (105). Igualmente, en estudios en niños, aquellos que presentaron mayor jet lag social mostraron porcentajes de grasa corporal más elevados (106).

c) **La hora, la intensidad y la duración de la exposición a la luz artificial.**

Estudios previos confirman que la excesiva exposición a la luz artificial por la noche es un factor que contribuye al exceso de grasa corporal en humanos (107). De la misma forma, en la sociedad moderna, la luz artificial nocturna altera el sistema circadiano generando problemas de salud como el cáncer y obesidad (108, 109). Por otro lado, algunos estudios han demostrado la relación entre problemas de sueño en niños y uso de medios tecnológicos como ver la televisión, jugar al ordenador o utilizar el teléfono móvil por la noche (110, 111). La luz blanca que incide en los niños procedente de los aparatos electrónicos es capaz de suprimir la melatonina, provocando cronodisrupción y problemas asociados como ya hemos visto (apartado de melatonina 2f).

d) La **hora de alimentarnos** puede afectar en gran medida el peso corporal y conlleva alteraciones asociadas. Fueron los trabajos en ratones del profesor Turek (63), en los que se le daba una dieta hipergrasa y se observaba que cuando esta dieta se les daba a una hora inadecuada, que era durante el día en estos animales nocturnos, los ratones engordaban más que cuando la ingesta se realizaba a la hora habitual (durante la noche). Este trabajo abrió la puerta a nuevas investigaciones en humanos que muestran que comer a horas inadecuadas en humanos, como sucede en los trabajadores por turnos o en cenadores tardíos se asocia con un mayor riesgo de obesidad, diabetes y enfermedades cardiovasculares (112) en adultos.

e) Horarios inadecuados en **actividad física** o la falta de cambios en esta actividad, es decir una actividad sedentaria continua (113) es otro factor de

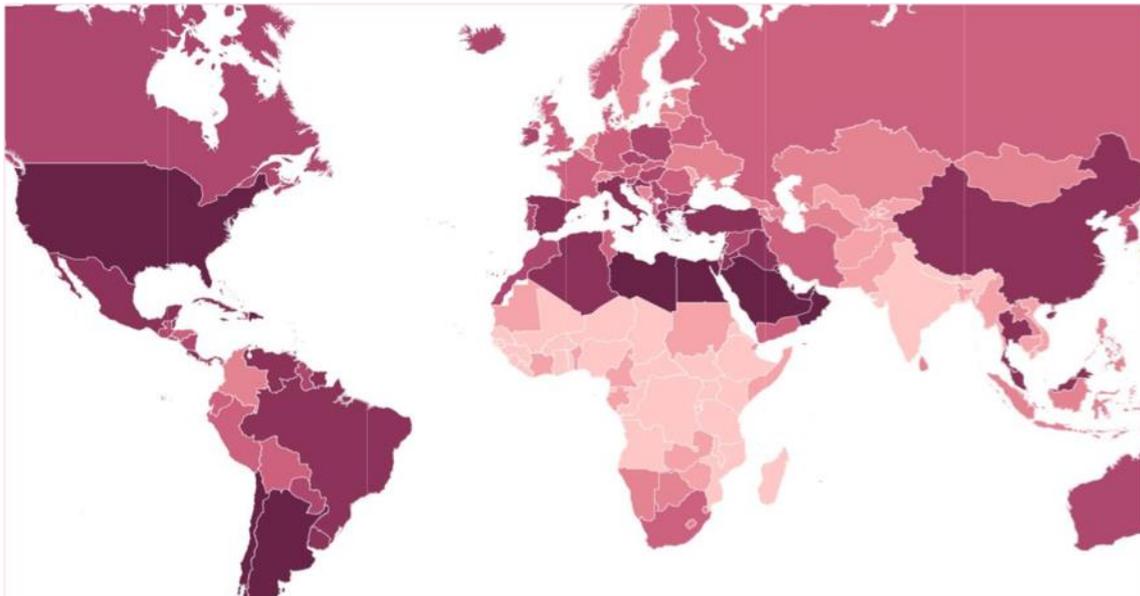
cronodisrupción ya comentado (apartado 3.2. La actividad física como sincronizador):-

## 4.2. Obesidad

Tal y como se describe a lo largo de este proyecto de tesis doctoral, la cronodisrupción se asocia tanto en niños como en adultos con la obesidad. Esta patología ocupa en la actualidad uno de los mayores problemas de salud pública a nivel mundial y se ha convertido en una epidemia (114).

Se pronostica que el número de niños obesos a nivel mundial alcanzará los 250 millones en 2030, frente a los 150 millones actuales. Solo uno de cada 10 países tiene un 50% de posibilidades de alcanzar el objetivo propuesto por la Organización Mundial de la Salud de no aumentar la obesidad infantil entre 2010 y 2025 (115).

En España el 35% de los menores entre ocho y dieciséis años tienen exceso de peso y un 20,7% de ellos sufren sobrepeso, y un 14,2% obesidad (**Figura 5**). La importancia reside en que la infancia es un período crítico en el desarrollo y la persistencia de la obesidad y en las comorbilidades relacionadas en la edad adulta (111).



**Figura 5.** Mapa mundial de la obesidad infantil 2019.

La obesidad es entendida como el resultado de un balance calórico positivo, es decir, un desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético, siendo la ingesta mayor que el gasto (116). Además, la obesidad es una enfermedad de origen multifactorial. Es el resultado de una interacción compleja de factores genéticos, hormonales, nutricionales, de actividad física, ambientales físicos y sociales.

Durante mucho tiempo las investigaciones para combatir la obesidad han estado centradas en la ingesta calórica de los alimentos. En un principio iban destinadas el hacía el control del consumo de energía y en el reparto de macronutrientes en la dieta, después se centraron en el tipo de alimento o grupos de alimentos y los factores ambientales que determinaba su elección. Sin embargo, en la actualidad ha cobrado fuerza el “momento” de la ingesta de alimentos como factor relevante contribuyente al desarrollo de la obesidad, además recientemente también se están teniendo en cuenta a la hora de prevenir o tratar la obesidad el momento, duración o intensidad de otros sincronizadores externos, ya nombrados, como son la luz y la actividad física.

### **4.3. Salud cardiometabólica**

Junto con la obesidad, y a veces como consecuencia de ella, existen otras enfermedades metabólicas comunes en adultos que pueden resultar de procesos patológicos crónicos y que a veces comienzan en etapas tempranas de la vida. Ejemplos de estas enfermedades metabólicas en el adulto son el síndrome metabólico, las alteraciones en lípidos plasmáticos y presión arterial, así como fallos en el control de la glucemia. Una detección a tiempo de los factores de riesgo en el niño permitirá hacer cambios tempranos en sus hábitos y así prevenir desarrollos posteriores de enfermedades metabólicas (117).

El exceso de grasa corporal en edades tempranas es un marcador de aumento del riesgo cardiometabólico en adolescentes y adultos. Varios estudios longitudinales confirman la asociación de la obesidad infantil con la persistencia de la obesidad en edades posteriores y en edad adulta y con el desarrollo futuro de enfermedades cardiovasculares, diabetes y un mayor riesgo de cáncer (118). Además de los marcadores clásicos de salud cardiometabólica, existen **biomarcadores inflamatorios** que participan en diferentes funciones biológicas, incluyendo inmunidad, sensibilidad a

la insulina, apetito, metabolismo lipídico, función vascular, etc. (119). Entre ellos encontramos la proteína C reactiva (PCR), la interleuquina-8 (IL-8), el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), etc. que suelen estar elevados con la obesidad.

En poblaciones adultas, estos biomarcadores inflamatorios se han asociado con la cronodisrupción (120, 121), y estudios de intervención han mostrado que cuando se induce experimentalmente una cronodisrupción se produce un aumento de las concentraciones plasmáticas de estos marcadores proinflamatorios en adultos sanos (122). Además, la inflamación sistémica de bajo grado es una característica de la obesidad y esta puede estar provocada por la alteración de los ritmos circadianos (2). Sin embargo, se desconoce si la alteración circadiana se asocia con un aumento de los marcadores proinflamatorios en niños de edad escolar y si dicha asociación está mediada por el índice de masa corporal (IMC).

## **5. El uso de saliva para la determinación de la salud cardiometabólica: biomarcadores de inflamación**

Tradicionalmente, para la obtención y el análisis de los biomarcadores inflamatorios se han utilizado métodos invasivos como la extracción de sangre. Sin embargo, se está comenzando a desarrollar una metodología no invasiva como es la detección de estos marcadores en saliva, como alternativa a la extracción sangre, porque puede reducir el estrés asociado a la extracción de sangre y por tanto aumentar las tasas de participación, el número de muestras y así evitar los sesgos poblacionales relacionados con el estrés. Además, partir de este fluido, junto con los biomarcadores inflamatorios, se pueden determinar ritmos diarios de marcadores circadianos y establecer así su asociación con problemas potenciales de salud infantil.

Además, la saliva es fácil, económica y segura de recolectar, aun así, contiene una variedad de compuestos moleculares y bacterianos que pueden cambiar con patologías bucales y sistémicas, y que hay que tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados (123).

Estos biomarcadores pueden ingresar a la saliva por síntesis y secreción por las glándulas salivales o por difusión pasiva o ultrafiltración de la sangre. Este proceso fisiológico puede provocar un retraso en los cambios de concentraciones en la saliva con respecto al suero (124) lo que explica que en algunos casos los biomarcadores determinados en saliva no se correlacionen significativamente con aquellos en suero.

En niños, los biomarcadores salivales se han evaluado en diferentes estudios relacionados con la salud bucal (125), riesgo de enfermedad metabólica (126, 127), sensibilidad al sabor (128) entre otros. Estos estudios han contribuido a que hoy en día se considere la saliva es una fuente valiosa de biomarcadores para la evaluación objetiva de salud y bienestar en los más pequeños. Sin embargo, sorprendentemente el uso de saliva es aún escaso en estudios epidemiológicos, en parte porque faltan estudios globales centrados en la evaluación de múltiples analitos y su correlación con suero, o por la falta de información sobre si estos analitos en saliva pueden capturar cambios metabólicos relacionados con el IMC, la composición de la dieta y la actividad física.

## **6. Cronobiología en niños**

Desde hace unos años se sabe que, ya en las últimas diez semanas de la gestación, el niño empieza a presentar oscilaciones circadianas endógenas (129). Aun así, todavía predominan los ritmos circadianos de la madre sobre el feto, de manera que desde el tercer trimestre del embarazo y durante las primeras semanas tras el nacimiento, la influencia materna sincroniza con el medio ambiente el sistema circadiano inmaduro del feto y del lactante (129).

El ser humano nace con unos ritmos poco desarrollados debido a la inmadurez de los sistemas neurológicos. Tras el nacimiento, los ritmos son predominantemente ultradianos. Es durante las doce primeras semanas de vida cuando los ritmos circadianos del lactante adquieren su mayor desarrollo (130), y es a partir de los 6 meses de edad cuando se genera un ritmo circadiano completo, por lo que se considera que ya existe un sistema circadiano maduro (131).

Con los primeros años de vida, el niño ya es más independiente y su sistema circadiano se irá sincronizando con los factores ambientales que le rodea como son los

ciclos de luz-oscuridad, actividad-reposo, ingesta-ayuno, etc., sin olvidar la influencia materna.

La entrada del niño al colegio es un factor importante en el desarrollo y mantenimiento de un buen estado circadiano del niño. Los horarios de colegio marcan la hora de inicio del día del niño, los horarios de comida, los horarios de actividad física, etc. Mientras que, por el día, el niño está sometido a los horarios establecidos por los padres y obligaciones, por la noche, el niño podrá ser un poco más libre en la elección de sus actividades.

La evaluación de la salud circadiana se ha limitado principalmente a la población adulta. Diversas investigaciones han afrontado el estudio sobre la salud circadiana en lactantes (129), niños preescolares (132), adolescentes (133), sin embargo, los estudios de niños de edad escolar aún son muy escasos.

Uno de los principales desafíos en la cronobiología moderna al estudiar el cronotipo del niño es implementar técnicas objetivas y no invasivas que evalúen la salud circadiana en condiciones de vida libre. Las técnicas invasivas pueden perturbar el estado del niño provocando una situación de estrés, lo que podría alterar los resultados. Tradicionalmente se han utilizado cuestionarios como el cuestionario de Munich (MCTQ) o el cuestionario matutino-vespertino (MEQ) adaptados a la población infantil para la determinación de su tipología circadiana. En niños el cuestionario matutino-vespertino (MEQ) fue usado para detectar problemas de sueño ya que puntuaciones muy altas del MEQ se asociaron con déficit de sueño (134). El cuestionario MCTQ también se ha utilizado para detectar problemas relacionados con el sueño en niños de edad preescolar (131) y en edades posteriores como la edad escolar y la adolescencia, mostrando que ya en la infancia empiezan los horarios de sueño tardíos y no en la adolescencia como se creía (135) por lo que las consecuencias del retraso del sueño deben ya ser valoradas en niños escolares.

Además, los estudios de cronotipo en niños muestran una asociación entre el cronotipo nocturno y un menor rendimiento académico en niños de edad escolar (136) por lo que se ha propuesto que para aumentar el rendimiento académico, los horarios de los exámenes se establezcan según el cronotipo del niño (137). Sin embargo, los

estudios que investigan sobre el cronotipo en niños de edad escolar son escasos y los que lo relacionan con alteraciones metabólicas son casi inexistentes.

Recientemente, el cronotipo en niños se ha evaluado de forma objetiva por medio de la actimetría (138). También se ha utilizado esta técnica para valorar el sueño en niños preescolares (133), de edad escolar (139) y en adolescentes (140) sanos. Aunque también se ha utilizado en niños con enfermedad, como es el caso de metodología para la epilexia (139), hiperactividad (141) obesidad, así como alteraciones en la conductas alimentaria en niños y adolescentes.

Otro método objetivo utilizado en niños es la evaluación de la temperatura periférica que ha sido medida en lactantes (142), niños (40) y adolescentes (143). Se ha registrado el ritmo de temperatura periférica en niños de edad escolar para observar las alteraciones del sueño (144). Sin embargo, pocos estudios han utilizado el ritmo de temperatura como un marcador de salud circadiana y han estudiado la relación con otras patologías en niños de edad escolar. Por esta razón se hace necesario su profundización.

El cortisol y melatonina son dos hormonas circadianas que han sido utilizadas como marcadores del sistema circadiano en adultos. La melatonina también se ha usado en niños de edad escolar para evaluar su inhibición inducida por la luz blanca (79), en desordenes del sueño (145) o en relación al estudio de sus valores dependiendo si los niños iban al colegio por la mañana o por la tarde (134) entre otros. Además esta hormona ha sido utilizada como marcador para evaluar el cronotipo en niños pequeños (146). En cuanto al cortisol como hormona circadiana se ha valorado su papel en niños de edad escolar en relación al estrés (147), a sus valores en presencia de obesidad (148) y a las variaciones sus concentraciones dependiendo si los niños iban al colegio por la mañana o por la tarde (134), pero no se ha utilizado hasta ahora como marcador circadiano en niños.

Además, nunca se han valorado la salud circadiana del niño a través de la variable integradora TAP (Temperatura, Actividad y Posición).

Por otro lado, al plantear esta tesis doctoral queremos dar respuesta a una serie de interrogantes en relación a la función ejercida por los sincronizadores del sistema

circadiano (la hora de la comida, de actividad y la luz) y sus consecuencias en la obesidad y en la salud cardiovascular del niño.

Respecto a la hora de la comida, los estudios sobre el efecto del horario de la cena son escasos en la población infantil y los que recogen su importancia son contradictorios (149, 150). En los niños, cenar tarde se ha relacionado con un aumento del IMC (149), pero hay discrepancia entre estudios. Por ejemplo, no se detectaron ninguna asociación entre la cena tardía y la obesidad en una población de niños del Reino Unido (150). Además, no se han realizado estudios sobre la alimentación tardía y la obesidad que incluyan marcadores inflamatorios y parámetros relacionados con el sistema circadiano en niños de edad escolar.

En cuanto a la actividad física como sincronizador externo y su asociación con la cronodisrupción, sólo encontramos algunos estudios en adolescentes (29). Entre ellos destaca un estudio que muestra cómo los adolescentes más obesos presentaban mayores valores de fragmentación del ritmo de actividad, el cual es un signo de cronodisrupción (29). Aunque este estudio se realizó mediante el uso de actímetros únicamente por el día., y no se ha comprobado estudiando el ritmo completo de actimetría durante las 24h.

En lo que se refiere al uso de saliva para la determinación de biomarcadores del riesgo cardiometabólico e inflamación (127), podrían ser de gran utilidad para estudiar la asociación entre alteraciones circadianas en niños de edad escolar y enfermedades metabólicas. Estudios previos han evaluado biomarcadores de riesgo cardiovascular y del estado metabólico en niños prepúberes (151). A esta edad existen algunos estudios que han valorado las concentraciones de PCR (152), IL6 (124) IL 8 (153), TNF- $\alpha$  (154), etc, en relación con la obesidad. Sin embargo, se desconoce la posible relación entre los biomarcadores inflamatorios y los sincronizadores del sistema circadiano como son los horarios de comida y de actividad física.





Nur Zahra Alya Nabila Binti Mustakim, 7 años, Kajang, Malasia, fotografiada el 24 de marzo de 2017, rodeada de su alimentación habitual. Daily Bread, serie fotográfica de Gregg Segal. Link: <https://www.greggsegal.com/P-Projects/Daily-Bread/22/thumbs>.

## OBJETIVOS



## **I. Estado actual y objetivo general**

La evaluación de la salud circadiana se ha limitado hasta ahora a la población adulta. Los trabajos sobre cronobiología infantil han empezado a emerger, pero todavía hay muy pocos que aborden este campo. Diversas investigaciones han afrontado el estudio sobre la salud circadiana de adolescentes y niños preescolares, sin embargo, las investigaciones de niños de edad escolar aún son escasos.

Con el presente trabajo se pretende caracterizar el cronotipo en niños de edad escolar mediante técnicas objetivas ya utilizadas en adultos, que permitan evaluar de forma conjunta la salud circadiana del niño.

Una vez caracterizado objetivamente el cronotipo del niño, pretendemos dar respuesta a una serie de interrogantes sobre la posible asociación entre la salud circadiana en niños de edad escolar y el grado de sobrepeso y obesidad, así como la relación con biomarcadores de riesgo metabólico y de inflamación determinados en saliva.

También estamos interesados en evaluar los hábitos de vida de los niños, en especial aquellos relacionados con el sistema circadiano. Principalmente nos interesa estudiar aquellos que actúan como sincronizadores externos de los ritmos endógenos, como son 1) los hábitos de ingesta y ayuno, en especial el horario de las cenas, que es cuando el niño tiene mayor libertad de elección. 2) Los hábitos de actividad y reposo durante las 24h del día, incluyendo las horas de sueño. 3) Los cambios de luz y oscuridad, para detectar si hay exposición a luz nocturna.

Para ello evaluaremos los ritmos a lo largo de las 24 horas del día y durante 7 días, y de esta manera determinaremos si estos ritmos son o no adecuados para la salud circadiana del niño y si las alteraciones en estos ritmos se asocian con obesidad o con diferentes biomarcadores de inflamación o riesgo cardiometabólico

## 2. Objetivos

**Objetivo 1:** Desarrollar un índice o “score” circadiano que, mediante la combinación de herramientas no invasivas, sea capaz de detectar el funcionamiento circadiano en niños de edad escolar. También se pretende explorar las diferencias circadianas entre niños y niñas y de estos con una población adulta.

**Objetivo 2:** Valorar el uso de la saliva como herramienta no invasiva en niños de edad escolar para la determinación de biomarcadores inflamatorios y de riesgo cardiovascular que nos permita detectar los cambios metabólicos asociados con el índice de masa corporal (IMC), las características dietéticas (ingesta y composición) y la actividad física.

**Objetivo 3:** Evaluar el cronotipo del niño por medio de técnicas objetivas como la variable integradora TAP (Temperatura, Actividad y Posición) y estudiar su posible relación con el jet lag social, la exposición a luz nocturna, y las alteraciones del sueño, así como su relación con las notas académicas y el riesgo metabólico.

**Objetivo 4:** Averiguar si la hora de la cena influye en la obesidad y en la salud cardiometabólica del niño en edad escolar.

**Objetivo 5:** Estudiar la posible asociación entre las características del ritmo de actividad/reposo y la obesidad, así como con diversos biomarcadores inflamatorios de salud cardiometabólica.

**Objetivo 6:** Averiguar si el “score” circadiano desarrollado en el objetivo 1 es capaz de detectar enfermedades tales como la obesidad.



Alexandra (9 años, izquierda) y Jessica (8 años, derecha) Lewis, Altadena, CA, EE. UU.

Fotografiadas el 21 de febrero de 2016, rodeadas de su alimentación habitual. Daily

Bread, serie fotográfica de Gregg Segal. Link: [https://www.greggsegal.com/P-](https://www.greggsegal.com/P-Projects/Daily-Bread/22/thumbs)

[Projects/Daily-Bread/22/thumbs](https://www.greggsegal.com/P-Projects/Daily-Bread/22/thumbs)

## MATERIAL Y MÉTODOS



## **1. Material y métodos comunes a todos los objetivos**

### **1.1. Población de estudio**

Cuatrocientos treinta y dos niños sanos de 8 a 12 años fueron reclutados de tres escuelas del área mediterránea de España entre octubre de 2014 y junio de 2016 (Población ONTIME-Jr) (ClinicalTrials.gov ID: NCT02895282). Dos escuelas urbanas, una pública y otra privada, y una escuela pública rural fueron elegidas para proporcionar una muestra representativa de la población en esta zona de España. La duración del estudio en cada niño fue de 7 días. La aprobación de este proyecto fue obtenida por el Comité de Ética de la Universidad de Murcia. A los padres se les proporcionó un consentimiento por escrito para la participación de cada niño en el presente estudio. Todos los procedimientos realizados en esta investigación, la cual trata con participantes humanos, estaba de acuerdo con los estándares éticos del Comité de Investigación Institucional y Nacional, con la Declaración de Helsinki de 1964 y con sus enmiendas posteriores o estándares éticos comparables.

### **1.2. Mediciones antropométricas y composición corporal**

Las medidas antropométricas se recogieron el primer día de la semana de estudio. El peso corporal se valoró en sujetos descalzos usando ropa ligera mediante una balanza digital con una precisión de 0.1 kg. La altura se determinó utilizando un estadiómetro portátil (rango, 0.14-2.10). Los sujetos se colocaron en posición vertical, relajados y con la cabeza en el plano de Frankfort. Estos datos fueron utilizados para el cálculo del índice de masa corporal (IMC) de acuerdo con la fórmula: peso (kg) / altura<sup>2</sup> (m<sup>2</sup>). La grasa corporal total fue determinada por impedancia bioeléctrica, utilizando el equipo TANITA TBF-300 (Tanita Corporation of America, Arlington Heights, IL). La circunferencia de la cintura se midió en el área más estrecha del tronco.

### 1.3. Herramientas circadianas en la población infantil

#### a) Cuestionarios de alimentación y sueño

Los niños junto a sus padres completaron diarios adaptados a su grupo de edad (155). El cuestionario de ingesta de alimentos (registro dietético de 7 días) incluye: horarios de las comidas, tipo y cantidad de alimentos. El diario de sueño incluye: a) sueño nocturno (hora de acostarse, número de despertares durante el sueño, duración del sueño y hora de levantarse); b) horario y duración de siestas (156).

#### b) Cronotipo subjetivo

Se utilizó una versión española apropiada para la edad del cuestionario de Munich (MCTQ) (17). Se calculó el centro del sueño de los días de colegio y el de los días de fin de semana. El jet lag social se definió como la diferencia entre el centro del sueño de fin de semana (MSF) y el centro del sueño de los días de colegio (MSW); (Jet lag social = MSF-MSW). El niño presentaría jet lag social si esta diferencia es superiora 2h.

#### c) Cortisol y melatonina

- *Cortisol*. Las muestras de saliva para la determinación del cortisol en saliva se recolectaron en la población de niños utilizando el sistema de Salivete (Sarstedt, Barcelona, España) el domingo de la semana de estudio para ser recogidas el lunes (157). Las muestras de cortisol salival se recogieron antes de desayunar a las 09:00h de la mañana, antes de la comida del mediodía a las 14:00h y a las 23:00h de la noche, después de la cena. Los salivetes se envolvieron en papel de aluminio y se conservaron en la nevera a una temperatura de alrededor de 4°C, hasta su recogida el día siguiente. Dichos salivetes se centrifugaron para la obtención de la saliva, la cual se repartió en alícuotas de 500 µl en criotubos para su posterior congelación y almacenamiento a -80°C hasta su análisis. Las concentraciones salivales de cortisol se midieron mediante radioinmunoensayo (RIA) (IZASA, Barcelona, España). Se calculó el ratio mañana/noche, ya que es considerado como un marcador de cronodisrupción (158).

- *Melatonina*. Las muestras de saliva para la determinación de melatonina se recolectaron el mismo día que la recogida de muestras para el cortisol, utilizando el

sistema Salivete (Sarstedt, Barcelona, España). Dichas muestras se recogieron justo antes de comer a las 14:00h del medio día y a la 01:00h de la madrugada. Los salivetes se envolvieron en papel de aluminio y se conservaron en la nevera a una temperatura de alrededor de 4°C hasta su recogida. Las muestras de saliva se centrifugaron y se repartieron en alícuotas de 500 µl en criotubos para su posterior congelación y almacenamiento a -80°C hasta su análisis. Las concentraciones de melatonina salival se midieron mediante radioinmunoensayo (RIA) (IBL, Alemania).

#### **d) Medida de la temperatura corporal periférica, actividad física y posición corporal.**

Los niños usaron durante 7 días de estudio un reloj de pulsera colocado en la mano no dominante. Además, debían quitarse el reloj solamente para ducharse o si tenían alguna actividad acuática. Este reloj de pulsera integra dos sensores diferentes:

a) *Sensor de temperatura*: El ritmo de la temperatura periférica de la muñeca se evaluó durante 7 días de forma continua usando un sensor de temperatura (Thermochron iButton DS1921H, Dallas, Maxim, Dallas, TX, EE.UU) que se programó para recopilar información cada 5 min con una sensibilidad de 0.125°C. Se colocó en la muñeca sobre la arteria radial de la mano no dominante, como se describió previamente por Sarabia *et al.*, (39). La información almacenada en el iButton se transfirió a través de un adaptador (DS1402D-DR8, Dallas, Maxim) a un ordenador. Para mitigar el enmascaramiento provocado por la temperatura ambiental, el estudio se realizó entre octubre y mayo, evitando las extremas temperaturas ambientales típicas del sur de España en verano.

b) *Actímetro*: Los ritmos de actividad/reposo y de posición del cuerpo se evaluaron durante los mismos 7 días. Para ello, se utilizó un sensor de aceleración HOBO Pendant UA UA-004-64 (Onset Computer, Bourne, MA, EE.UU) que estaba programado para registrar datos cada 30 segundos. La información almacenada en el actímetro se transfirió a través de un adaptador óptico USB (MAN-BASE-U-4, HOBO, Onset Computer) a un ordenador utilizando el software proporcionado por el fabricante (HOBOWare v. 2,2). A partir de la información proporcionada por el actímetro se definieron dos variables: actividad motora (A) y posición corporal (P). En primer lugar,

la actividad se calculó como grados de cambio en la posición de los ejes X, Y y Z con respecto al tiempo de muestreo anterior, como se describe por Ortiz-Tudela *et al*, (42) En segundo lugar, P se calculó como el ángulo entre el eje X del actímetro y el plano horizontal, siendo el valor 0° cuando el brazo estaba en posición horizontal y 90° cuando estaba verticalmente.

#### **e) Variable integradora TAP (Temperatura, Actividad y Posición) y sueño**

Las medidas de la temperatura de la periférica, actividad motora y posición del cuerpo fueron finalmente integradas en una variable llamada TAP validada por Ortiz-Tudela *et al* (42). Para calcular la variable integradora TAP, primero se normalizaron las variables de temperatura, actividad y posición calculando los percentiles 95 y 5 para cada variable. Los valores de temperatura periférica se invirtieron ya que los valores de actividad y posición eran opuestos, de modo que los valores máximos para las tres variables concurren a la misma hora del día. Después se calculó la media de las 3 variables normalizadas, donde 0 correspondía al reposo y sueño y 1 a actividad en movimiento. Más tarde se calculó un umbral individualizado a partir de la distribución de frecuencias del TAP, para el análisis individualizado de los patrones de sueño. Se calificó como sueño cuando TAP estaba por debajo de un umbral predeterminado, previamente validado por polisomnografía (48). El tiempo en movimiento, fue definido como el tiempo en que se detectó un movimiento en cualquiera de los tres ejes, y se utilizó para discriminar entre los estados de sueño y vigilia.

Para caracterizar las variables de temperatura, actividad, posición y TAP, calculamos sus parámetros usando métodos paramétricos y no paramétricos:

- a) Se aplicó el análisis de Cosinor para calcular: mínimo; mesor, amplitud, acrofase, porcentaje de ritmicidad y rayleigh (ver glosario).
- b) Se realizaron análisis no paramétricos para calcular: estabilidad interdiaria, variabilidad intradía y amplitud relativa. El índice de función circadiana (CFI) se calculó como el promedio de estos tres parámetros (ver glosario). M5 y su hora (TM5) y M10 y su hora (TM10) también fueron calculados.

Todos los parámetros rítmicos se obtuvieron utilizando un integrado paquete para análisis de series temporales Kroniwizard (<https://kronowizard.um.es/kronowizard>) (Laboratorio de Cronobiología, Universidad de Murcia, España, 2015). Estos datos se procesaron para eliminar mediciones erróneas, como las producidas por la eliminación temporal del sensor en el momento de la ducha.

## **2. Material y métodos específicos según los objetivos**

### **2.1. Población adulta (*Objetivo 1*)**

Se compararon ciertos parámetros de la población infantil con una población adulta compuesta por 177 mujeres sanas de la misma zona mediterránea.

### **2.2. Medición de la luz (*Objetivo 1 y 3*)**

La exposición a la luz se midió únicamente en una submuestra de la población (n=122), porque decidimos analizar la variable de luz cuando el estudio había comenzado. Dicho registro se realizó a través de un luxómetro colgante HOBO UA-002- (Onset Computer, Bourne, Massachusetts, USA.). Se programó el dispositivo para recopilar la información de luz cada 30s durante los 7 días del estudio. A los niños se les informó que debían llevar el luxómetro como un colgante sobre su ropa y que podían dejarlo en una mesita de noche cuando se fueran a la cama.

### **2.3. Cronotipo objetivo (*Objetivo 3*)**

La acrofase del TAP determinada por el análisis de Cosinor se utilizó como un biomarcador objetivo del cronotipo individual. Los cronotipos vespertino, indefinido y matutino se clasificaron de acuerdo con los tertiles de la acrofase (valores más altos para los vespertinos).

### **2.4. Clasificación en cenadores tardíos (LDE) y tempranos (EDE) (*Objetivo 4*)**

De un total de 432 niños, 397 completaron el registro dietético de 7 días que incluía cantidades y horarios de comida. Estos niños se clasificaron en dos grupos según la mediana de la hora de la cena, 21:07 hh:mm. Los niños que cenaron antes de las 21:07

hh:mm fueron considerados cenadores tempranos (EDE), mientras que los que cenaron después de las 21:07 hh: mm fueron cenadores tardíos (LDE).

## **2.5. Biomarcadores en saliva y suero (*Objetivo 2, 3, 4 y 5*)**

La saliva para la determinación de biomarcadores (n = 129), se recogió a través de un pequeño hisopo de algodón dentro de un salivete (Salivette; Sarstedt, Barcelona, España), que posteriormente se centrifugó. Se recogieron muestras por la mañana en ayunas. Todas las muestras se mantuvieron refrigeradas a 4 °C, hasta su entrega al laboratorio y luego se almacenaron a -80 °C hasta ser analizadas como en el caso de las muestras de cortisol y melatonina.

Además de la recolección de saliva, se obtuvieron muestras de suero por la mañana en ayunas en una submuestra de 79 niños a través de una extracción de sangre. Las muestras de suero se almacenaron -80 °C hasta el momento de su análisis. Sólo se extrajeron sangre aquellos niños que asistieron a una revisión pediátrica rutinaria y se interesaron por la participación en el estudio.

La glucosa se determinó por un método basado en hexoquinasa (Beckman Coulter Ireland Inc., Irlanda). Los triglicéridos fueron cuantificados por un método basado en una serie de reacciones enzimáticas acopladas (Beckman Coulter Ireland Inc., Irlanda). Los dos parámetros fueron analizados por un analizador bioquímico automatizado (Olympus AU600, Olympus Diagnostica GmbH, Friburgo, Alemania). Las interleuquinas (IL) 1 $\beta$ , IL-6, IL-8, insulina, leptina, proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento del hepatocito (HGF) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) se analizaron utilizando kits comerciales (MILLIPLEX MAP Human Adipokine Magnetic Bead Panel 2 e Endocrine Multiplex Assay; Life Science, Darmstadt, Germany) según las indicaciones del fabricante. La proteína C reactiva (PCR) se analizó utilizando un kit comercial (MILLIPLEX MAP Human e PCR Assay; Life Science, Darmstadt, Germany) según las indicaciones del fabricante. Los valores se calcularon en función de una curva estándar construida para el ensayo. La evaluación del modelo homeostático de resistencia a la insulina, el índice (HOMA-IR) se calculó de acuerdo con la fórmula: insulina (microU / L) glucosa en ayunas (159).

## 2.6. Notas académicas (*Objetivo 4*)

Se recogieron las notas académicas de una subpoblación (n=92). Las calificaciones para cada materia se determinaron por las evaluaciones obtenidas durante el curso académico. Las notas académicas que fueron evaluadas son lengua castellana y literatura, matemáticas, ciencias naturales, ciencias sociales, inglés, francés, educación artística, educación física y religión católica. Se calculó la calificación media de todas las materias.

## 3. Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos se realizaron con SPSS versión 20.0 (SPSS, Chicago, Illinois, EE. UU.). Los valores de  $P < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos. Los análisis estadísticos realizados los podemos clasificar en función del objetivo a conseguir:

- **Para la consecución de objetivo 1:**

### Cálculo del *Score Circadiano*:

Para cada participante, se obtuvo un score que incluía variables relacionadas con el sistema circadiano donde cada una de esas variables se le asignaba un peso o carga. Para este propósito, y como primer paso, se ejecutó un análisis factorial. Esta metodología determina si una gran cantidad de biomarcadores del sistema circadiano, podría ser reemplazado por un menor número de patrones o factores subyacentes y saber cómo contribuyeron a explicar el proceso general de la función del sistema circadiano.

El análisis factorial busca patrones o factores que tienen valores mayores que uno. Para este análisis, se utilizó el método de rotación ortogonal. Las cargas de los factores rotados (patrón) son los coeficientes del factor después del proceso de rotación y muestran el grado en que la variable dada se representa en un factor particular. El análisis factorial se aplicó a todas aquellas variables que han sido previamente demostradas de ser buenos marcadores del estado del sistema circadiano en estudios previos y que comprenden todas las variables descritas anteriormente.

La **Tabla 1** muestra el resultado del análisis factorial. Se obtuvo cinco patrones que representaron ~ 50% de la varianza. Así, diferentes combinaciones de estos factores podrían generar el 50% de la información total del sistema circadiano. Las cargas para los cinco factores principales se muestran en la Tabla 1. Los factores 1 y 2 explican ~ 28% de varianza, la carga más alta y positivamente vino determinado por las características diarias ritmo de TAP, mientras que el factor 3 explicaba ~ 10% de la varianza, correspondiente a la carga del cortisol. Los factores 4 y 5 explicaron ~ 13% de la varianza y corresponden a la carga de los horarios de ingesta de alimentos (desayuno y cena). Estos cinco factores del análisis factorial fueron considerados para determinar el score circadiano total, **Tabla 2**.

Para cada participante, la puntuación del Factor 1 se calculó multiplicando el valor de CFI del TAP por la carga (0.96); además, el valor de la amplitud del TAP por su carga (0.96) y el valor del porcentaje de ritmicidad (PR) por su carga (0.92); y así sucesivamente para incluir todas las características del ritmo diario de TAP presente en el primer factor (Tabla 2). Se realizaron cálculos similares para las puntuaciones de los cinco factores. Para obtener un score circadiano final, realizamos la media ponderada de los primeros cinco factores (multiplicada por el % de varianza de cada factor) usando la siguiente ecuación.

$$\text{Score circadiano final} = (\text{score F1} * \% \text{ varianza F1}) + (\text{score F2} * \% \text{ varianza F2}) + (\text{score F3} * \% \text{ varianza F3}) + (\text{score F4} * \% \text{ varianza F4}) + (\text{score F5} * \% \text{ de varianza F5})$$

Un score circadiano similar se ha utilizado y validado previamente en una población adulta (70 mujeres) de la misma área mediterránea para capturar el estado de su sistema circadiano (158).

**Tabla 1.** Análisis factorial de los biomarcadores en el sistema circadiano.

Factores	Cargas de las variables por factores				
	F1	F2	F3	F4	F5
TAP CFI (AU)	0.96				
TAP Amplitud (AU)	0.96				
TAP PR (AU)	0.92				
TAP IS (AU)	0.92				
TAP AR (AU)	0.89				
TAP mesor (AU)		0.95			
TAP medio (AU)		0.95			
Cortisol 23:00h (nmol/L)			0.91		
Ratio cortisol día/noche			-0.89		
Cortisol 14:00h (nmol/L)			0.71		
Inicio hora de la cena (hh:mm)				0.95	
Final hora de la cena (hh:mm))				0.93	
Inicio hora del desayuno (hh:mm)					0.95
Final hora del desayuno (hh:mm)					0.92
<b>% Variabilidad total</b>	16.96	10.42	8.42	7.86	6.12

TAP: variable integradora que combina datos de temperatura, actividad y posición, Unidades Arbitrarias: AU, Índice de funcionalidad circadiano: CFI, porcentaje de ritmicidad: PR, estabilidad interdiaria: IS and amplitud relativa: AR.

#### Discriminar la función circadiana entre niñas y niños.

Los datos circadianos obtenidos derivados de las herramientas no invasivas se compararon entre niñas y niños mediante la prueba t de Student. Además, se realizó un análisis discriminante (160) para determinar si las características circadianas podrían clasificar de manera fiable diferencias en función del sexo. En este estudio, las variables circadianas fueron tratadas como predictores. Las pruebas univariantes fueron entonces calculadas para determinar la importancia de cada variable independiente en la formación de las funciones discriminantes. Examinando los valores de Lambda de Wilk para cada uno de los predictores, se determinó cuánto de importante era la variable independiente para la función discriminante. Valores más pequeños representan mayor importancia.

#### Comparación de los patrones de temperatura de la muñeca entre niños y adultos

Las variables relacionadas con el sistema circadiano obtenidas a partir de ritmos de 24h de la temperatura y el patrón diario entre niños y adultos se compararon por la prueba t de Student.



**Tabla 2.** Factores calculados para determinar el score circadiano para cada sujeto estudiado.

<b>Factor</b>	<b>Definición</b>
Factor 1 (F1)	$TAP\ CFI * 0.96 + TAP\ Amplitud * 0.96 + TAP\ PR * 0.92 + TAP\ IS * 0.92 + TAP\ AR * 0.89 = F1\ score.$
Factor 2 (F2)	$TAP\ mesor * 0.95 + TAP\ average * 0.95 = F2\ score.$
Factor 3 (F3)	$Cortisol\ 23:00 * 0.91 + Log\ Ratio\ Cortisol\ * (-0.89) + Cortisol\ 14:00 * 0.71 = F3\ score.$
Factor 4 (F4)	Inicio de la hora de la cena * 0.95 + Final de la hora de la cena * 0.93 = F4 score.
Factor 5 (F5)	Inicio de la hora del desayuno * 0.95 + Final de la hora del desayuno * 0.92 = F5 score.

TAP: variable integradora que combina datos de temperatura, actividad y posición

- **Para la consecución de objetivo 2:**

Como los datos no pasaron la prueba de normalidad, se utilizó la prueba de correlación de Spearman para comparar las concentraciones salivales y séricas de los biomarcadores estudiados y se realizaron correlaciones de Pearson entre los biomarcadores con el IMC, la composición de la dieta y actividad física. Se usó la prueba U de Mann-Whitney para comparar las concentraciones de biomarcadores séricos y salivales entre niños y niñas y los biomarcadores salivales entre niños con peso normal y sobrepeso/obesos. Los niños fueron categorizados en peso normal y sobrepeso/obesidad según el sexo y la edad.

Los puntos de corte de IMC propuestos se realizaron a través de International Obesity Task Force (161). Se usó una prueba de correlación parcial para las correlaciones entre biomarcadores salivales y composición dietética y entre biomarcadores salivales y actividad física ambos ajustados por el IMC. Biomarcadores únicos y comunes al IMC, variables de la composición de la dieta y actividad física se representaron gráficamente a través del diagrama de Venn (<http://funrich.org/index.html>) (162).

- **Para la consecución de objetivo 3:**

Se realizó un análisis estadístico ANOVA para determinar las diferencias entre los niños matutinos, indefinidos y vespertinos ajustados por sexo, edad, raza y curso académico. Además, se realizaron correlaciones de Pearson entre la acrofase TAP y las características circadianas y parámetros metabólicos. Los biomarcadores en saliva y suero se transformaron en logaritmos.

- **Para la consecución de objetivo 4:**

En primer lugar, los niños fueron dicotomizados entre cenadores tempranos (EDE) y cenadores tardíos (LDE) para la hora de la cena utilizando los valores de la mediana de la población como punto de corte, información proporcionada anteriormente.

El análisis estadístico descriptivo incluyó el cálculo de la media y la desviación estándar (DE) para variables continuas. Las diferencias entre LDE y EDE se analizaron mediante una prueba univariante ajustada por sexo, escuela, edad y curso académico. Los biomarcadores salivales no siguieron una distribución normal, por lo que se utilizaron con pruebas no paramétricas y se presentaron como medianas y percentiles 5% y 95%. El ratio cortisol salival mañana-noche fue transformado en logaritmo.

- **Para la consecución de objetivo 5:**

Realizamos un análisis descriptivo en el que comparamos las características generales de los participantes de acuerdo con sus categorías de IMC (peso normal vs. sobrepeso/obesidad) utilizando pruebas de chi-cuadrado para variables categóricas o pruebas de Kruskal-Wallis para variables continuas. En la asociación entre diferentes parámetros de ritmo de actividad/reposo y el IMC, examinamos las asociaciones entre el aumento de una unidad de desviación estándar (DE) en cada parámetro de ritmo de actividad y el IMC utilizando modelos de regresión lineal.

Los marcadores inflamatorios se transformaron utilizando el logaritmo natural para todos los análisis, y se expresaron como el cambio porcentual por el aumento de 1 unidad de DE en cada parámetro del ritmo de actividad. Los modelos con IMC, IgA o PCR se ajustaron por edad, sexo, colegio y curso. Los modelos con IL8, IL1b, TNF $\alpha$  o MCP1, se ajustaron por edad, sexo y curso, ya que esas medidas solo estaban disponibles en una submuestra.

Para examinar si la influencia de las características del ritmo de actividad/reposo era independiente o variaba según la duración del sueño y la actividad, ajustamos por la duración total del sueño y la actividad media diaria en modelos multivariados. Completamos los análisis estadísticos utilizando R 3.5.1.

- **Para la consecución de objetivo 6:**

La población se clasificó según su grado de obesidad en niños con normopeso, sobrepeso y obesidad descrito previamente. La regresión lineal se utilizó para evaluar las asociaciones entre las variables relacionadas con el sistema circadiano y el índice de masa corporal (IMC) o la masa de grasa corporal (%). Los análisis se ajustaron por raza, edad, colegio y sexo. Además, aplicamos los modelos de regresión logística multinomial para estimar los odds ratios (OR) y los CI (intervalo de confianza) del 95% en las variables relacionadas con el sistema circadiano. Para comparar los patrones de temperatura periférica y las variables relacionadas con el circadiano entre niños con peso normal, sobrepeso y obesidad, se utilizó el análisis ANOVA.



Meissa Ndiaye, 11 años, Dakar, Senegal, fotografiado el 30 de agosto de 2017, rodeado de su alimentación habitual. Daily Bread, serie fotográfica de Gregg Segal. Link: <https://www.greggsegal.com/P-Projects/Daily-Bread/22/thumbs>

## RESULTADOS



Los resultados obtenidos para cada objetivo propuesto se describen a continuación:

## 1. Resultados específicos para el objetivo 1

Hemos desarrollado un índice o “score” circadiano que, mediante la combinación de herramientas no invasivas, ha sido capaz de detectar el funcionamiento circadiano en niños de edad escolar. También hemos determinado las diferencias circadianas entre niños y niñas y comparado con una población adulta. Estos resultados se han obtenido en una subpoblación de 248 niños de la población total que fue de 432 niños.

A continuación, se muestra la tasa de participación y porcentaje de éxito que se obtuvo a la hora de determinar el score circadiano.

En la **Tabla 3** se observa que los colegios urbanos tuvieron la mayor tasa de participación (urbano 65-95% vs. rural 41%). Los sensores circadianos, funcionaron adecuadamente y registraron los 7 días en un 96% de los niños para la temperatura periférica, en un 97% para la actimetría y en un 100% de los niños a los que se les midió la luz con el luxómetro (n=20). Las muestras de cortisol a las 14:00h fueron las más fáciles de obtener (92%), mientras que tuvimos mayores dificultades para recoger las muestras de melatonina a la 01:00h de la

**Tabla 3.** Ratio de participación y éxito de cada variable aplicada.

n=248	Éxito (%)
<b>Para cada colegio</b>	
Público (área urbana)	168/176 (95)
Publico (área rural)	63/155 (41)
Privado (área urbana)	17/26 (65)
<b>Sensores circadianos</b>	
Temperatura	237 (96)
Actímetro	241 (97)
Luxómetro*	20 (100)
<b>Muestras de saliva</b>	
Melatonina 01:00h	178 (72)
Melatonina 14:00h	230 (93)
Cortisol 09:00h	218 (88)
Cortisol 14:00h	227 (92)
Cortisol 23:00h	224 (90)
<b>Cuestionarios</b>	
Registro dietético de 7 días	227 (92)
Diario de sueño	240 (97)
Diario de actividad	234 (94)
MCTQ	241 (97)

\* n=20, MCTQ: Cuestionario de Munich.

madrugada (72%). Las tasas de finalización de los cuestionarios fueron más altas para MCTQ (97%) y más bajas para el registro dietético de 7 días (92%) (Tabla 3).

### Score circadiano

Los datos obtenidos de cada una de las técnicas no invasivas utilizadas se estudiaron mediante un análisis factorial (análisis de componentes principales) que identificó cinco factores independientes que explicaron el 50% de la varianza total (Tablas 1 y 2). La mayoría de las variables ubicadas en el primer factor se derivaron a partir del ritmo TAP de 24h. El CFI se posicionó en el primer lugar, lo que resalta su importancia en la determinación del score circadiano. El score circadiano presentó una gran variabilidad en la muestra estudiada siendo esta de 542 a 1555.

### Diferencias respecto al sexo en la función circadiana

El score circadiano fue significativamente mayor en niñas que en niños (**Tabla 4**). La variable integradora TAP resultó ser sensible a la detección de las diferencias entre sexos en cuanto a las características circadianas, mostrando un mejor CFI en niñas que en niños (Tabla 4). Todos los parámetros del TAP cuyo aumento demuestra una mejor salud circadiana, tales como la estabilidad interdiaria, la amplitud, la amplitud relativa, el rayleigh y el porcentaje de ritmicidad, fueron mayores en niñas que en niños (Tabla 4).

La **Figura 6** representa los ritmos de 24 horas (evaluados durante 7 días) de la temperatura periférica, la actividad y posición de la población estudiada. Tal y como se observa, las niñas presentaron temperaturas significativamente más altas que los niños, especialmente entre las 00:20 y las 07:10 h ( $P<0.05$ ) (**Figura 6A**) y tuvieron un aumento significativo en M5 ( $P<0.05$ ). Las niñas también mostraron un mínimo de temperatura significativamente mayor en comparación con los niños ( $P<0.05$ ) (Tabla 4).

**Tabla 4.** Diferencias entre niños y niñas en las variables circadianas.

	Total N = 248	DE	Niños N = 125	DE	Niñas N = 123	DE	<i>P-value</i>
<b>VARIABLES CIRCADIANAS</b>							
<b><u>Score circadiano</u></b>	1188	165	1159	173	1216	153	<b>0.012</b>
<b><u>TAP</u></b>							
Media (AU)	0.43	0.03	0.43	0.04	0.44	0.02	<b>0.001</b>
Mesor (AU)	0.43	0.03	0.43	0.04	0.44	0.02	<b>0.001</b>

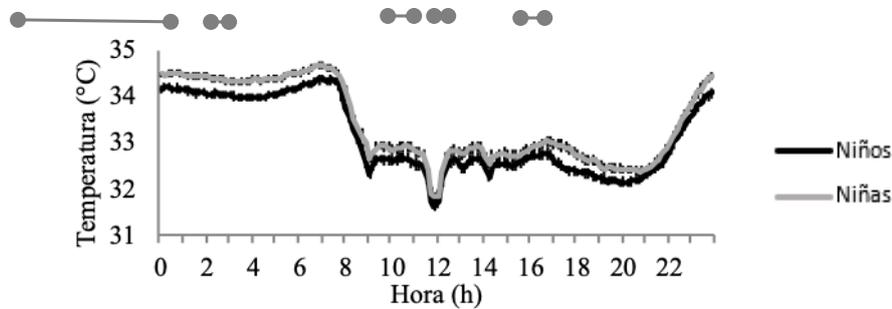
IS (AU)	0.59	0.10	0.58	0.11	0.61	0.09	<b>0.012</b>
Amplitud (AU)	0.26	0.04	0.25	0.04	0.27	0.04	<b>&lt;0.001</b>
Rayleigh (AU)	0.89	0.19	0.86	0.22	0.91	0.15	<b>0.023</b>
PR	42	10	40	11	4	9	<b>0.002</b>
M10 (AU)	0.62	0.04	0.60	0.04	0.63	0.03	<b>&lt;0.001</b>
AR (AU)	0.59	0.09	0.58	0.09	0.61	0.08	<b>0.044</b>
CFI	0.66	0.06	0.65	0.07	0.67	0.06	<b>0.011</b>
<b><u>Temperatura</u></b>							
Mínimo (°C)	30.14	0.84	30.02	0.75	30.26	0.90	<b>0.028</b>
M5 (°C)	34.44	0.85	34.32	0.84	34.57	0.84	<b>0.021</b>
<b><u>Actividad</u></b>							
Media (°/min)	47.27	5.96	46.07	6.09	48.45	5.62	<b>0.002</b>
Mesor (°/min)	47.32	5.97	46.15	6.07	48.48	5.66	<b>0.002</b>
Amplitud (°/min)	39.30	6.20	37.93	6.46	40.67	5.63	<b>0.001</b>
IV	0.86	0.06	0.87	0.06	0.85	0.06	<b>0.007</b>
PR	22.05	5.12	20.90	5.17	23.18	4.84	<b>&lt;0.001</b>
M10 (°/min)	75.25	9.62	73.12	9.92	77.36	8.87	<b>0.001</b>
AR (°/min)	0.85	0.44	0.84	0.04	0.86	0.04	<b>0.001</b>
CFI	0.60	0.04	0.59	0.04	0.61	0.04	<b>0.003</b>
<b><u>Posición</u></b>							
IV	0.93	0.18	0.88	0.18	0.97	0.16	<b>0.001</b>
TM10 (h)	16:26	2:28	16:06	2:37	16:45	2:15	<b>0.040</b>
CFI	0.35	0.06	0.36	0.06	0.34	0.06	<b>0.022</b>
<b><u>Concentraciones de cortisol (nmol/l)</u></b>							
09:00h	14.22	6.17	13.92	6.51	14.52	5.84	0.458
14:00h	7.16	3.70	7.37	3.24	6.97	4.10	0.396
23:00h	4.20	3.09	4.41	2.93	3.99	3.24	0.298
Mañana-noche ratio*	0.91	0.31	0.87	0.34	0.95	0.27	<b>0.033</b>
Mañana/noche ratio*	0.66	0.46	0.59	0.42	0.73	0.49	<b>0.025</b>
<b><u>Concentraciones de melatonina (pg/ml)</u></b>							
14:00h	7.97	7.25	8.22	8.33	7.72	6.02	0.593
1:00h	30.11	22.90	31.44	26.70	28.80	18.50	0.374
Noche-día ratio*	1.22	0.40	1.22	0.40	1.22	0.38	0.981
Noche/día ratio*	0.58	0.31	0.58	0.33	0.58	0.29	0.847
<b><u>Composición de la dieta</u></b>							
Energía (kcal)	2054	391	2135	381	1973	386	<b>0.002</b>
Proteínas (g)	73	15	76	16	69	13	<b>0.001</b>
Carbohidratos (g)	223	58	231	57	214	58	<b>0.028</b>
Lípidos (g)	101	23	104	27	98	18	0.058
Energía (kcal/kg)	56.43	16.92	57.96	16.62	54.90	17.14	0.176
Proteínas (g/kg)	1.98	0.61	2.05	0.58	1.93	0.63	0.142
Carbohidratos (g/kg)	6.13	2.17	6.29	2.18	5.96	2.15	0.248
Lípidos (g/kg)	2.78	0.90	2.83	0.96	2.73	0.84	0.432
<b><u>Horarios de comida (hh:mm)</u></b>							
Hora del desayuno	8:30	0:24	8:26	0:24	8:34	0:24	<b>0.011</b>
Hora de la comida	14:28	0:19	14:27	0:19	14:29	0:19	0.367

Hora de la cena	21:03	0:31	21:03	0:31	21:04	0:31	0.721
<b>Diario de sueño (hh:mm)</b>							
Hora de irse a la cama	22:35	0:44	22:32	0:42	22:37	0:46	0.389
Hora de levantarse	8:10	0:24	8:08	0:22	8:12	0:27	0.273
Duración del sueño	9:27	0:31	9:27	0:38	9:26	0:43	0.731
MCTQ (hh:mm)	3:58	0:39	3:50	0:36	4:05	0:40	<b>0.003</b>
Jet Lag Social (hh:mm)	0:49	0:28	0:44	0:28	0:54	0:28	<b>0.008</b>

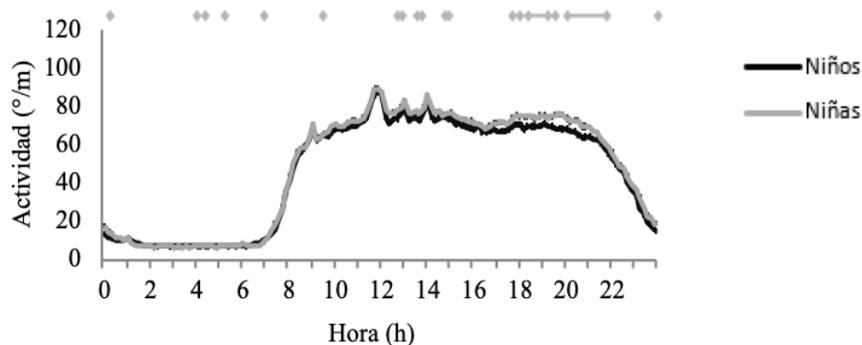
Los datos se expresaron como media  $\pm$  DE (DE: desviación estándar), \* (log). Unidades arbitrarias: AU; IS: estabilidad interdiaria; IV: variabilidad intradiaria; PR: porcentaje de ritmicidad; M5: promedio de las cinco horas consecutivas de valores máximos y su hora (TM5); M10: promedio de las diez horas consecutivas de valores máximos y su hora (TM10); AR: amplitud relativa; y CFI: índice de funcionalidad circadiana; MCTQ: Cuestionario de Múnich.

Respecto a los resultados obtenidos por la actimetría, en general las niñas presentaron un nivel de actividad mayor que los niños ( $^{\circ}/\text{min}$ ) (media, mesor, M10), principalmente en las horas de la tarde, de 16:00h a 21:30h (**Figura 6B**), menor fragmentación del ritmo (según lo evaluado por la variabilidad intradiaria) y mejor función circadiana (CFI) ( $P < 0.05$ ) (Tabla 4).

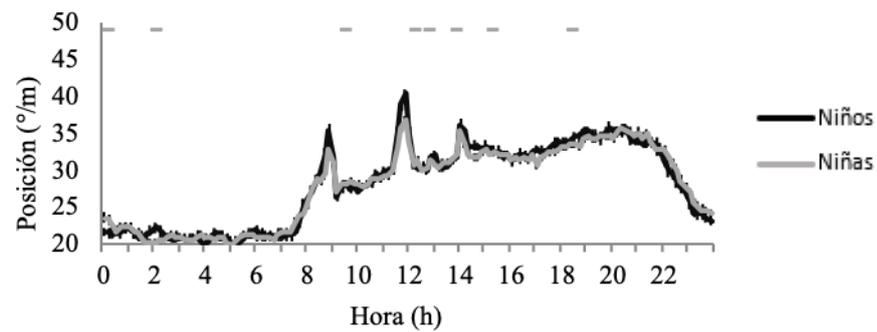
6A)



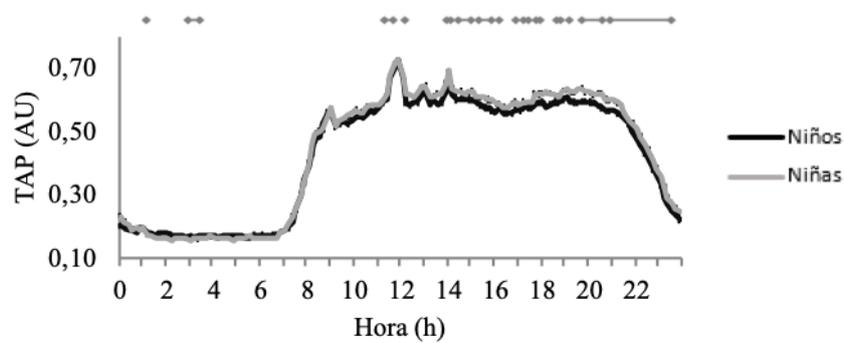
6B)



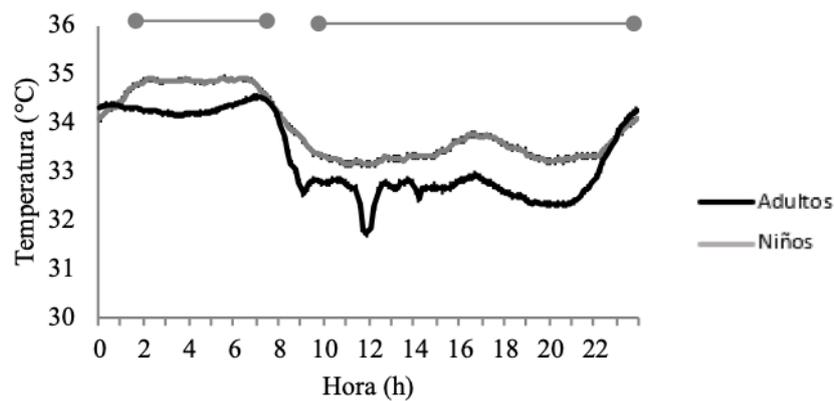
6C)



6D)



6E)



**Figura 6.** Patrones diarios de temperatura, actividad, posición y TAP en niños y niñas. Cada curva representa los patrones diarios registrados durante un período de siete días. Las figuras 6A, 6B, 6C y 6D representan las diferencias entre niños y niñas. La figura 6E muestra las diferencias entre niños y adultos. La línea superior representa las horas en que el patrón difiere significativamente ( $P < 0.05$ ).

Por otro lado, las niñas tuvieron un ratio de cortisol mañana/noche significativamente más alto que niños, lo que muestra una mayor amplitud del ritmo ( $P < 0.05$ ) (Tabla 4). Sin embargo, las chicas desayunaron más tarde y presentaron un cronotipo más nocturno que los niños, con el centro del sueño más retrasado (15 minutos) según lo determinado por el MCTQ ( $P = 0.003$ ). Además, el jet lag social fue mayor en niñas (0:54) que en niños (0:44) (hh:mm) ( $P = 0.008$ ). El análisis discriminante mostró que el 77% de los niños estudiados se clasificó correctamente en su grupo de sexo cuando se utilizaron las siguientes medidas: amplitud del TAP, dos variables derivadas de la actividad (media y variabilidad intradiaria) y el ratio del cortisol mañana/noche.

*Los niños mostraron un patrón de temperatura diferente y una mejor función circadiana que los adultos*

En los niños estudiados, la curva de temperatura periférica exhibió un patrón bifásico en el sueño que no estaba presente en adultos (**Figura 6E**). Además, los niños mostraron valores significativamente más altos que los adultos para los siguientes parámetros del ritmo de temperatura: a) amplitud; b) porcentaje de ritmicidad; y c) CFI, lo que demuestra una mayor calidad del ritmo (**Tabla 5**). Se obtuvieron valores menores en niños para la fragmentación del ritmo que en adultos ( $P < 0.05$ ). Además, los niños presentaron un ritmo adelantado respecto a los adultos, con la acrofase de ~ 1 h antes que los adultos (Tabla 5).

**Tabla 5.** Diferencias significativas entre los niños en edad escolar y la población adulta en las variables relacionadas con la temperatura circadiana.

	<b>Adultos</b> N = 177	<b>DE</b>	<b>Niños</b> N = 248	<b>DE</b>	<b>P-value</b>
<b>VARIABLES DE TEMPERATURA CIRCADIANA</b>					
Mesor (°C)	33.70	0.71	33.25	0.94	0.001
Amplitud (°C)	0.93	0.50	1.09	0.55	0.002
Acrofase (hh:mm)	4:54	4:51	3:48	2:49	0.004
PR	19.28	12.58	23.30	15.43	0.004
IV	0.20	0.09	0.10	0.04	0.001
CFI	0.45	0.06	0.47	0.06	0.001

Todos los índices fueron expresados como media  $\pm$  DE (DE: desviación estándar). PR: Porcentaje de ritmicidad; IV: Variabilidad intradiaria; and CFI: Índice de funcionalidad circadiano.

## 2. Resultados específicos para el objetivo 2

Hemos utilizado la saliva como herramienta no invasiva en niños de edad escolar, para la determinación de biomarcadores inflamatorios y de riesgo cardiovascular. Esta determinación es capaz de detectar cambios metabólicos asociados con el índice de masa corporal (IMC), las características dietéticas (ingesta y composición) y la actividad física. Estos resultados se han obtenido en una subpoblación de 129 niños de la población total que fue de 432 niños.

### Características generales de los niños con muestras de saliva

Las características de la población estudiada para la consecución de este objetivo se describen en la **Tabla 6**. No se detectaron diferencias significativas entre niñas y niños en términos de edad, altura, peso e IMC. Sin embargo, las ingestas de energía ( $P<0.05$ ) y de proteínas ( $P<0.01$ ) fueron significativamente mayores en niños que en niñas.

**Tabla 6.** Características generales de los niños estudiados para el objetivo 2.

	Total (n=129)			Niños (n=69)			Niñas (n=60)			P*
	Mediana	25%	75%	Mediana	25%	75%	Mediana	25%	75%	
Edad (a)	11	10	11	11	10	12	11	10	11	0.858
<b>Medidas antropométricas</b>										
IMC(kg/m <sup>2</sup> )	18.6	16.7	22.5	18.8	16.6	23.6	18.1	16.8	21.3	0.275
Altura (cm)	152	143	156	151.5	144.5	157	152	142	156	0.251
Peso (kg)	44	35.5	52.4	44.4	35.6	56.3	43.1	35.1	49.8	0.152
<b>Composición de la dieta</b>										
Energía (kcal/day)	1933.2	1605.4	2244.4	2053.2	1722	2311	1897.4	1545	2144.1	<b>0.027</b>
Proteínas (g/day)	69	58.8	82.6	73.6	60.7	87.1	63.1	55.8	74.3	<b>0.002</b>
Carbohidratos (g/day)	216.7	178.6	250.2	221.7	189.2	259.1	203.3	165.3	234.8	0.085
Lípidos (g/day)	92.5	45.9	168.6	93.6	72.5	114.7	86.7	71.8	101.6	0.234
<b>Actividad/reposo</b>										
Actividad media (°/min)	45.6	41.2	48.2	44.3	39.6	47.6	46.5	42.6	48.7	0.077

\*Prueba Mann-Whitney U entre niños y niñas. Los datos en negrita resaltan la significación estadística

### Saliva vs. suero

En la **Tabla 7** se representan los datos descriptivos de los diferentes biomarcadores medidos en suero y saliva. Los niños mostraron mayores concentraciones de glucosa sérica y de TNF- $\alpha$  en comparación con las niñas ( $P<0.05$  y  $P<0.001$ , respectivamente). La prueba de correlación de Spearman reveló una correlación positiva entre PCR sérica y salival (**Tabla 8**). Cuando se analizaron las correlaciones para cada sexo por separado, se detectaron asociaciones positivas entre suero y saliva de PCR tanto en niños como en niñas, mientras que la insulina se correlacionó positiva y significativamente entre suero y saliva solo en niñas (Tabla 8).

### Saliva vs. IMC

Se observó una asociación positiva y significativa entre el IMC y la PCR salival ( $P<0.001$ ) y la insulina ( $P=0.010$ ) (**Tabla 9**). En la población total, el IMC se correlacionó positivamente con la PCR y la insulina. Cuando se tuvo en cuenta el sexo, el IMC se asoció con la PCR en ambos sexos y con la insulina solo en las niñas. Los niños con sobrepeso/obesidad tuvieron 2.6, 2.8 y 2.6 veces mayores concentraciones de insulina, PCR e IL1 $\beta$  en saliva respectivamente, que los niños con peso normal (**Tabla 10**).

**Tabla 7.** Datos descriptivos de los biomarcadores en suero y saliva en todos los niños y por separado en niños y niñas.

Biofluido	Análito	Total (n=129)			Niños (n=69)			Niñas (n=60)			P
		Mediana	25%	75%	Mediana	25%	75%	Mediana	25%	75%	
Suero	Glucosa (mg/dL)	83	78	90	84	80	91	79	76	87.5	<b>0.027</b>
	Insulina (pg/mL)	352.19	246.11	529.95	337.02	246.11	485.30	358.88	241.55	557.69	0.367
	Triglicéridos (mg/dL)	69	59	94	72	55	94	68	59.3	97.5	0.980
	Leptina (pg/mL)	6453	2536.8	16471	6761	2300	17498	6058	3007.5	16201	0.820
	PCR (ng/mL)	1.0	0.0	4.0	2.0	0.0	6.0	1.0	0.0	3.0	0.110
	IL1β (pg/mL)	0.65	0.53	0.73	0.59	0.53	0.73	0.66	0.53	0.77	0.862
	IL6 (pg/mL)	2.02	1.26	4.22	2.22	1.63	5.43	1.82	1.08	3.85	0.204
	IL8 (pg/mL)	5.29	3.16	10.18	5.71	3.12	11.25	5.16	3.20	9.70	0.500
	TNFα (pg/mL)	4.13	3.18	5.38	4.79	3.97	5.81	3.66	2.69	4.28	<b>&lt;0.001</b>
	MCPI (pg/mL)	264.65	197.84	338.47	321.90	208.52	352.24	239.91	192.68	290.12	0.067
Saliva	HGF (pg/mL)	681.5	368	1032	725.7	543.5	1231	536.7	328.7	802.5	0.081
	NGF (pg/mL)	2.19	1.77	3.56	2.33	1.77	3.24	2.04	1.77	3.73	0.800
	HOMA-IR	73.92	50.57	110.59	75.48	50.48	103.37	73.55	49.42	118.08	0.585
	Glucosa (mg/dL)	8.50	2.90	27.45	6.90	2.28	17.50	10.75	2.93	37.65	0.270
	Insulina (pg/mL)	19.41	12.06	60.94	19.41	12.06	43.90	27.30	12.06	67.35	0.258
	Triglicéridos (mg/dL)	1.32	0.68	3.50	1.70	0.73	4.22	1.24	0.68	2.81	0.246
	Leptina (pg/mL)	20.13	19.00	20.13	20.13	19.00	20.13	20.13	19.00	20.13	0.416
	PCR (ng/mL)	2.25	0.46	6.91	2.40	0.41	7.43	2.21	0.51	5.63	0.634
	IL1β (pg/mL)	10.35	3.76	34.13	9.79	3.50	27.53	11.39	4.07	40.14	0.577
	IL6 (pg/mL)	0.88	0.88	1.39	1.13	0.88	1.94	0.88	0.88	1.13	0.109
IL8 (pg/mL)	40.07	17.70	68.41	40.99	16.49	65.06	39.40	17.70	78.89	0.875	
TNFα (pg/mL)	0.66	0.43	1.52	1.02	0.43	2.17	0.54	0.43	1.12	0.117	
MCPI (pg/mL)	44.64	21.17	91.34	39.87	19.01	75.54	49.78	24.05	110.02	0.139	
NGF (pg/mL)	0.49	0.49	0.63	0.49	0.49	0.63	0.49	0.49	0.63	0.651	
HOMA-IR	0.47	0.13	1.84	0.39	0.11	1.25	0.86	0.15	4.03	0.132	

\*Prueba Mann-Whitney U entre niños y niñas. Los datos en negrita resaltan la significación estadística.

**Tabla 8.** Prueba de correlación de Spearman entre biomarcadores séricos y salivales en todos los niños incluidos, y niños y niñas por separado.

Variable	Total (n=129)		Niños (n=69)		Niñas (n=60)	
	r	P	r	P	r	P
Glucosa (mg/dL)	0.175	0.160	0.081	0.651	0.314	0.080
Insulina (pg/mL)	0.221	0.072	-0.045	0.798	<b>0.442</b>	<b>0.011</b>
Triglicéridos (mg/dL)	-0.225	0.069	-0.210	0.233	-0.225	0.215
Leptina (pg/mL)	0.119	0.335	0.053	0.764	0.168	0.351
PCR (ng/mL)	<b>0.770</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.805</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.775</b>	<b>&lt;0.001</b>
IL1 $\beta$ (pg/mL)	0.015	0.902	0.107	0.547	-0.091	0.615
IL6 (pg/mL)	0.051	0.682	-0.014	0.934	0.027	0.882
IL8 (pg/mL)	0.112	0.374	0.285	0.107	-0.007	0.968
TNF $\alpha$ (pg/mL)	-0.007	0.954	-0.052	0.772	-0.268	0.131
MCP1 (pg/mL)	0.120	0.328	0.203	0.242	0.215	0.229
NGF (pg/mL)	0.000	0.999	-0.276	0.109	0.310	0.080
HOMA-IR	0.028	0.823	-0.164	0.346	0.192	0.291

Los datos en negrita resaltan la significación estadística.

**Tabla 9.** Prueba de correlación de Spearman entre el IMC y los biomarcadores salivales en todos los niños, y en niños y niñas por separado.

Biomarcadores salivales	Total (n=129)		Niños (n=69)		Niñas (n=60)	
	r	P	R	P	r	P
Glucosa (mg/dL)	0.078	0.381	0.090	0.460	0.101	0.443
Insulina (pg/mL)	<b>0.225</b>	<b>0.010</b>	0.160	0.185	<b>0.346</b>	<b>0.007</b>
Triglicéridos (mg/dL)	-0.157	0.209	-0.153	0.387	-0.171	0.348
Leptina (pg/mL)	0.109	0.378	0.032	0.854	0.232	0.194
PCR (ng/mL)	<b>0.415</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.513</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.265</b>	<b>0.039</b>
IL1 $\beta$ (pg/mL)	0.178	0.149	0.168	0.342	0.227	0.204
IL6 (pg/mL)	0.068	0.445	0.015	0.902	0.105	0.423
IL8 (pg/mL)	0.026	0.837	-0.018	0.921	0.109	0.552
TNF $\alpha$ (pg/mL)	0.005	0.970	-0.039	0.826	0.097	0.592
MCP1 (pg/mL)	0.017	0.890	0.048	0.783	0.021	0.907
NGF (pg/mL)	-0.007	0.939	-0.126	0.298	0.133	0.308
HOMA-IR	0.140	0.183	0.013	0.934	0.311	0.035

Los datos en negrita resaltan la significación estadística.

### Saliva vs. composición de la dieta

Se obtuvieron asociaciones significativas entre glucosa salival, insulina, PCR, IL, TNF $\alpha$ , NGF y HOMA-IR y la composición dietética (**Tabla 11**). En niños, todos los biomarcadores salivales evaluados (con excepción de triglicéridos y HOMA-IR), mostraron asociaciones significativas con al menos una variable de la composición

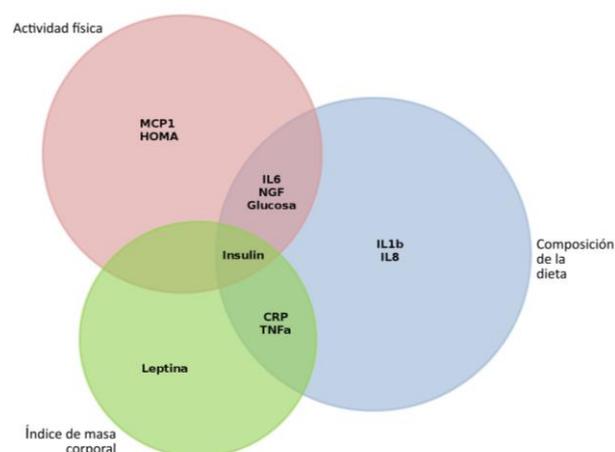
dietética, mientras que, en niñas, los triglicéridos salivales y los siguientes marcadores de inflamación IL6, IL8, MCP1 y NGF no mostraron relación con ninguna de las variables de la dieta evaluadas. Cuando los datos se ajustaron por el IMC, la significación se mantuvo para la insulina salival, IL1 $\beta$ , IL6 y para el TNF $\alpha$  aunque se detectaron diferencias entre sexos.

### Saliva vs. actividad física

La actividad física máxima se correlacionó de manera significativa e inversa con la glucosa, insulina, MCP1 y HOMA-IR para la población total, y para los niños (**Tabla 12**). La actividad física media se correlacionó de forma inversa con la glucosa, insulina, IL-6, MCP1 y NGF en la total población y en niños. Mientras que, en las niñas, la actividad física media se correlacionó inversamente con la insulina. Cuando los datos fueron ajustados por el IMC, las significaciones con la actividad física se mantuvieron para MCP1 y NGF, solo en niños.

En la **Figura 7** se representa en un diagrama de Venn aquellos biomarcadores salivales que presentaron asociaciones significativas con el IMC, composición de la dieta y con la actividad física de manera independiente, o cuyas asociaciones se compartieron entre dos o entre los tres de los componentes estudiados a la vez. De todos los biomarcadores salivales estudiados, la insulina fue el único biomarcador que se relacionó con los tres componentes a la vez: positivamente con IMC y negativamente con la composición de la dieta y la actividad física. La PCR y la IL1 $\beta$  se relacionaron ambas positivamente con el IMC y la composición de la dieta. La composición de la dieta compartía con la actividad física la asociación con la IL6 (de manera positiva con energía, grasas, carbohidratos e ingesta de ácidos grasos saturados y negativa con la ingesta de colesterol y actividad física media en niños) y una correlación negativa con el NGF y la glucosa.

**Figura 7.** Diagrama de Venn que visualiza la superposición entre biomarcadores relacionados con el índice de masa corporal, la composición de la dieta y la actividad física. Las áreas de los círculos son proporcionales a una serie de biomarcadores salivales relacionados con el IMC, composición de la dieta y actividad física.



**Tabla 10.** Biomarcadores salivales en niños de peso normal y con sobrepeso/obesidad.

Variable	Total (n=129)																				
	Niños (n=69)						Niñas (n=60)														
	Normopeso (n=89)		Sobrepeso/Obesidad (n=40)		Normopeso (n=47)		Sobrepeso/Obesidad (n=22)		Normopeso (n=42)		Sobrepeso/Obesidad (n=18)										
Median	25%	75%	Median	25%	75%	Median	25%	75%	Median	25%	75%	P									
Glucosa (mg/dL)	2.90	0.04	14.35	5.35	0.93	14.13	0.281	1.90	0.04	11.60	5.10	1.13	10.00	0.145	5.45	0.39	15.80	5.75	0.61	28.35	0.776
Insulina (pg/mL)	6.41	3.80	19.41	16.53	5.94	61.72	<b>0.003</b>	5.65	3.80	19.41	12.06	6.03	26.20	<b>0.014</b>	12.06	3.80	19.63	27.30	5.65	86.51	<b>0.045</b>
Triglicéridos (mg/dL)	1.81	0.68	4.80	0.98	0.68	2.33	0.117	2.79	0.86	4.84	1.09	0.72	3.49	0.260	1.65	0.68	4.08	0.76	0.68	1.86	0.230
Leptina (pg/mL)	19.56	19.00	20.13	20.13	19.00	20.13	0.266	20.13	19.00	20.13	19.00	19.00	20.13	0.911	19.00	19.00	20.13	20.13	19.00	20.13	0.107
PCR (ng/mL)	2.04	0.51	7.01	5.79	2.37	11.92	<b>&lt;0.001</b>	2.64	0.51	7.96	6.41	3.13	14.73	<b>0.005</b>	1.80	0.54	4.41	4.42	2.30	9.87	<b>0.017</b>
IL1β (pg/mL)	6.52	2.33	22.54	17.14	8.32	35.75	<b>0.028</b>	4.39	2.73	32.67	13.46	7.08	30.45	0.163	7.98	2.00	21.26	20.13	9.25	96.91	0.071
IL-6 (pg/mL)	0.88	0.65	1.39	0.88	0.70	1.74	0.151	1.04	0.63	1.45	1.13	0.88	2.03	0.240	0.88	0.65	1.27	0.88	0.65	1.39	0.447
IL-8 (pg/mL)	38.99	12.34	64.00	46.05	20.69	74.31	0.166	40.53	10.21	64.05	41.29	20.46	69.73	0.589	28.97	13.03	60.32	52.79	20.15	103.70	0.162
TNFα (pg/mL)	0.54	0.43	1.33	0.99	0.43	1.61	0.095	0.66	0.46	1.89	1.02	0.41	2.32	0.523	0.49	0.40	0.56	0.78	0.43	1.39	0.068
MCPI (pg/mL)	46.42	23.20	103.79	41.29	19.12	83.77	0.454	42.77	19.98	72.84	39.14	17.90	79.52	0.741	69.07	31.77	110.90	44.13	21.04	111.19	0.504
NGF (pg/mL)	0.49	0.33	0.52	0.49	0.33	0.63	0.179	0.49	0.33	0.52	0.49	0.33	0.63	0.683	0.49	0.33	0.52	0.63	0.49	0.63	<b>0.018</b>
HOMA-IR	0.23	0.08	1.23	0.45	0.11	1.64	0.276	0.20	0.09	1.21	0.35	0.06	0.70	0.842	0.34	0.08	1.65	1.24	0.20	7.65	0.053

\* Prueba U de Mann-Whitney. Los datos en negrita resaltan la significación estadística (bilateral)

**Tabla 11.** Prueba de correlación de Spearman entre los biomarcadores salivales y la composición de la dieta en todos los niños (n = 129) y niños (n = 69) y niñas (n= 60) por separado.

Variables	Energía (kcal)		Lípidos		Proteínas		Colesterol		Carbohidratos		Ácidos grasos monoinsaturados		Ácidos grasos poliinsaturados		Ácidos grasos saturados		Fibra		
	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	
<b>Total</b>																			
Glucosa(mg/dL)	<b>-0.210</b>	<b>0.027</b>	<b>-0.280</b>	<b>0.003</b>	-0.186	0.051	<b>-0.365</b>	<b>0.000</b>	-0.040	0.679	<b>-0.320</b>	<b>0.001</b>	-0.152	0.114	<b>-0.319</b>	<b>0.001</b>	-0.011	0.909	
Insulina(pg/mL)	-0.097	0.308	-0.164	0.084	-0.120	0.206	<b>-0.405</b>	<b>0.000</b>	0.071	0.455	<b>-0.298</b>	<b>0.001</b>	<b>-0.202</b>	<b>0.033</b>	<b>-0.200</b>	<b>0.033</b>	0.042	0.657	
Triglicéridos (mg/dL)	0.078	0.552	-0.013	0.923	-0.003	0.981	-0.065	0.641	0.147	0.255	-0.072	0.579	-0.146	0.266	-0.055	0.669	0.169	0.190	
Leptina(pg/mL)	0.198	0.120	0.220	0.080	0.131	0.301	0.139	0.313	0.171	0.176	0.239	0.058	0.120	0.351	0.187	0.140	0.128	0.314	
PCR (ng/mL)	<b>0.205</b>	<b>0.032</b>	<b>0.221</b>	<b>0.020</b>	<b>0.277</b>	<b>0.003</b>	-0.044	0.662	0.120	0.209	<b>0.271</b>	<b>0.004</b>	0.119	0.218	<b>0.294</b>	<b>0.002</b>	0.154	0.106	
IL1β (pg/mL)	<b>0.326</b>	<b>0.010</b>	<b>0.372</b>	<b>0.003</b>	<b>0.306</b>	<b>0.015</b>	-0.188	0.174	0.199	0.118	<b>0.381</b>	<b>0.002</b>	0.147	0.257	<b>0.389</b>	<b>0.002</b>	0.238	0.060	
IL6 (pg/mL)	<b>0.230</b>	<b>0.015</b>	<b>0.199</b>	<b>0.035</b>	0.088	0.351	<b>-0.240</b>	<b>0.015</b>	<b>0.261</b>	<b>0.005</b>	0.090	0.341	-0.052	0.588	<b>0.194</b>	<b>0.039</b>	0.144	0.127	
IL8 (pg/mL)	0.173	0.187	<b>0.258</b>	<b>0.045</b>	0.241	0.061	-0.108	0.446	0.034	0.798	<b>0.305</b>	<b>0.017</b>	0.165	0.211	<b>0.287</b>	<b>0.025</b>	0.211	0.102	
TNFα (pg/mL)	<b>0.399</b>	<b>0.001</b>	<b>0.499</b>	<b>0.000</b>	<b>0.333</b>	<b>0.008</b>	0.084	0.548	<b>0.272</b>	<b>0.031</b>	<b>0.458</b>	<b>0.000</b>	-0.039	0.767	<b>0.374</b>	<b>0.003</b>	<b>0.273</b>	<b>0.030</b>	
MCPI (pg/mL)	0.053	0.681	0.071	0.576	0.204	0.106	-0.088	0.525	-0.024	0.850	0.112	0.378	0.184	0.152	0.126	0.323	0.151	0.233	
NGF (pg/mL)	-0.164	0.082	<b>-0.221</b>	<b>0.018</b>	-0.114	0.229	<b>-0.388</b>	<b>0.000</b>	-0.069	0.468	<b>-0.214</b>	<b>0.022</b>	<b>-0.186</b>	<b>0.049</b>	<b>-0.280</b>	<b>0.003</b>	0.103	0.274	
HOMA-IR	-0.012	0.913	-0.015	0.897	-0.019	0.868	<b>-0.237</b>	<b>0.043</b>	-0.016	0.889	-0.050	0.660	-0.041	0.716	0.010	0.927	0.002	0.988	
<b>Niños</b>																			
Glucosa(mg/dL)	<b>-0.267</b>	<b>0.036</b>	<b>-0.293</b>	<b>0.021</b>	-0.244	0.056	<b>-0.303</b>	<b>0.023</b>	-0.064	0.620	<b>-0.345</b>	<b>0.006</b>	-0.228	0.075	<b>-0.318</b>	<b>0.012</b>	-0.072	0.58	
Insulina(pg/mL)	-0.093	0.468	-0.120	0.350	-0.110	0.390	<b>-0.399</b>	<b>0.002</b>	0.143	0.262	<b>-0.308</b>	<b>0.014</b>	<b>-0.307</b>	<b>0.014</b>	-0.149	0.244	0.048	0.708	
Triglicéridos (mg/dL)	0.129	0.475	0.011	0.952	-0.042	0.817	-0.146	0.450	0.186	0.299	-0.055	0.762	-0.245	0.170	-0.003	0.986	0.265	0.136	
Leptina(pg/mL)	0.287	0.100	0.174	0.325	0.222	0.208	0.084	0.664	0.296	0.089	0.125	0.482	0.132	0.457	<b>0.373</b>	<b>0.030</b>	0.211	0.230	
PCR (ng/mL)	0.239	0.064	0.200	0.123	0.176	0.174	-0.143	0.292	0.225	0.081	<b>0.350</b>	<b>0.006</b>	<b>0.268</b>	<b>0.037</b>	<b>0.327</b>	<b>0.010</b>	0.187	0.148	
IL1β (pg/mL)	<b>0.412</b>	<b>0.017</b>	<b>0.566</b>	<b>0.001</b>	0.302	0.088	-0.049	0.805	0.163	0.364	<b>0.608</b>	<b>0.000</b>	0.295	0.095	<b>0.545</b>	<b>0.001</b>	0.314	0.075	

IL6 (pg/mL)	<b>0.285</b>	<b>0.024</b>	0.232	0.067	0.050	0.696	<b>-0.347</b>	<b>0.008</b>	<b>0.361</b>	<b>0.004</b>	0.137	0.283	-0.053	0.681	0.212	0.095	0.242	0.056	
IL8 (pg/mL)	0.295	0.102	<b>0.416</b>	<b>0.018</b>	0.316	0.078	0.083	0.681	0.087	0.635	<b>0.444</b>	<b>0.011</b>	0.326	0.069	<b>0.447</b>	<b>0.010</b>	0.272	0.132	
TNF $\alpha$ (pg/mL)	<b>0.388</b>	<b>0.026</b>	<b>0.573</b>	<b>0.000</b>	0.257	0.149	-0.049	0.806	0.221	0.216	<b>0.582</b>	<b>0.000</b>	-0.013	0.942	<b>0.393</b>	<b>0.024</b>	0.306	0.083	
MCPI (pg/mL)	0.062	0.729	0.107	0.546	0.211	0.230	-0.051	0.793	-0.022	0.900	0.194	0.271	<b>0.343</b>	<b>0.047</b>	0.184	0.298	0.285	0.103	
NGF (pg/mL)	-0.197	0.122	-0.205	0.107	-0.121	0.344	<b>-0.482</b>	<b>0.000</b>	-0.128	0.316	-0.182	0.154	<b>-0.280</b>	<b>0.026</b>	<b>-0.310</b>	<b>0.013</b>	0.018	0.888	
HOMA-IR	0.004	0.979	-0.071	0.651	-0.050	0.750	0.000	0.998	0.092	0.559	-0.119	0.448	-0.004	0.980	-0.042	0.789	-0.036	0.818	
<b>Niñas</b>																			
Glucosa(mg/dL)	-0.111	0.454	-0.254	0.079	-0.095	0.516	<b>-0.432</b>	<b>0.003</b>	0.013	0.932	-0.263	0.068	-0.023	0.878	-0.279	0.052	0.085	0.563	
Insulina(pg/mL)	-0.107	0.466	-0.238	0.096	-0.111	0.441	<b>-0.380</b>	<b>0.008</b>	-0.043	0.766	<b>-0.293</b>	<b>0.039</b>	-0.083	0.570	-0.265	0.063	0.060	0.679	
Triglicéridos (mg/dL)	-0.011	0.957	-0.125	0.517	0.014	0.942	-0.010	0.963	0.107	0.579	-0.153	0.427	0.034	0.868	-0.170	0.379	0.063	0.745	
Leptina(pg/mL)	0.171	0.376	0.276	0.140	0.142	0.454	0.273	0.177	0.072	0.705	<b>0.395</b>	<b>0.031</b>	0.076	0.702	0.040	0.832	0.040	0.832	
PCR (ng/mL)	0.083	0.569	0.219	0.127	<b>0.321</b>	<b>0.023</b>	0.054	0.722	-0.072	0.618	0.148	0.305	-0.093	0.530	0.221	0.124	0.082	0.570	
IL1 $\beta$ (pg/mL)	0.302	0.111	0.355	0.054	<b>0.408</b>	<b>0.025</b>	-0.218	0.285	0.279	0.135	0.307	0.099	-0.119	0.545	0.335	0.071	0.212	0.261	
IL6 (pg/mL)	0.098	0.505	0.065	0.656	0.061	0.673	-0.118	0.433	0.071	0.622	-0.034	0.813	-0.061	0.683	0.148	0.304	-0.020	0.890	
IL8 (pg/mL)	-0.025	0.899	0.104	0.590	0.182	0.345	-0.185	0.375	-0.102	0.600	0.179	0.353	-0.031	0.879	0.132	0.494	0.124	0.522	
TNF $\alpha$ (pg/mL)	<b>0.417</b>	<b>0.024</b>	<b>0.419</b>	<b>0.021</b>	<b>0.423</b>	<b>0.020</b>	0.245	0.228	0.304	0.102	0.319	0.086	-0.151	0.444	<b>0.382</b>	<b>0.037</b>	0.277	0.139	
MCPI (pg/mL)	0.027	0.890	0.091	0.632	0.303	0.104	-0.015	0.941	0.010	0.956	0.043	0.822	-0.109	0.580	0.131	0.491	0.065	0.734	
NGF (pg/mL)	-0.128	0.375	-0.269	0.057	-0.106	0.460	-0.257	0.081	0.001	0.993	-0.261	0.065	-0.041	0.782	-0.268	0.057	0.212	0.136	
HOMA-IR	-0.033	0.846	0.032	0.848	0.078	0.643	<b>-0.402</b>	<b>0.017</b>	-0.099	0.556	0.024	0.887	-0.129	0.445	0.062	0.711	0.036	0.828	

Los datos en negrita resaltan la significación estadística (bilateral).

**Tabla 12.** Prueba de correlación de Spearman entre biomarcadores salivales y actividad física en todos los niños, y niños y niñas por separado.

Biomarcadores salivales	Total (n=129)				Niños (n=69)				Niñas (n=60)			
	Máximo actividad física		Media actividad física		Máximo actividad física		Media actividad física		Máximo actividad física		Media actividad física	
	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P
Glucosa (mg/dL)	<b>-0.189</b>	<b>0.040</b>	<b>-0.194</b>	<b>0.035</b>	<b>-0.281</b>	<b>0.026</b>	<b>-0.291</b>	<b>0.021</b>	-0.124	0.367	-0.188	0.170
Insulina (pg/mL)	<b>-0.290</b>	<b>0.001</b>	<b>-0.308</b>	<b>0.001</b>	<b>-0.396</b>	<b>0.001</b>	<b>-0.338</b>	<b>0.006</b>	-0.192	0.161	<b>-0.352</b>	<b>0.008</b>
Triglicéridos (mg/dL)	0.083	0.537	0.033	0.803	-0.107	0.573	-0.069	0.716	0.298	0.124	0.154	0.433
Leptina (pg/mL)	-0.176	0.178	-0.139	0.288	-0.337	0.064	-0.332	0.068	-0.063	0.744	-0.057	0.767
PCR (ng/mL)	-0.058	0.531	0.003	0.972	-0.118	0.361	-0.125	0.333	0.053	0.696	0.226	0.094
IL1 $\beta$ (pg/mL)	-0.042	0.749	-0.083	0.526	-0.033	0.859	-0.129	0.490	-0.002	0.991	-0.009	0.962
IL6 (pg/mL)	-0.180	0.051	-0.223	0.015	-0.238	0.061	<b>-0.267</b>	<b>0.035</b>	-0.063	0.646	-0.118	0.391
IL8 (pg/mL)	0.239	0.073	0.178	0.185	0.132	0.496	0.187	0.332	0.332	0.085	0.180	0.360
TNF $\alpha$ (pg/mL)	0.089	0.502	0.047	0.726	0.188	0.320	0.267	0.153	0.123	0.525	-0.059	0.761
MCP1 (pg/mL)	<b>-0.255</b>	<b>0.049</b>	<b>-0.311</b>	<b>0.016</b>	<b>-0.496</b>	<b>0.005</b>	<b>-0.499</b>	<b>0.004</b>	-0.156	0.420	-0.298	0.116
NGF (pg/mL)	-0.119	0.196	<b>-0.208</b>	<b>0.023</b>	-0.151	0.234	<b>-0.257</b>	<b>0.041</b>	-0.102	0.456	-0.146	0.283
HOMA-IR	<b>-0.266</b>	<b>0.014</b>	-0.195	0.076	<b>-0.401</b>	<b>0.009</b>	-0.299	0.055	-0.187	0.236	-0.248	0.113

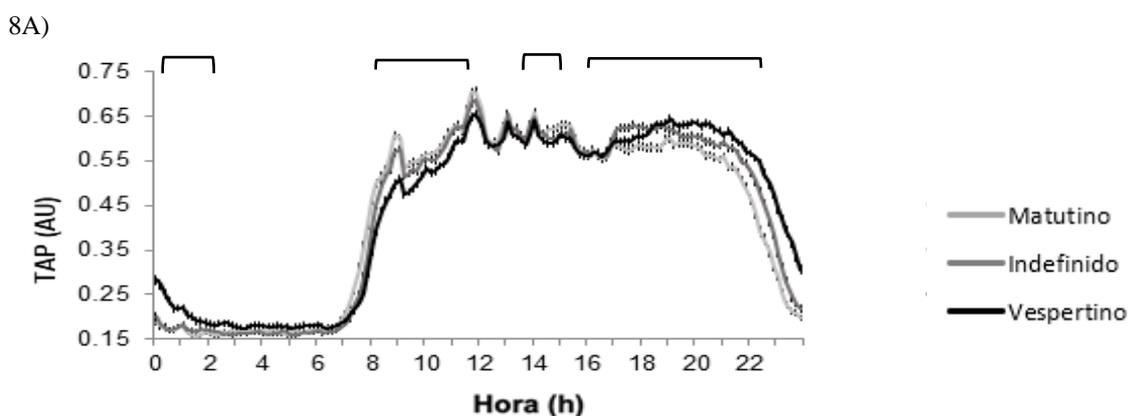
Los datos en negrita resaltan la significación estadística (bilateral)

### 3. Resultados específicos para el objetivo 3

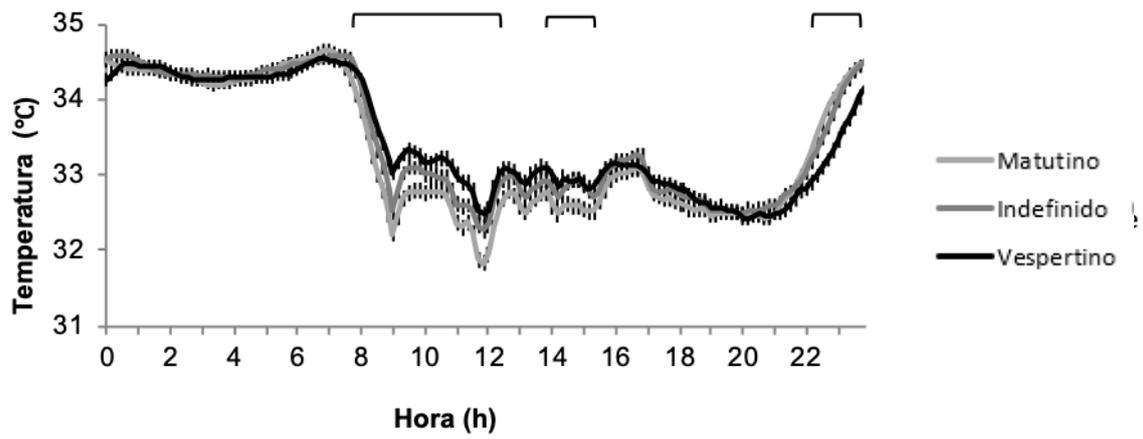
Evaluamos el cronotipo del niño por medio de técnicas objetivas como la variable integradora TAP (Temperatura, actividad y Posición) y estudiamos su posible relación con el jet lag social, la exposición a luz nocturna, y las alteraciones del sueño, así como su relación con las notas académicas y el riesgo metabólico.

#### *TAP como marcador de cronotipo*

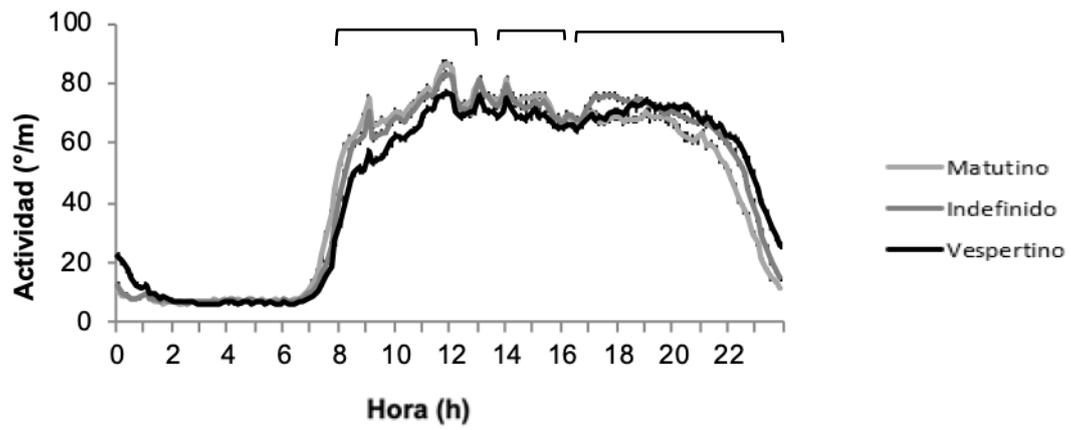
Nuestros resultados obtenidos con el TAP muestran que los ritmos de 24h registrados durante siete días (**Figura 8A**) diferían entre los tres cronotipos clasificados objetivamente por la acrofase del TAP (matutino, indefinido y vespertino). Los cronotipos vespertinos mostraron un patrón más retrasado con valores más bajos en la mañana y más altos en la noche ( $P<0.05$ ). Del mismo modo, el cronotipo subjetivo derivado del cuestionario de Munich y el registro dietético de 7 días, es decir, la hora central del sueño y el punto medio de la ingesta de alimentos, también se retrasaron significativamente en los cronotipos nocturnos en comparación con los cronotipos matutinos. Los cronotipos subjetivos y objetivos se correlacionaron significativamente entre sí ( $r = 0.225$ ;  $P<0.001$ ). Como se esperaba, los valores de melatonina en la saliva a la 01:00h fueron más bajos en los niños vespertinos que en los matutinos ( $P<0.05$ ) (**Tabla 13**). La melatonina disminuyó en 3.43 (CI 95%: 5.963 a 0.902) pg/ml por cada hora que de retraso en el cronotipo nocturno ( $P=0.008$ ). Estos datos sugieren que la acrofase del TAP clasificaba correctamente los tres cronotipos independientes.



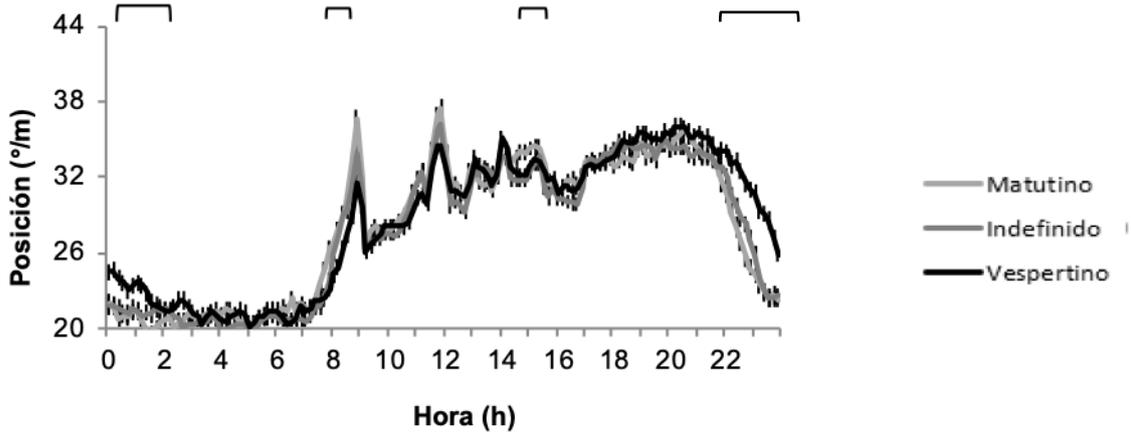
8B)



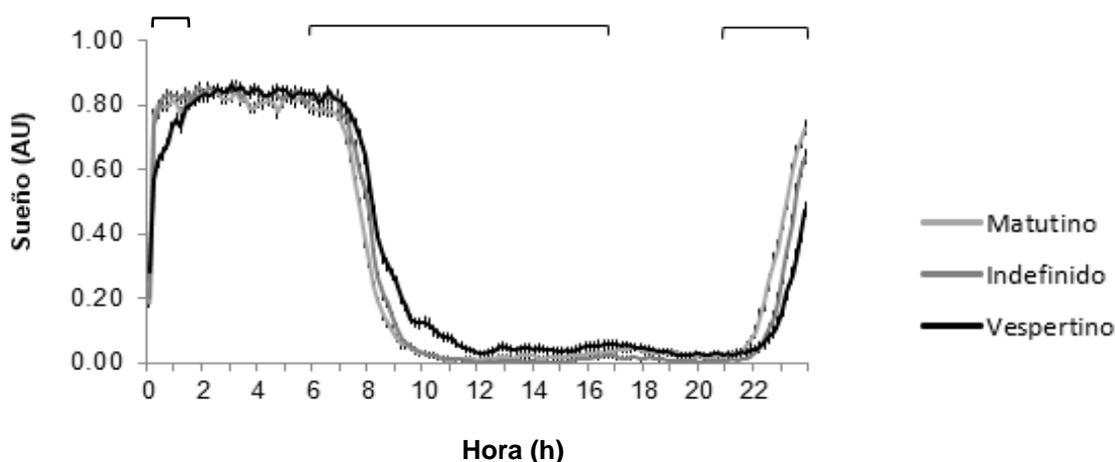
8C)



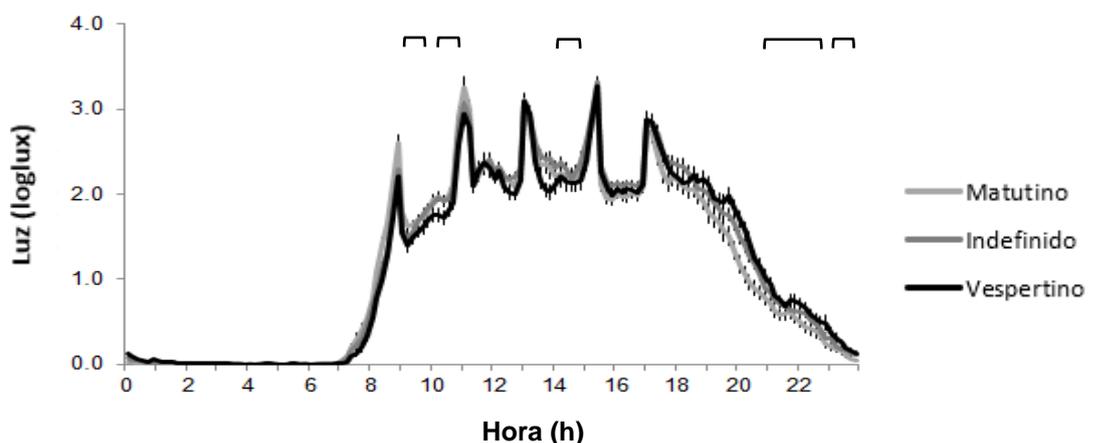
8D)



8E)



8F)



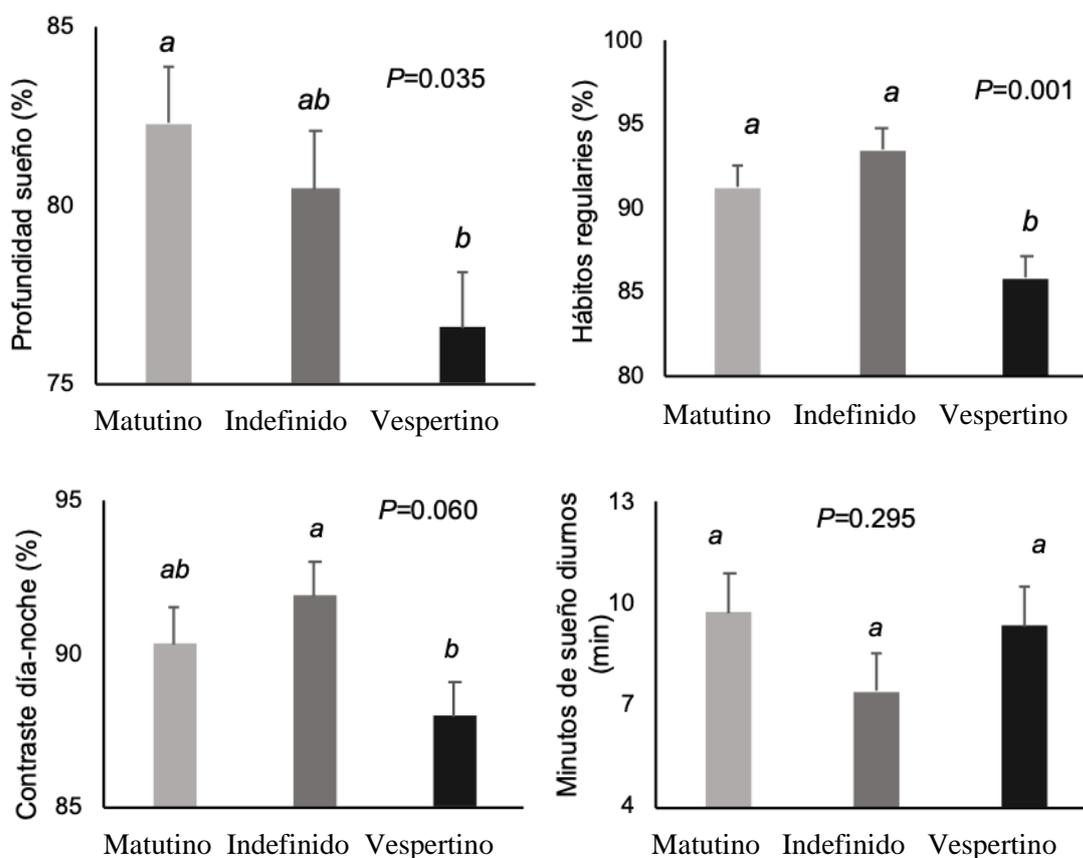
**Figura 8.** Patrones diarios de 8A) TAP, 8B) temperatura, 8C) actividad, 8D) posición, 8E) sueño y 8F) exposición a la luz en niños de cronotipo matutino, indefinido y vespertino, registrados durante un período de siete días. La línea superior representa las horas en las que el patrón difiere significativamente ( $P < 0.05$ ).

Los cronotipos nocturnos presentaron valores más elevados de temperatura corporal por la mañana, lo que indica una mayor somnolencia durante esas horas que los otros dos cronotipos, y valores más bajos en la noche, lo que corresponde a un aumento de vigilia (**Figura 8B**). Por el contrario, los niños nocturnos presentaron valores más bajos de actividad física y posición durante las primeras horas de la mañana y valores más elevados durante la noche ( $P < 0.05$ ) (**Figuras 8C y 8D**). En general, la actividad física durante el día fue menor en los vespertinos o nocturnos en comparación con los indefinidos y matutinos ( $P < 0.05$ ) (Figura 8C, Tabla 13).

### Características del sueño

La duración habitual del sueño en los niños estudiados fue de  $9.30 \pm 0.76$  h. El seis por ciento de los niños tenían una duración del sueño corta (inferior a 8h) y el 12% presentaban jet lag social, es decir más de 2h de diferencia entre los centros del sueño de entre semana y fin de semana. Los patrones diarios de sueño de todos los niños, en función de su cronotipo se representan en la **Figura 8E**. Los cronotipos nocturnos presentaron un retraso en el sueño con valores más altos de somnolencia durante el día, principalmente durante las primeras horas hasta las 16:00h de la tarde ( $P < 0.05$ ). Los niños vespertinos tuvieron una duración de sueño más corta y la proporción de niños que tuvo un sueño insuficiente fue 4 veces mayor entre los cronotipos vespertinos que entre los matutinos (Tabla 13).

En general los niños vespertinos tuvieron peor sueño que los matutinos con un índice de funcionalidad circadiana del sueño ( $P = 0.007$ ), una amplitud relativa ( $P = 0.007$ ) y una estabilidad interdiaria ( $P = 0.006$ ) menor. La profundidad del sueño y el contraste día-noche también fueron menores en los niños vespertinos (**Figura 9**).



**Figura 9.** Diferencias entre matutinos, indefinidos y vespertinos en las características del sueño y los hábitos regulares. Los diferentes superíndices representan diferencias significativas ( $P < 0.05$ )

**Tabla 13.** Diferencias entre el cronotipo matutino, indefinido y vespertino en las variables relacionadas con el sistema circadiano y el rendimiento académico.

	Cronotipo individual			P(1)	P(2)	r(3)	P
	Matutino (n=141)	Indefinido (n=141)	Vespertino (n=144)				
Niñas (%)	48.6	44.7	58.3	0.059	0.082*		
Obesidad (%)	10	7.9	13.9	0.152			
<b>Características</b>	<b>Media ± DE</b>	<b>Media ± DE</b>	<b>Media ± DE</b>				
Edad (años)	10 ± 1.18a	10 ± 1.21a	10 ± 1.34a	0.623	0.789	0.068	0.164
<b>Marcadores del cronotipo</b>							
<i>Evaluación objetiva</i>							
TAP acrofase (hh:mm)	14:26 ± 00:19a	15:08 ± 00:10b	15:54 ± 00:25c	<0.001	<0.001		
Melatonina 01:00h (pg/ml)	29.88 ± 21.26a	25.03 ± 13.97b	24.79 ± 17.14b	0.030	0.029	-0.124	0.013
<i>Evaluación subjetiva</i>							
MCTQ (hh:mm)	3:50 ± 0:37a	4:03 ± 0:36b	4:12 ± 0:44c	<0.001	<0.001	0.225	<0.001
<b>Punto medio de ingesta de alimentos (hh:mm)</b>	14:56 ± 0:16a	15:03 ± 0:20b	15:11 ± 0:22c	<0.001	<0.001	0.319	<0.001
<b>Actividad diurna (%)</b>	206.32 ± 28.87a	206.73 ± 25.69a	198.06 ± 28.17b	0.015	0.004	-0.151	0.002
<b>Hábitos regulares (%)</b>	91.49 ± 15.00a	93.38 ± 15.41a	85.85 ± 18.42b	<0.001	0.001	0.339	0.000
<b>Exposición a la luz</b>							
Luz acrofase (hh:mm)	13:55 ± 0:22a	14:20 ± 0:20b	14:43 ± 0:24c	<0.001	<0.001	0.677	<0.001
Luz durante el día (log lux)	2.20 ± 0.45ab	2.35 ± 0.21a	2.12 ± 0.10b	0.033	0.036	-0.163	0.072
Luz antes de ir a la cama (log lux)	0.29 ± 0.19a	0.35 ± 0.19ab	0.42 ± 0.19b	0.022	0.042	0.285	0.002
<b>Variables de sueño</b>							
<i>Duración</i>							
Duración sueño (hh:mm)	9:29 ± 0:38a	9:20 ± 0:35ab	9:11 ± 0:42b	0.001	0.004	-0.169	0.001
Durmientes cortos (n (%))	3(1)	4(1)	14(4)	0.003			
<i>Índice de Funcionalidad Circadiana (CFI)</i>							
Amplitud relativa (AR)	0.96 ± 0.11ab	0.99 ± 0.03a	0.94 ± 0.16b	0.007	0.004	-0.144	0.003
Estabilidad interdiaria (IS)	0.67 ± 0.14a	0.71 ± 0.12b	0.66 ± 0.15a	0.006	0.004	-0.061	0.212
<i>Características del sueño</i>							
Hora central del sueño (hh:mm)	3:20 ± 1:14a	3:30 ± 1:10a	4:13 ± 1:07b	<0.001	<0.001	0.356	<0.001
Profundidad del sueño (%)	82.30 ± 12.94a	80.33 ± 18.72ab	76.76 ± 23.25b	0.044	0.035	-0.128	0.008
Contraste día-noche (%)	90.41 ± 13.83ab	91.78 ± 12.35a	88.02 ± 15.77b	0.074	0.060	-0.150	0.002

**Jet lag social**

Jet lag social (hh:mm)	1:12 ± 0:40a	1:19 ± 0:38ab	1:29 ± 0:45b	0.003	0.010	0.167	0.001
Jet lag social (% de niños)	3.2	3.7	6.3	0.001			

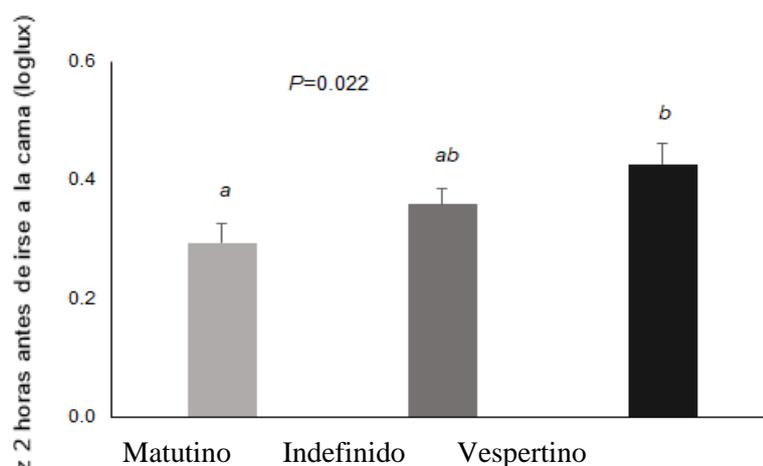
**Notas académicas**

Nota de educación artística	5.96 ± 1.48a	6.69 ± 1.20b	6.84 ± 1.08b	0.024	0.027	0.264	0.011
Nota media	7.71 ± 1.29a	7.63 ± 1.34a	7.70 ± 1.11a	0.244	0.388	0.172	0.097

(1) Diferencias entre cronotipos (ANOVA); (2) Diferencias entre cronotipos (ANOVA) ajustadas por sexo, edad, raza y curso académico. \* Diferencias entre cronotipos (ANOVA) ajustadas por edad, raza, curso académico; (3) Correlación entre la acrofase del TAP y las variables del sistema circadiano. MCTQ: Cuestionario de Munich Jet lag social = MSF - MSW > 2h.

Exposición a la luz

El patrón de luz se retrasó aproximadamente 1 hora en los niños vespertinos (acrofase). La intensidad total de la luz fue menor durante el día y mayor durante la noche en los niños más nocturnos que en los más diurnos (**Figura 8F**). La acrofase de la luz se retrasó 0.85 (CI 95%: -0.41 a 1.29) en los cronotipo vespertinos (TAP acrofase) ( $P=0.001$ ). La intensidad de la luz 2h antes de irse a la cama, es decir, en el momento en que la melatonina comienza a secretarse, fue un 75% mayor en los cronotipos nocturnos que en los matutinos (**Figura 10**).



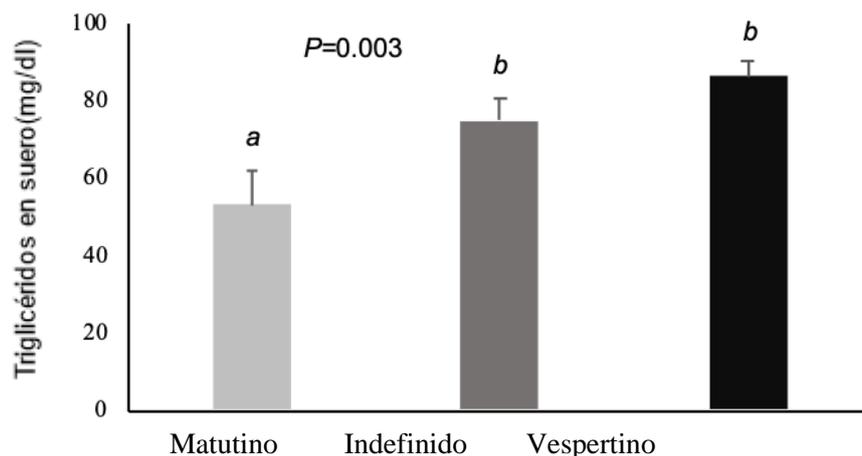
**Figura 10.** Diferencias en la luz 2 horas antes del momento de irse a la cama en matutinos, indefinidos y vespertinos. Los diferentes superíndices representan diferencias significativas ( $P<0.05$ ).

Jet lag social

Las diferencias entre los centros del sueño de los días de colegio y los del fin de semana fueron 17 minutos mayor en los vespertinos que en los matutinos (Tabla 13). Además, los cronotipos vespertinos experimentaron el jet lag social con el doble de frecuencia que los matutinos, 6% y 3%, respectivamente ( $P=0.001$ ).

Obesidad y riesgo metabólico

El cronotipo vespertino se asoció con un IMC mayor y con biomarcadores de riesgo metabólico más altos, como son los valores de glucosa, insulina, colesterol y triglicéridos (Tabla 14 y Figura 11). Un retraso de 1h en el cronotipo se relacionó con un aumento de 0.56 en el IMC ( $P=0.036$ ). La significación se mantuvo al ajustar por el IMC, lo que sugiere que el riesgo metabólico era independiente del grado de obesidad.



**Figura 11.** Diferencias en los valores de triglicéridos de niños con cronotipo matutino, indefinido y vespertino. Los diferentes superíndices representan diferencias significativas ( $P<0.05$ ).

Rendimiento académico

Los cronotipos nocturnos tuvieron calificaciones más altas en educación artística que los otros cronotipos ( $P=0.027$ ) (Tabla 13). No hubo diferencias significativas en otras calificaciones académicas.

**Tabla 14.** Correlaciones entre la acrofase del TAP y los parámetros metabólicos.

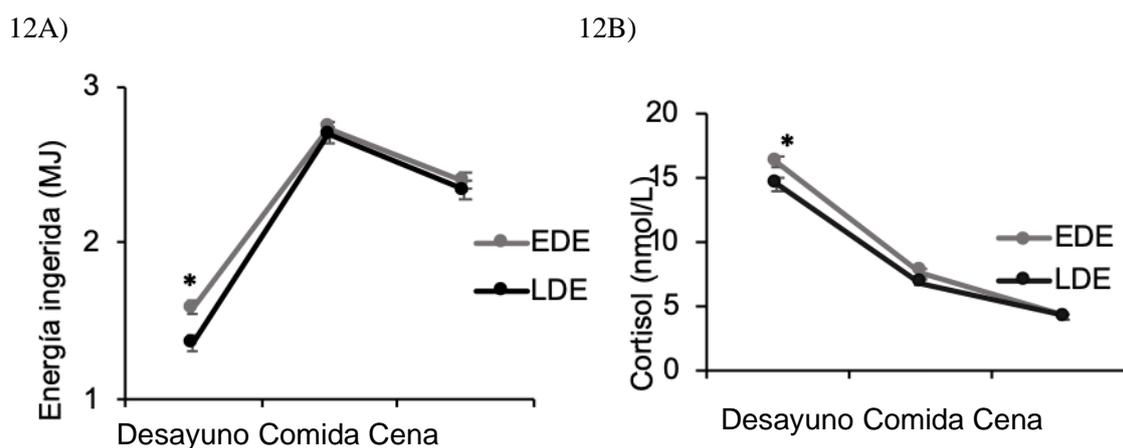
	n	r	P-value	P(1)-value	$\beta$	SEM	P-value
Colesterol suero (mg/dl)	73	0.311	0.007	0.008	0.043	0.016	0.007
Triglicéridos suero (mg/dl)	73	0.313	0.008	0.001	0.074	0.027	0.008
Insulina saliva ( $\mu$ UI/mL)	125	0.242	0.007	0.001	0.195	0.071	0.007
Glucosa saliva (mg/dl)	126	0.250	0.005	0.002	0.472	0.166	0.005
IMC ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	424	0.099	0.041		0.578	0.282	0.041
Grasa corporal en niñas (%)*	174	0.168	0.027	0.238	1.748	0.784	0.027

(1) Ajustado por IMC. \* Los niños no mostraron diferencias significativas. Los biomarcadores en saliva y suero se transformaron en logaritmos.

#### 4. Resultados específicos para el objetivo 4

Averiguamos si la hora de la cena influía en la obesidad y en la salud cardiometabólica del niño en edad escolar. Estos resultados se han obtenido en una subpoblación de 397 niños de la población total que fue de 432 niños. Los niños incluidos en este objetivo son aquellos que completaron el registro dietético de 7 días. Las características generales de los participantes, los horarios de la ingesta de alimentos y la distribución de la ingesta energética entre las comidas se resumen en la **Tabla 15**. y la ingesta energética de la cena constituyó el 28% de la energía total del día en el conjunto de la población. Los niños se clasificaron en LDE (cenadores tardíos) y EDE (cenadores tempranos) Los niños se clasificaron en cenadores tardíos y en tempranos según la mediana (21:07h).

No se encontraron diferencias significativas en la distribución de la ingesta de energía en las comidas principales entre LDE y EDE, a excepción de la energía ingerida durante el desayuno que fue significativamente menor en los LDE que en los EDE ( $P=0.002$ ) (**Figura 12A**). Los LDE también tuvieron valores más bajos de cortisol en la mañana ( $P=0.016$ ) (**Figura 12B**) y una disminución significativa en el ratio de cortisol mañana-noche( $P=0.037$ ).



**Figura 12.** Distribución de la ingesta de energía entre las comidas (12A) y el patrón diario de cortisol [antes del desayuno (09:00 hh:mm), antes de la comida (14:00 hh:mm), después de la cena (23:00 hh:mm)] (12B) en cenadores tardíos (LDE) y cenadores tempranos (EDE).

**Tabla 15.** Características generales de los niños que completaron el registro dietético.

	<b>ONTIME-Jr</b>	
	Media	DE
<b>Características generales</b>		
N	397	
Niñas (%)	50	
Sobrepeso u obesidad (%)	32.90	
Obesidad (%)	11	
Edad (años)	10	1.2
Peso (kg)	41.42	12.24
Altura (m)	1.45	0.10
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	19.36	3.95
Grasa corporal (%)	21.19	7.53
Cintura (cm)	65.44	9.88
<b>Horario de ingesta de comidas</b>		
Desayuno (hh:mm)	08:33	0:27
Comida (hh:mm)	14:24	0:19
Cena (hh:mm)	21:07	0:31
Punto medio de ingesta (hh:mm)	15:03	0:22
Hora de irse a la cama (hh:mm)	22:49	0:39
Hora de levantarse (hh:mm)	08:13	0:29
<b>Consumo de comida</b>		
Desayuno (% de energía diaria)	17.25	6.41
Almuerzo (%de energía diaria)	10.57	4.23
Comida (%de energía diaria)	32.62	5.96
Merienda (%de energía diaria)	12.05	5.50
Cena (%de energía diaria)	27.72	6.36

**Tabla 16.** Diferencias en el IMC y la circunferencia de la cintura entre los cenadores tardíos (LDE) y los cenadores tempranos (EDE).

	<b>ONTIME-Jr</b>				<b>P <math>\diamond</math></b>
	<b>LDE</b>		<b>EDE</b>		
	Media	EEM	Media	EEM	
Edad (años)	10	1.2	10	1.2	0.159
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	19.55	0.26	18.68	0.26	<b>0.019</b>
Cintura (cm)	66.39	0.74	63.69	0.73	<b>0.011</b>
Sobrepeso/Obesidad (%)	60.3		39.7		<b>0.006</b>
Niñas (%)	52.5		47.5		0.158

$\diamond$  Ajustado por sexo, colegio, edad y curso académico.

Los niños que cenaron tarde (LDE) tuvieron un IMC y una circunferencia de cintura más elevados (**Tabla 16**) y en este grupo de cenadores tardíos hubo mayor proporción de niños con sobrepeso/obesidad (60%) que en el grupo de cenadores tempranos (EDE) (39%) ( $P<0.05$ ) [OR=2.1, (CI:1.33,3.31)]. Los cenadores más tardíos también tuvieron valores significativamente más altos de PCR e IL6 que los que cenaron más temprano, mientras que no se encontraron diferencias en otros marcadores inflamatorios y cardiometabólicos (**Tabla 17**).

**Tabla 17.** Diferencias en los marcadores inflamatorios de la saliva entre los cenadores tardíos (LDE) y los cenadores tempranos (EDE).

	TOTAL			LDE			EDE			P
	Mediana	5%	95%	Mediana	5%	95%	Mediana	5%	95%	
<b>Marcadores inflamatorios</b>										
Glucosa mg/dL	3.60	0.04	58.65	2.90	0.04	70.25	4.90	0.04	58.50	0.352
Insulina pg/mL	12.06	3.80	107.09	9.81	3.80	169.74	12.06	3.80	103.34	0.413
Triglicéridos mg/dL	1.32	0.68	24.02	1.19	0.68	43.09	1.70	0.68	24.71	0.691
Leptina pg/mL	20.13	19.00	22.00	20.13	19.00	22.85	19.00	19.00	22.47	0.861
PCR ng/mL	3.22	0.16	42.73	4.35	0.17	42.73	1.80	0.15	44.32	<b>0.009</b>
IL1 $\beta$ pg/mL	10.35	1.16	125.29	14.16	1.67	135.30	9.79	1.22	123.10	0.173
IL6 pg/mL	0.88	0.40	7.06	1.09	0.40	9.85	0.88	0.40	6.78	<b>0.036</b>
IL8 pg/mL	40.07	4.62	299.38	40.66	5.08	309.26	40.07	6.14	322.02	0.708
TNF $\alpha$ pg/mL	0.66	0.32	4.76	0.66	0.31	5.09	0.66	0.32	3.85	0.876
MCP1 pg/mL	44.64	12.12	222.09	44.64	15.38	331.14	41.29	8.37	216.51	0.802
NGF pg/mL	0.49	0.33	0.67	0.49	0.33	0.79	0.49	0.32	0.63	0.877
HOMA	0.38	0.02	9.90	0.40	0.02	17.73	0.18	0.03	9.15	0.448
Cortisol día/noche ratio (nmol/L)	0.98	0.47	1.38	0.98	0.46	1.36	1.00	0.52	1.44	<b>0.037*</b>

El contenido energético de la cena y la distribución de macronutrientes fue similar entre LDE y EDE. Sin embargo, la duración de la cena fue más corta entre los cenadores tardíos (**Tabla 18**). Además, los LDE presentaron un cronotipo más nocturno con un centro de sueño posterior y una duración de sueño más corta que los EDE.

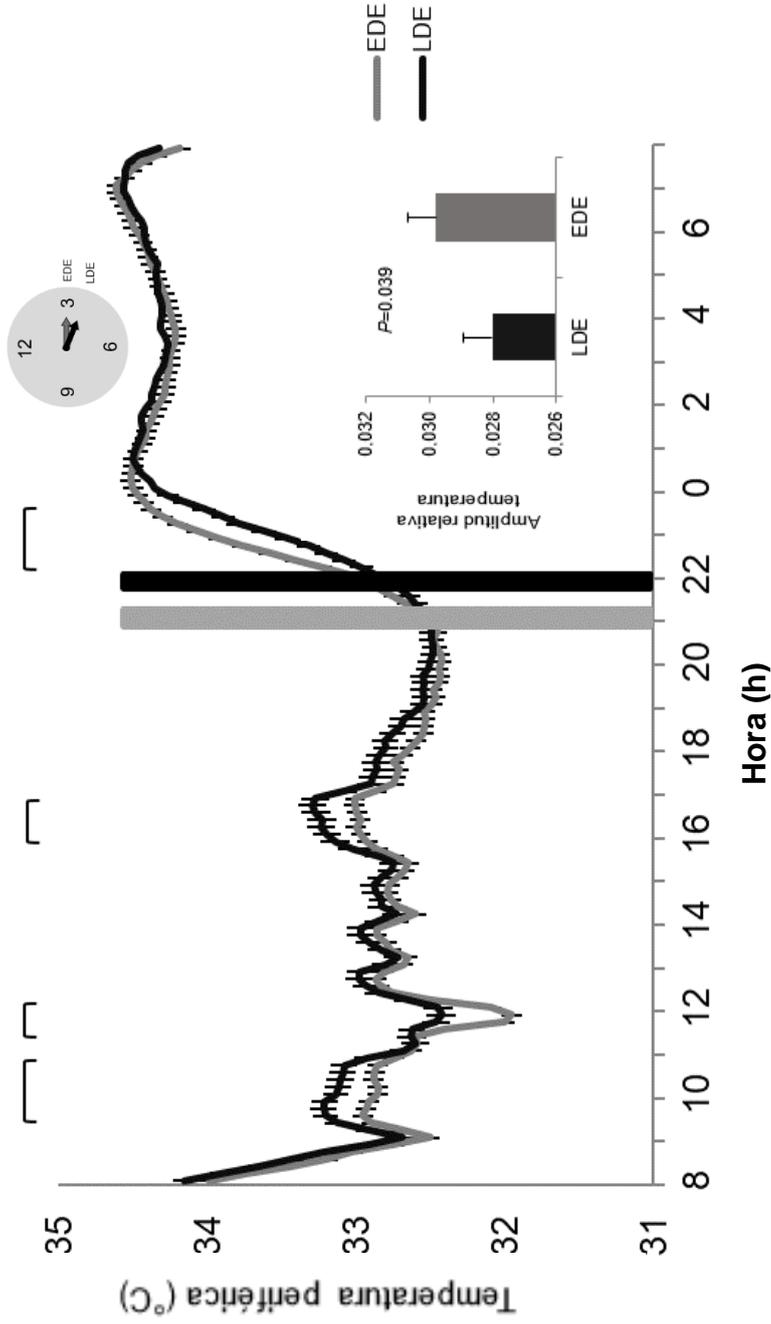
Los resultados de la temperatura periférica de la muñeca mostraron un retraso de la fase de  $\sim 30$  min, entre los LDE en comparación con EDE (Acrofase para LDE =  $03:42 \pm 00:05$ ; hh:mm y EDE =  $03:16 \pm 00:05$ ; hh:mm;  $P=0.002$ ) y una disminución significativa en la amplitud relativa del ritmo de temperatura (LDE =  $0.028 \pm 0.001$ ; (AU) y EDE =  $0.030 \pm 0.001$  (AU),  $P=0.039$ ) (**Figura 13**).

**Tabla 18.** Diferencias entre los cenadores tardíos (LDE) y los cenadores tempranos (EDE) en el cronotipo, duración del sueño y características de la cena.

	<b>ONTIME-Jr</b>				
	LDE n=197		EDE n=200		<i>P</i> ◇
	Media	EEM	Media	EEM	
Energía total consumida (MJ/day)	8.33	0.13	8.60	0.12	0.141
Punto medio de ingesta	15:17	00:12	14:52	00:12	< <b>0.001</b>
Duración de la cena (h)	0.47	0.01	0.50	0.01	<b>0.043</b>
Duración del sueño subjetivo (h)	9.18	0.04	9.45	0.04	< <b>0.001</b>
Cronotipo (MCTQ) (hh:mm)	4:09	0:02	3:55	0:02	<b>0.001</b>
Vespertinos (%)	42.1		28.1		<b>0.004</b>
Actividad media (°/min)	46.32	0.43	46.73	0.42	0.503

◇ Ajustado por sexo, escuelas, edad y curso académico

Además, los valores de temperatura periférica diferían entre LDE y EDE en la mañana (de 09:30 a 11:00 hh:mm y de 11:30 a 12:00 hh:mm) y en la tarde (16:00 a 17:30 hh:mm) (Figura 13). Después de la cena, en las horas postprandiales (3h), los LDE tuvieron un retraso de 20 min en el aumento de la temperatura ( $P=0.005$ ) y valores de temperatura más bajos (LDE=33.29±0.07°C; y EDE=33.57±0.07°C;  $P=0.005$ ) que los EDE (Figura 13).



**Figura 13.** Patrones diarios de temperatura periférica en los cenadores tardíos (LDE) y los cenadores tempranos (EDE). La línea superior representa las horas en las que el patrón difiere significativamente ( $P < 0.05$ ). La barra negra vertical representa la hora de la cena (y el ancho la duración) de LDE y la barra vertical gris la hora de la cena (y el ancho la duración) de EDE. Las diferentes amplitudes relativas de temperatura entre LDE y EDE se representan en el gráfico de barras debajo de la curva. El reloj representa las diferentes acrofases de temperatura de los dos grupos, la flecha negra corresponde a la acrofase de LDE y la flecha gris a la acrofase de EDE.

## 5. Resultados específicos para el objetivo 5

En este objetivo estudiamos la posible asociación entre las características del ritmo de actividad/reposo con el IMC y los marcadores inflamatorios relacionados con la obesidad. La muestra analizada en este caso incluyó a 202 niños y 209 niñas con edad media (DE) de 10 (1.25) años. Un tercio de los participantes tenían sobrepeso u obesidad. Si bien la mayoría de las características generales no difirieron significativamente entre las categorías de IMC, los participantes con sobrepeso/obesidad en comparación con aquellos con peso normal tuvieron medidas de actividad diaria más bajas ( $45.3 \pm 6.0$  vs.  $47.0 \pm 6.1$  %/m, respectivamente  $P=0.002$ ).

Los parámetros del ritmo de actividad/reposo en unidades de desviación estándar (DE) fueron estandarizados para aplicar análisis multivariante en cada caso (**Tablas 19 y 20**). Encontramos que la amplitud relativa (AR) y el CFI se asociaron inversamente con el IMC en el modelo de regresión ajustado por edad, sexo, colegio y curso, mientras que la fragmentación (IV) se asoció positivamente con el IMC ( $P=0.006$ ,  $P=0.008$  y  $P=0.04$ , respectivamente). Específicamente, por el aumento de 1 unidad de la DE en la AR, que indica un ritmo de actividad/reposo más robusto (menor actividad durante la noche y mayor actividad durante el día), hubo una disminución de  $-0.53$  kg/m<sup>2</sup> (IC 95%:  $-0.9$ ,  $-0.15$ ) en el IMC. Se observó una disminución similar en el IMC con un aumento de 1 DE en el CFI ( $-0.53$  [IC 95%  $-0.92$ ,  $-0.14$ ] kg/m<sup>2</sup>).

El aumento en 1 unidad de la DE en la fragmentación (IV) del ritmo de actividad (mayor frecuencia de las transiciones entre reposo y actividad), se asoció con un aumento de  $0.39$  kg/m<sup>2</sup> (IC 95%:  $0,01$ ,  $0,77$ ) en el IMC. Cuando se ajustó además por la duración del sueño y la actividad diaria, la significación se mantuvo. Solo la asociación de la fragmentación (IV) con IMC disminuyó después de ajustar por la duración del sueño.

Además, en una submuestra de 121 niños que proporcionaron muestras de saliva analizamos los marcadores inflamatorios, y los resultados se presentan en la **Tabla 20 y Suplementarias 1, 2, 3, 4, 5, y 6**. Encontramos que los marcadores inflamatorios se asociaron con múltiples parámetros de actividad física. Entre ellos, los valores de PCR

se asociaron inversamente con la AR del ritmo de actividad/reposo en los que el aumento de 1 unidad de la DE de la AR se relacionó con una disminución de -33.2% (IC 95%: -48.4%, -13.6%;  $P=0.002$ ) en los valores de PCR. La significación se mantuvo cuando se ajustó por la duración de sueño y actividad diaria.

**Tabla 19.** Asociaciones con el índice de masa corporal por el aumento de 1 unidad de desviación estándar en los parámetros de actividad/reposo.

	<b>Coefficiente beta (intervalo de confianza 95%); <math>P</math>-valor</b>		
	<b>Modelo 1</b>	<b>Modelo 2</b>	<b>Modelo 3</b>
<b>Mesor</b>	-0.35 (-0.75, 0.05) $P=0.087$	-0.54 (-0.96, -0.12) $P=0.01$	1.19 (-0.96, 3.34) $P=0.28$
<b>Acrofase</b>	0.17 (-0.2, 0.55) $P=0.36$	0.2 (-0.18, 0.57) $P=0.31$	0.21 (-0.17, 0.58) $P=0.28$
<b>Amplitud reactiva (AR)</b>	-0.53 (-0.9, -0.15) $P=0.006$	-0.41 (-0.82, 0) $P=0.049$	-0.52 (-0.9, -0.15) $P=0.006$
<b>Estabilidad interdiaria (IS)</b>	-0.27 (-0.65, 0.1) $P=0.155$	-0.23 (-0.62, 0.15) $P=0.23$	-0.13 (-0.55, 0.3) $P=0.55$
<b>Variabilidad intradiaria (IV)</b>	0.39 (0.01, 0.77) $P=0.04$	0.37 (-0.02, 0.75) $P=0.065$	0.42 (0.05, 0.8) $P=0.03$
<b>M10</b>	-0.18 (-0.55, 0.19) $P=0.34$	-0.04 (-0.41, 0.34) $P=0.84$	-0.14 (-0.51, 0.23) $P=0.46$
<b>L5</b>	0.16 (-0.2, 0.53) $P=0.38$	0.15 (-0.21, 0.51) $P=0.42$	0.16 (-0.21, 0.52) $P=0.40$
<b>CFI</b>	-0.53 (-0.92, -0.14) $P=0.008$	-0.44 (-0.85, -0.04) $P=0.03$	-0.45 (-0.86, -0.05) $P=0.03$

(Modelo 1) Ajustado por edad, sexo, colegio y curso. (Modelo 2) Modelo 1 + duración del sueño. (Modelo 3) Modelo 1 + actividad diaria.

Los valores de IL8 e IL1 $\beta$  se asociaron significativamente con la actividad media durante las 5 horas de menor actividad L5, un aumento de 1 unidad de DE en L5 se correlacionó con un aumento del 33.9% (IC 95%: 5.9%, 69.1%;  $P=0.02$ ) en IL8 y del 43.9% (IC 95%: 6.4 %, 94.7%,  $P = 0.02$ ) en IL1 $\beta$ . Es importante destacar que la asociación de L5 con la IL8 fue independiente de la duración del sueño, la actividad diaria y el IMC (en todos los casos  $P<0.05$ ). Mientras que la asociación de L5 y IL1 $\beta$  fue independiente de la actividad diaria y el IMC ( $P<0.05$ ), pero no para la duración del sueño ( $P=0.1$ ). El mesor del ritmo de actividad diaria se asoció inversamente con la IgA y MCP1, y el aumento de 1 unidad de DE en este mesor se asoció con una disminución -23.2% (IC 95%: -40.1%, -1.4%,  $P=0.04$ ) y -30.7% (IC 95%: -44.1%, -14.1 %,  $P=0.002$ ) en los valores de PCR.

$P=0.001$ ) en las concentraciones de IgA y MCP1, respectivamente. Además, la estabilidad interdiaria del ritmo (IS) y la fragmentación del ritmo (IV) también se asociaron con una disminución en las concentraciones en saliva de la MCP1 ( $-33.0\%$  [ $-50.0, -10.3$ ],  $P=0.01$  y  $-22.8\%$  ( $-37\%, -5.3\%$ ),  $P=0.01$ , respectivamente), independientemente de la duración del sueño e IMC.

**Tabla 20.** Cambios porcentuales de la concentración de marcadores inflamatorios por el aumento de 1 unidad de desviación estándar en los parámetros de actividad/reposo

	<b>IgA</b> n=121	<b>PCR</b> n=118	<b>IL8</b> n=57	<b>IL1β</b> n=60	<b>TNFα</b> n=59	<b>MCPI</b> n=60
<b>Mesor</b>	-23.2 (-40.1, -1.4) <b>P&lt;0.05</b> <sup>a</sup>	-3.5 (-31.4, 35.8) <b>P=0.84</b>	14 (-11.5, 46.8) <b>P=0.3</b>	-6.6 (-33.8, 31.7) <b>P=0.69</b>	6.7 (-14.7, 33.6) <b>P=0.56</b>	-30.7 (-44.1, -14.1) <b>P=0.001</b> <sup>a,c</sup>
<b>Acrofase</b>	7.9 (-15.8, 38.1) <b>P=0.55</b>	-10 (-35.2, 25) <b>P=0.53</b>	-4.3 (-26.9, 25.3) <b>P=0.74</b>	-5 (-32.7, 34.1) <b>P=0.77</b>	-4 (-24, 21.3) <b>P=0.73</b>	-14.5 (-32.3, 7.9) <b>P=0.18</b>
<b>Amplitud relativa (AR)</b>	1.7 (-16.8, 24.4) <b>P=0.87</b>	-33.2 (-48.4, -13.6) <b>P&lt;0.05</b> <sup>a,b,d</sup>	5.7 (-13.1, 28.7) <b>P=0.57</b>	14.1 (-12.2, 48.2) <b>P=0.32</b>	-0.2 (-16.1, 18.8) <b>P=0.98</b>	1.6 (-15.3, 21.9) <b>P=0.86</b>
<b>Estabilidad interdiaria (IS)</b>	6.9 (-16.9, 37.5) <b>P=0.6</b>	1 (-28, 41.6) <b>P=0.96</b>	3.4 (-26.3, 45) <b>P=0.85</b>	-7.2 (-41, 46.1) <b>P=0.74</b>	-17 (-38.2, 11.5) <b>P=0.21</b>	-33.0 (-50.0, -10.3) <b>P&lt;0.01</b> <sup>a,c</sup>
<b>Variabilidad intradiaria (IV)</b>	-10 (-27.6, 11.9) <b>P=0.34</b>	16.2 (-15, 59) <b>P=0.34</b>	-9.5 (-28.1, 13.8) <b>P=0.39</b>	-5.5 (-30.9, 29.2) <b>P=0.72</b>	-7.9 (-24.8, 12.9) <b>P=0.42</b>	-22.8 (-37.0, -5.3) <b>P=0.04</b> <sup>a,c</sup>
<b>M10</b>	-1.2 (-20.4, 22.6) <b>P=0.91</b>	-15 (-36.2, 13.3) <b>P=0.26</b>	9.3 (-14.1, 39.1) <b>P=0.46</b>	-7.9 (-32.9, 26.3) <b>P=0.6</b>	0.6 (-18.8, 24.6) <b>P=0.95</b>	-5.7 (-24.2, 17.2) <b>P=0.59</b>
<b>L5</b>	8.9 (-12.9, 36) <b>P=0.45</b>	14.3 (-15.5, 54.6) <b>P=0.38</b>	33.9 (5.9, 69.1) <b>P=0.01</b> <sup>a,b,c,d</sup>	43.9 (6.4, 94.7) <b>P=0.02</b> <sup>b,d</sup>	13.3 (-8, 39.5) <b>P=0.23</b>	14.1 (-8, 41.6) <b>P=0.23</b>
<b>CFI</b>	8.3 (-14.3, 36.9) <b>P=0.5</b>	-23.6 (-44.2, 4.4) <b>P=0.09</b>	9.1 (-16.1, 42) <b>P=0.51</b>	8.4 (-23.7, 54.2) <b>P=0.65</b>	-4.8 (-24.6, 20.1) <b>P=0.67</b>	-6.4 (-26.5, 19.2) <b>P=0.59</b>

Los datos se expresan como media (IC 95%). La unidad es %.

(Modelo 1) el modelo predeterminado se ajusta por edad, sexo, curso y colegio (colegio para IgA y PCR solamente).

Si se encontró importancia en el modelo predeterminado, se hicieron ajustes adicionales de la siguiente manera:

a: (Modelo 2) Modelo 1 + duración de sueño. b: (Modelo 3) Modelo 1 + actividad diaria. c: (Modelo 4) Modelo 2 + IMC. d: (Modelo 5) Modelo 3 + IMC.

## 6. Resultados específicos para el objetivo 6

Hemos evaluado si el “score” circadiano desarrollado en el objetivo 1 era capaz de detectar enfermedades tales como la obesidad. Las características generales y los parámetros metabólicos para la consecución de este objetivo se resumen en la **Tabla 21**.

**Tabla 21.** Características de la población estudiada para el objetivo 6.

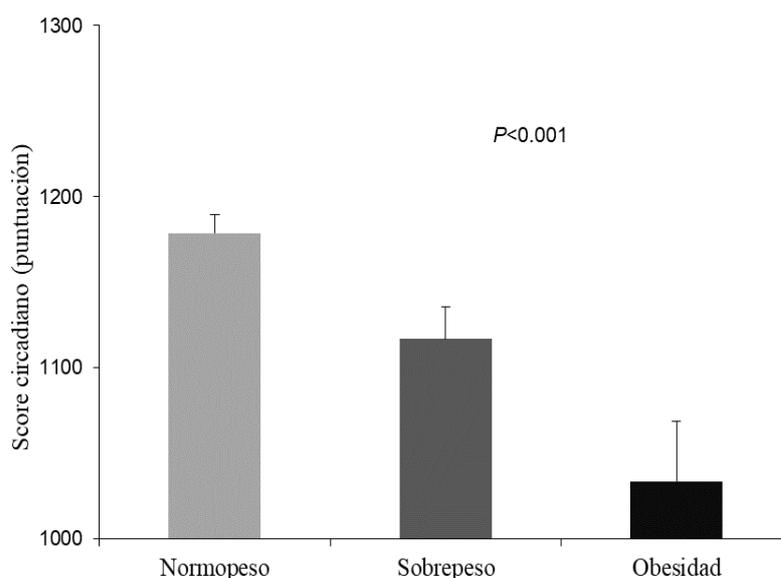
	Total n=432	No obesos n=290	Obesos n=142	P-value
Edad (años)	10.18 ± 1.25	10.08 ± 1.14	9.91 ± 1.46	0.248
Peso (kg)	41.42 ± 12.24	36.40 ± 8.04	51.64 ± 12.98	<b>0.001</b>
Altura (cm)	145 ± 10.37	144 ± 10.38	146 ± 10.21	<b>0.030</b>
IMC	19.36 ± 3.95	17.24 ± 1.96	23.69 ± 3.41	<b>0.001</b>
Grasa corporal (%)	21.19 ± 7.53	17.85 ± 5.12	29.33 ± 6.11	<b>0.001</b>
Cintura (cm)	65.44 ± 9.89	61.20 ± 6.57	75.40 ± 9.23	<b>&lt;0.001</b>
Glucosa (mg/dL)*	83.44 ± 9.12	84.70 ± 11.59	82.37 ± 6.22	0.280
Insulina (pg/mL)*	445.07 ± 293.48	279.10 ± 138.25	566.12 ± 274.91	<b>&lt;0.001</b>
Triglicéridos (mg/dL)*	80.50 ± 30.89	67.08 ± 19.90	92.25 ± 34.74	<b>&lt;0.001</b>
Colesterol (mg/dL)*	169.03 ± 33.75	173.72 ± 39.31	164.43 ± 27.95	0.243

Datos antropométricos y metabólicos (medias ± desviación estándar). (\*) n=79

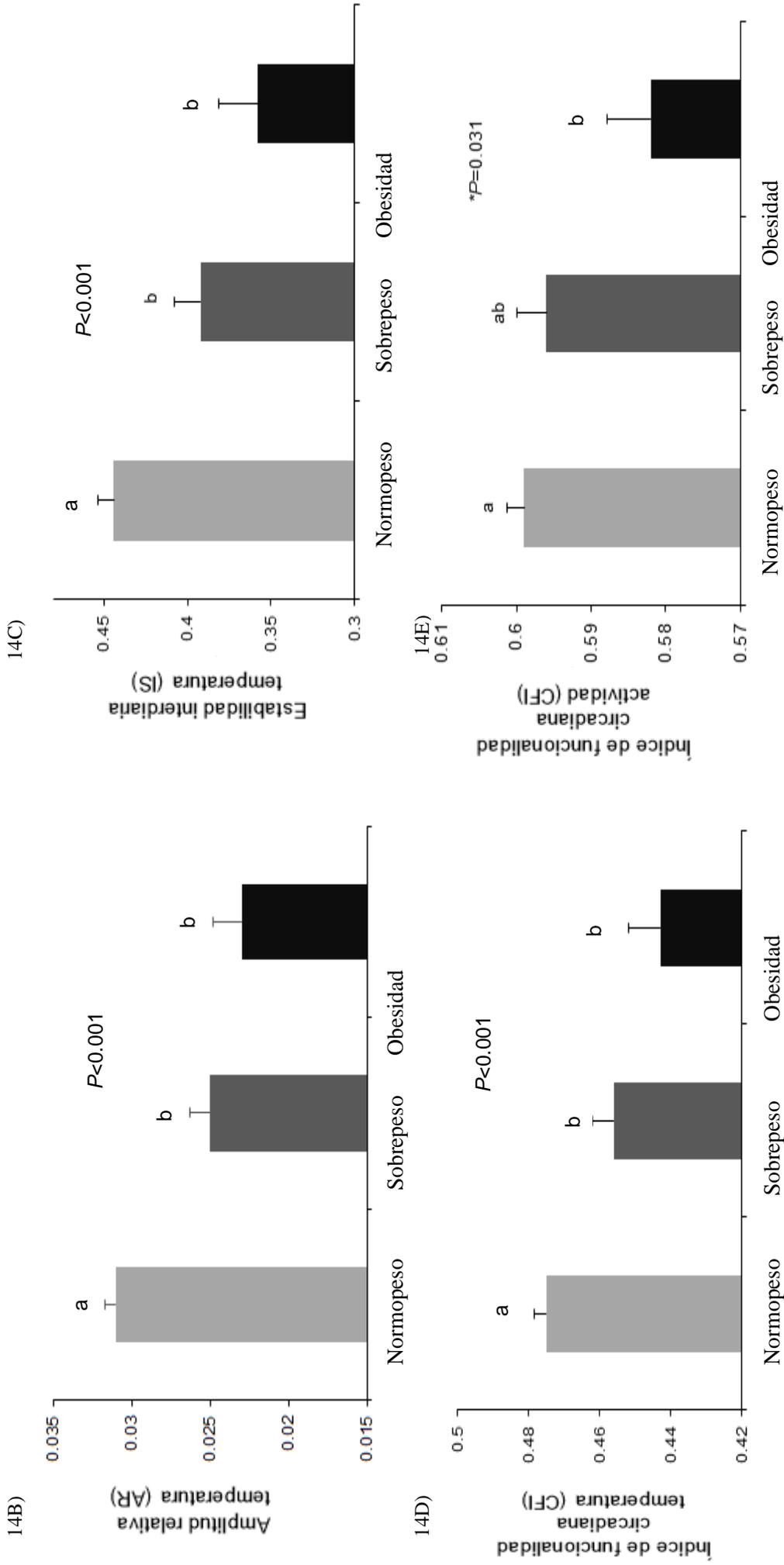
Se detectaron diferencias estadísticamente significativas en altura, peso, IMC, grasa corporal (%), circunferencia de la cintura, insulina y triglicéridos entre grupos de niños no obesos y obesos.

### Score circadiano y obesidad

Los niños con obesidad presentaron valores del score circadiano más bajos (media ± DE, 1033.40 ± 222.59), seguidos de los niños con sobrepeso (media ± DE, 1116.82 ± 172.41) y los niños con peso normal (media ± DE, 1178.56 ± 181.53) ( $P < 0.001$ ), **Figura 14A** y **Tabla 22**.



**Figura 14A.** Score circadiano en niños con normopeso, sobrepeso y obesidad



**Figura 14.** Diferencias en la temperatura periférica y actividad según el grado de obesidad. Diferentes superíndices indican diferencias significativas con  $P < 0.05$ . (\*): Diferencias significativas entre peso normal y obesidad

**Tabla 22.** Asociación de las variables circadianas con el IMC y masa de grasa.

	IMC		MASA GRASA (%) <sup>a</sup>	
	$\beta$	SEM	<i>P-value</i>	<i>P-value</i>
<b>Parámetros circadianos</b>				
<b>Score circadiano</b>	-14.143	2.28	< <b>0.001</b>	<b>0.011</b>
<b>Temperatura (°C)</b>				
Media (°C)	0.057	0.011	< <b>0.001</b>	0.091
Amplitud	- 0.025	0.006	< <b>0.001</b>	<b>0.019</b>
PR	-0.537	0.181	<b>0.003</b>	0.144
IS	- 0.007	0.002	< <b>0.001</b>	0.160
AR	- 0.001	0.001	< <b>0.001</b>	<b>0.012</b>
M5 (°C)	0.033	0.011	<b>0.002</b>	0.586
TM5 (h)	- 0.066	0.030	<b>0.032</b>	<b>0.030</b>
CFI	- 0.003	0.001	< <b>0.001</b>	0.137
<b>Actividad (°/min)</b>				
Media (°/min)	- 0.227	0.074	<b>0.002</b>	0.077
Amplitud	- 0.404	0.074	< <b>0.001</b>	<b>0.009</b>
Acrofase (h)	0.018	0.009	<b>0.044</b>	0.107
Rayleigh	- 0.010	0.002	< <b>0.001</b>	0.104
PR	-0.319	0.061	< <b>0.001</b>	<b>0.028</b>
IS	- 0.002	0.001	<b>0.046</b>	0.897
IV	0.002	0.001	<b>0.043</b>	0.249
AR	- 0.002	0.001	<b>0.001</b>	0.729
M10 (°/min)	- 0.526	0.117	< <b>0.001</b>	<b>0.020</b>
CFI	- 0.002	0.001	<b>0.001</b>	0.926
<b>Posición (°)</b>				
Mesor (°)	- 0.122	0.040	<b>0.002</b>	0.122
Amplitud	- 0.116	0.037	<b>0.002</b>	<b>0.002</b>
PR	- 0.123	0.049	<b>0.012</b>	<b>0.003</b>
M10 (°)	- 0.21	0.048	< <b>0.001</b>	<b>0.003</b>
<b>TAP (AU)</b>				
Media (AU)	- 0.001	0.001	<b>0.009</b>	<b>0.028</b>
Amplitud (AU)	- 0.002	0.001	< <b>0.001</b>	<b>0.035</b>
Rayleigh	- 0.008	0.002	<b>0.002</b>	0.382
PR	- 0.603	0.115	< <b>0.001</b>	<b>0.032</b>
IS	- 0.005	0.001	< <b>0.001</b>	0.390
IV	0.003	0.001	<b>0.004</b>	<b>0.001</b>
AR	- 0.002	0.001	<b>0.035</b>	0.589
M10 (AU)	- 0.003	0.001	< <b>0.001</b>	<b>0.001</b>
CFI	- 0.003	0.001	< <b>0.001</b>	0.071
<b>Cortisol 14:00h (nmol/l)</b>	- 0.100	0.047	<b>0.035</b>	<b>0.038</b>
<b>Hora de irse a la cama (h)</b>	0.017	0.008	<b>0.041</b>	0.180
<b>Duración del sueño (h)</b>	- 0.020	0.008	<b>0.016</b>	0.080
<b>Hora de la cena (h)</b>	0.010	0.007	0.152	<b>0.015</b>
<b>MCTQ</b>	0.004	0.009	0.654	<b>0.007<sup>b</sup></b>

Abreviaturas: Índice de masa corporal: IMC, porcentaje de ritmo: PR, estabilidad interdiaria: IS, variabilidad intradía: IV, amplitud relativa: AR, M5 y su correspondiente temporización TM5, M10 e índice de función circadiana: CFI. Unidades arbitrarias (AU), Cuestionario de Munich: MCTQ. Los valores de  $P$  en negrita indican diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ ). Ajustado por raza, edad, centro de estudio y sexo. a)  $n = 346$  b) Ajustado por raza, edad y año escolar.

### Herramientas circadianas y obesidad

Ciertos parámetros circadianos mostraron una asociación significativa con la obesidad. La amplitud relativa (AR), la estabilidad interdiaria (IS) y el CFI del ritmo de temperatura fueron significativamente más bajos a medida que aumentó el grado de obesidad (**Figura 14B-D**).

Se encontraron resultados similares con respecto a los parámetros del ritmo de actividad, los cuales disminuyeron con la obesidad. Concretamente, el CFI en la actividad fue menor en los niños más obesos (**Figura 14E**). Además, estos niños con mayor IMC mostraron valores más elevados de fragmentación del ritmo de actividad (IV) ( $P=0.043$ ) y una acrofase más tardía ( $P=0.044$ ).

En la variable integradora TAP, parámetros como mesor ( $P=0.009$ ), amplitud ( $P<0.001$ ), rayleigh ( $P=0.002$ ), porcentaje de ritmicidad ( $P<0.001$ ), amplitud relativa ( $P=0.035$ ), CFI ( $P<0.001$ ), entre otros, fueron más bajos a medida que aumentó el IMC. Además, nuestros resultados mostraron que la fragmentación de TAP también fue mayor ( $P=0.001$ ) en niños con un IMC y con un porcentaje de grasa más altos.

Por otro lado, obtuvimos una asociación negativa entre el cortisol a las 14:00h con el IMC ( $P=0.035$ ) y la grasa corporal ( $P=0.038$ ). Además, la mayoría de los niños nocturnos, según MCTQ, presentaban mayores valores de grasa corporal (Tabla 22).

### Salud circadiana, conductas y alteraciones metabólicas.

Nuestros datos mostraron que los niños que tenían una mejor salud circadiana tenían 0.34 veces menos probabilidades de ser obesos ( $P<0.001$ ), **Figura 15**. Además, los niños con elevada salud circadiana tenían una probabilidad 0.40 veces menor de tener una mayor circunferencia de cintura que aquellos que tenían una salud circadiana baja.

Por otro lado, en términos de sueño, encontramos que los niños con elevada salud circadiana tenían una probabilidad de 0.11, 0.22 y 0.47 veces menor de presentar un menor contraste día-noche, una menor profundidad de sueño y una duración del sueño más corta, respectivamente, que los que tenían una baja salud circadiana. También presentaban 2.62 veces más probabilidades de acostarse antes que los niños con menor salud circadiana ( $P=0.042$ ).

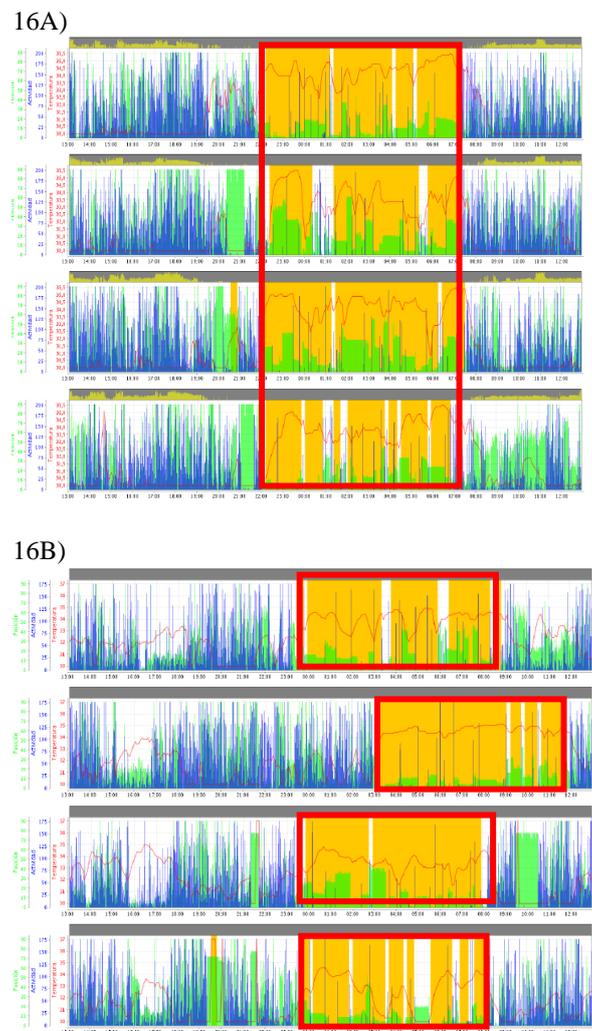
En cuanto a la ingesta de alimentos, los niños con elevada salud circadiana presentaron una probabilidad 1.52 veces mayor de cenar más temprano que los niños con una salud circadiana más baja. Por otro lado, aquellos niños con una elevada salud circadiana tenían 0.27 menos probabilidad de tener una actividad física media más baja (Figura 15).

#### Regularidad del sueño y obesidad.

Un ritmo de sueño más estable es un marcador de salud circadiana. En la **Figura 16**, están representados dos niños durante cuatro días, cuya regularidad en el ritmo del sueño era diferente. El niño de peso normal con más regularidad en el sueño se representó en la **Figura 16A** y la **Figura 16B** representa un niño obeso con baja regularidad.

#### Patrones diarios de temperatura periférica en niños con peso normal, sobrepeso y obesidad.

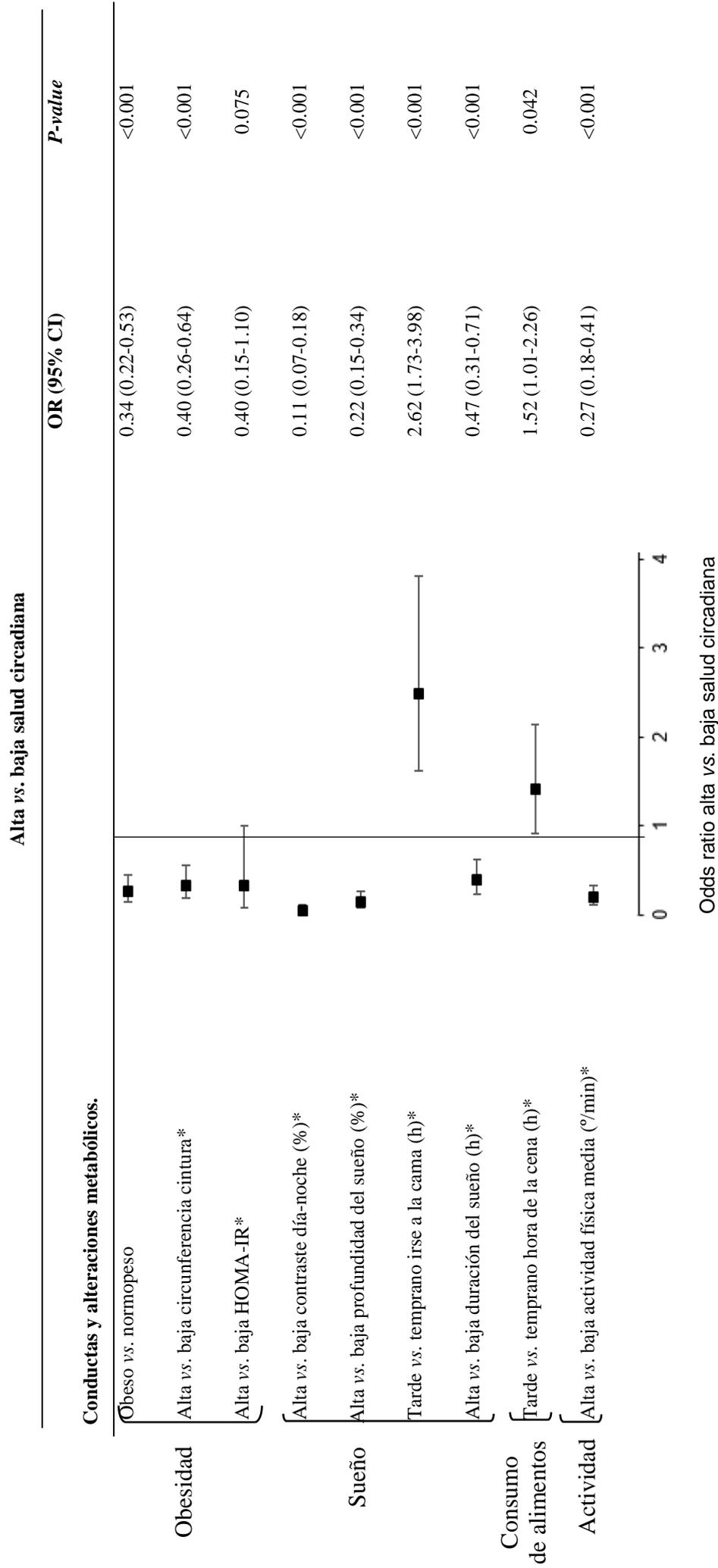
Los grupos exhibieron patrones de temperatura periférica diarios similares, caracterizados por altas temperaturas periféricas a medida que aumenta la obesidad. La curva de temperatura exhibió un patrón bifásico en las horas del sueño en todos los niños (**Figura 17A**). Los niños obesos estaban más somnolientos por la mañana



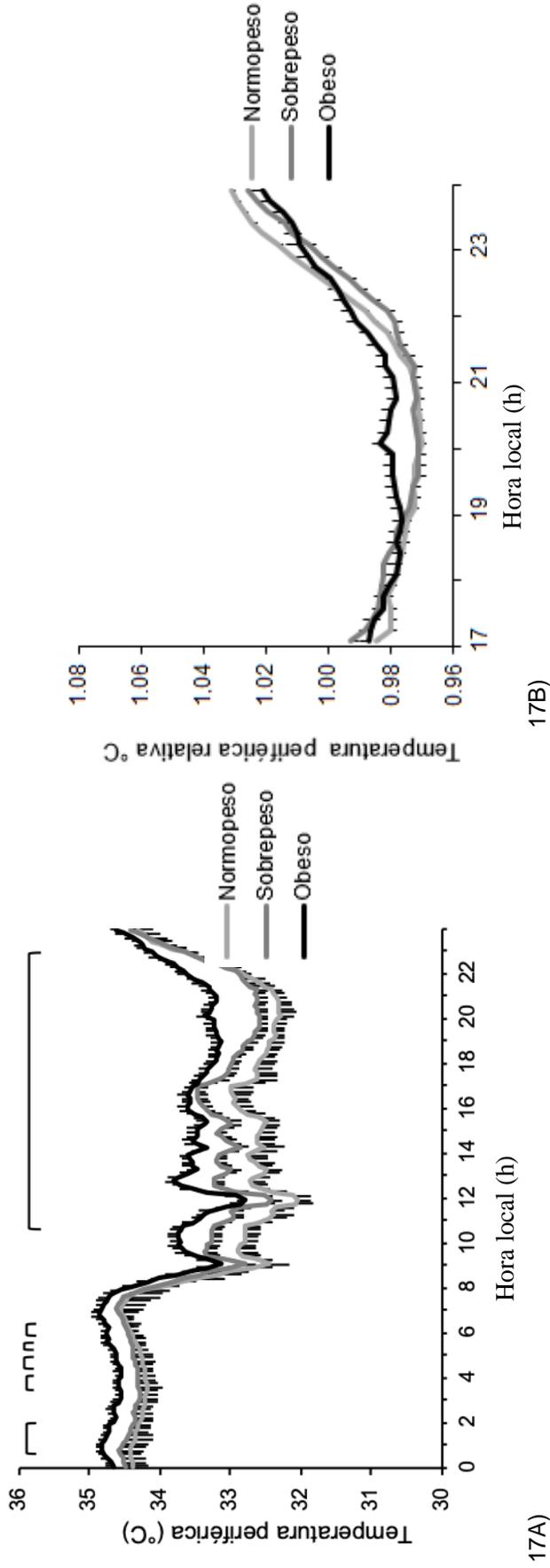
**Figure 16.** Representación de la regularidad en el ritmo del sueño de dos niños durante 4 días. La temperatura periférica se representa en rojo, la actividad en azul, la posición en naranja. La Figura 16A corresponde a un niño de peso normal con una alta estabilidad durante los 4 días, el sueño de cada día cabe en el mismo rectángulo; La Figura 16B representa a un niño obeso con baja regularidad, el sueño de cada día es en un rectángulo diferente.

y tenían un pico postprandial más bajo lo que indica una salud circadiana menor ( $P < 0.005$ ).

Como se muestra en la **Figura 17B**, se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos en la zona del máximo despertar. Concretamente, en niños obesos, se observa que esta área era mucho menos marcada, lo que conduciría a un retraso en la hora de acostarse.



**Figura 15.** Odds ratio e intervalo de confianza al 95% IC de la asociación entre alta vs. baja salud circadiana con alteraciones del comportamiento y metabólicos. \* Se clasificaron la circunferencia de la cintura, HOMA-IR, contraste día-noche, profundidad del sueño, hora de la cena, hora de ir dormir, duración del sueño y actividad física media utilizando la mediana.



**Figura 17.** Patrones diarios de temperatura en niños con peso normal, sobrepeso y obesidad. Cada curva representa los patrones diarios de temperatura periférica registrados durante un período de siete días entre niños de peso normal, sobrepeso y obesos. La figura 17A representa las diferencias entre los diferentes grupos. La figura 17B representa la zona del máximo despertar ajustada por mesor. La línea superior representa las horas en las que el patrón difiere significativamente ( $P < 0.05$ ).





Anchal Sahani, 10 años, Chembur, Mumbai, India, fotografiada el 11 de marzo de 2017, rodeada de su alimentación habitual. Daily Bread, serie fotográfica de Gregg Segal.

Link: <https://www.greggsegal.com/P-Projects/Daily-Bread/22/thumbs>

**DISCUSIÓN**



## 1. Discusión general

Los resultados de la presente tesis doctoral demuestran la importancia del estudio de la salud circadiana en niños de edad escolar a través de técnicas no invasivas y en condiciones normales de vida del niño.

La relación presente entre la baja salud circadiana, el mayor grado de obesidad, el aumento de factores inflamatorios y la peor salud cardiometabólica pone de manifiesto la importancia de la caracterización circadiana del niño como medida preventiva o paliativa de complicaciones de la salud. Es de especial interés incluir estudios basados en herramientas cronobiológicas no invasivas desde un enfoque integral para el paciente pediátrico.

En el presente trabajo se propone un protocolo para la determinación de la salud circadiana mediante técnicas no invasivas y fáciles de aplicar. Además, hemos desarrollado un nuevo score circadiano capaz de evaluar la salud circadiana y detectar posibles alteraciones. Entre las medidas relacionadas con la función circadiana, la variable integradora TAP se propone como la técnica más adecuada y fiable para determinar las características del sistema circadiano. Este nuevo score circadiano muestra que los niños presentan una peor salud circadiana que las niñas y los adultos peor que los niños en su conjunto. Este último hallazgo está en concordancia con estudios previos que aseguran que con el envejecimiento la salud circadiana se va deteriorando (163).

En nuestras investigaciones demostramos la existencia de una asociación entre suero y saliva en biomarcadores como la proteína C reactiva (PCR) e la insulina, aunque esta última es significativa sólo en niñas. También pudimos comprobar que los biomarcadores en saliva pueden capturar diferencias en el grado de obesidad o IMC, en los hábitos alimentarios y características nutricionales de la dieta y en el nivel de actividad física en los niños en edad escolar. Por lo tanto, nuestro trabajo muestra que la saliva es una herramienta útil, no invasiva (al no necesitar realizar extracción de sangre) y además evita el estrés metabólico asociado a la punción, por lo que presenta ciertas ventajas sobre la sangre para evaluar marcadores metabólicos de inflamación

relacionados con el IMC y en el estilo de vida. Sin embargo, son necesarias nuevas investigaciones para validar esta técnica en poblaciones más numerosas.

La aplicación de técnicas no invasivas y objetivas como es la determinación del ritmo de 24h de la temperatura periférica, la actividad física y la posición, y la variable integradora TAP, ha permitido la evaluación del cronotipo y se ha correlacionado con medidas subjetivas como el cuestionario de Múnich (MCTQ). A través del TAP observamos que los niños con cronotipo vespertino presentaron mayores alteraciones circadianas, metabólicas y mayor jet lag social, así como una duración de sueño menor, y peores características del sueño que aquellos con cronotipos matutinos o indefinidos.

Por otra parte, los horarios de comida y de actividad física, dos de los sincronizadores externos más importantes de los relojes periféricos, se asociaron con obesidad. Los resultados de la presente tesis doctoral confirman los hallazgos en adultos que indican que una alimentación tardía y alteraciones en el ritmo de actividad/reposo hacia una menor amplitud, mayor fragmentación y en general hacia un menor índice de Funcionalidad Circadiana o CIF, se asocian con un incremento del peso corporal y aumento de inflamación. Los niños que realizaban de forma habitual una cena tardía presentaron mayor IMC y valores aumentados de diferentes biomarcadores cardiometabólicos y de inflamación como la PCR e IL6. Además, alteraciones en los ritmos de actividad se asociaron con un aumento de concentraciones en saliva de PCR, IL8 e IL1 $\beta$  en los niños de edad escolar.

El desarrollo del score circadiano nos ha permitido evaluar el sistema circadiano en la población de niños de edad escolar y hemos podido comprobar que un menores valores de este score, indicativos de una peor salud circadiana se asocian con un mayor grado de obesidad. La importancia de este score circadiano reside en que su evaluación en edades tempranas nos puede permitir realizar cambios en los hábitos de horarios de los niños hacia una disminución del riesgo de sobrepeso. La obesidad pediátrica se ha multiplicado por diez en las últimas cuatro décadas. Sin embargo, la prevención y el tratamiento de la obesidad en los niños siguen siendo un desafío y es necesario encontrar nuevas áreas de actuación, como puede ser el estudio cronobiológico del niño y la intervención en cambios de hábitos de vida para la mejora de la salud circadiana, y como consecuencia la disminución del sobrepeso.

Todos estos resultados en su conjunto demuestran la importancia del estudio de las características cronobiológicas del niño, ya a edades tempranas. Su relación con alteraciones metabólicas, circadianas y enfermedades como la obesidad, hacen de este campo un interesante mundo donde investigar. Se propone el uso de técnicas cronobiológicas no invasivas como la determinación de los ritmos diarios de la temperatura corporal o de actimetría, la medición en saliva de cortisol o melatonina a diferentes horas del día junto con los registros de horarios de comida entre otros, ya que son capaces de detectar el estado cronobiológico del niño por lo que deben incluirse en un enfoque integral para el paciente pediátrico. Estas técnicas junto con la determinación de biomarcadores inflamatorios analizados a través de la saliva, permitirá el estudio de salud cronobiológica y cardiometabólica del niño, sin necesidad de recurrir a la extracción de muestras de sangre, que es un factor de estrés para el niño de edad escolar.

## **2. Sobre el desarrollo de un score circadiano en la población de niños**

Uno de los propósitos de esta tesis doctoral fue desarrollar un score capaz de evaluar la función circadiana en niños de edad escolar tras combinar herramientas no invasivas previamente validadas en adultos. Entre las medidas circadianas utilizadas, nuestros resultados obtenidos del análisis factorial mostraron que la variable integradora TAP en su conjunto y en particular el CIF (Índice de Funcionalidad Circadiana) fue la más adecuada para determinar las características del sistema circadiano en niños en edad escolar ya que apareció en el primer factor y en la primera posición, lo que demuestra que era la que explicaba la mayor variabilidad en la población estudiada. El Score obtenido, tras multiplicar cada variable dentro de su factor por su peso en el análisis (eigenvalue), fue significativamente mayor en niñas que en niños lo que sugiere una la mejor función circadiana entre las niñas.

Hemos construido la primera y más completa base de datos de niños en edad escolar para evaluar la función circadiana (ONTIME-Jr) que incluye datos relacionados con el estado circadiano, obtenidos por múltiples herramientas circadianas como cuestionarios de alimentación y sueño, cuestionarios sobre el cronotipo, concentraciones

de melatonina y cortisol por medio de muestras salivales, dos sensores de muñeca diferentes para probar la variable integradora TAP (42, 156) y un luxómetro colgado alrededor el cuello. El interés de estas técnicas es que no son invasivas y han sido diseñadas para evaluar la función circadiana sin afectar las condiciones normales de vida del niño.

Estudios previos centrados en la evaluación del sistema circadiano fueron realizados principalmente en adultos y además utilizaban algún marcador circadiano de manera individual como por ejemplo, el cronotipo a través de cuestionarios (17), concentraciones salivales de melatonina y cortisol, patrones de sueño (134), temperatura de la piel (40) o ritmos de actividad a través de actímetros (29) pero que sepamos, todas estas herramientas no invasivas nunca se habían usado globalmente en la misma población de niños.

Los resultados de la presente tesis doctoral muestran que la variable integradora TAP y el ratio de cortisol día/noche son las variables que explican mejor la variabilidad de la muestra con respecto a las características relacionadas con el sistema circadiano, según lo determinado por un análisis factorial. De acuerdo con nuestro resultados, estudios previos realizados en adultos sugieren que la variable integradora TAP es más fiable y se ve menos afectada por agentes ambientales que el uso de la temperatura periférica o de la actividad por separado (42).

De las características del TAP, el índice de función circadiana CFI se encontró en la primera posición y en el primer factor del análisis. Este índice (CFI) resume la regularidad y fragmentación del ritmo, y proporciona información sobre el sistema circadiano facilitando la evaluación objetiva de la cronodisrupción en estos niños (42). Valores altos de CFI indican ritmos más regulares día a día, como lo demuestra a) la mayor estabilidad interdiaria; b) los altos valores de rayleigh, con la fase más estable entre los días; y c) la mayor amplitud del ritmo lo que indica una mayor diferencia entre los valores de mañana y noche. El índice de función circadiana fue significativamente mayor en niñas que en niños, lo que sugiere que las niñas presentaban una mejor función circadiana, hallazgo confirmado por el recién desarrollado score circadiano que también fue mayor en niñas que en niños. En comparación con una población control de

sujetos adultos de la misma área mediterránea, los datos sugieren una mejor función circadiana en niños en edad escolar que en adultos.

Otra técnica utilizada en el protocolo actual fue la medida del cortisol salival. Las niñas presentaban un ratio mañana/noche más elevado que los niños, lo que indica un perfil más saludable (52). El cortisol es un corticosteroide que presenta un ritmo circadiano marcado. Estudios previos realizados en adultos han mostrado una disminución similar en la amplitud del cortisol en hombres en relación a las mujeres (164), por lo que estos resultados podrían ser inherentes al sexo.

Sin embargo, no podemos descartar la hipótesis de que la diferente amplitud del cortisol en niños en comparación con niñas esté relacionada con un mayor deterioro circadiano (52). En adultos, una disminución de la amplitud diaria en el patrón de cortisol se ha asociado con obesidad central (característica de los hombres), alteraciones metabólicas en la presión arterial y alteraciones en la regulación de la glucosa y lípidos plasmáticos (120). Son necesarios más estudios para dilucidar si el ratio cortisol mañana/noche se asocia con alteraciones metabólicas en niños.

Diferentes parámetros del ritmo de actividad/reposo entre ellos la fragmentación del ritmo (IV), que mide la frecuencia de los cambios entre la alta y baja actividad, mostraron diferencias entre niñas y niños. Las niñas eran más activas que los niños, como lo demuestran los mayores valores obtenidos en la actividad media y M10. Adicionalmente, las niñas mostraron un ritmo de actividad menos fragmentado que los niños, con valores de variabilidad intradiarios disminuidos. Diversos autores sugieren que la fragmentación del ritmo es un indicador de salud en adultos, en los que una mayor fragmentación de los ritmos de actividad está relacionada con un riesgo aumentado de mortalidad, enfermedad cardiovascular, deterioro cognitivo, síntomas de depresión y obesidad (165). En adolescentes, la fragmentación del ritmo de actividad se ha relacionado también con la obesidad y la adiposidad central (165).

Una de las características que definen al cronotipo vespertino es que los sujetos se encuentran más activos y con mayor alerta durante la noche, rasgo considerado propio de la pubertad. Durante la adolescencia se experimenta un retraso en los relojes circadianos por lo que a estas edades los chicos se acuestan y se levantan más tarde que

los niños más pequeños (165). En el estudio actual, las niñas tenían mayor tendencia a ser vespertinas que los niños, según el MCTQ. Estudios previos sugieren que las niñas tienden a ser más vespertinas que los niños, aunque a esta edad el cronotipo no está completamente definido en niños (166).

#### Diferencias entre niños y adultos

El presente estudio sugiere que el ritmo de temperatura periférico difiere entre las etapas tempranas y posteriores de la vida con una mejor función circadiana en niños que en adultos de la misma zona mediterránea. Los niños en edad escolar exhibieron un patrón bifásico en el ritmo temperatura durante el sueño mientras que los adultos presentaban un patrón monofásico (167). La duración del sueño más larga en estos niños en comparación con adultos podrían explicar las diferencias (168) ya que se han mostrado patrones bifásicos similares en adultos que alargan el sueño de 7 a 11 horas por día (168).

Al comparar los parámetros obtenidos en ritmo de la temperatura entre niños y adultos obtuvimos ritmos menos fragmentados y con mayor amplitud y porcentaje de ritmicidad en niños que en adultos. Una amplitud del ritmo de temperatura disminuida ha sido relacionada previamente con el envejecimiento. El índice de funcionalidad circadiana también fue mayor en niños que en adultos, lo que sugiere un ritmo circadiano más saludable. Nuestros datos concuerdan con estudios anteriores que indican que el envejecimiento está asociado con deterioro progresivo de los ritmos circadianos (163).

Del trabajo actual, se pueden sugerir varias recomendaciones para futuros estudios en poblaciones similares de niños:

- a) Utilizar un diseño de reloj de pulsera más seguro y resistente al agua. En el estudio actual se colocaron los sensores en unos relojes de pulsera especialmente diseñados para ser usados de forma segura y cómoda. Sin embargo, cuando los niños jugaban algunos de los dispositivos fallaban por movimientos bruscos (4%) y en algunos actímetros (3%) entraba en los dispositivos vapor de agua, provocado por sudor.
- b) Reemplazar el registro dietético de 7 días por una herramienta más simple, por ejemplo, una aplicación móvil.

c) Otros estudios deberían investigar el papel de la melatonina en el funcionamiento del sistema circadiano en niños. En el estudio actual, la melatonina no pudo capturar variabilidad circadiana o evaluar las diferencias entre niñas y niños, como se describió anteriormente (134). Sin embargo, esto podría ser debido a la baja tasa de recolección de muestras. De hecho, las muestras de melatonina a la 01:00h fueron difícil de obtener y en varios casos se recolectó una cantidad insuficiente de saliva (28%). Este hallazgo necesita ser explorado en una población más grande y con un mayor número de muestras.

d) Decidimos analizar la exposición a la luz, cuando el estudio ya había comenzado, por este motivo fueron incluidos un menor número de niños en los análisis la de esta variable. Por tanto, para hacer cualquier conclusión válida sobre esta medida, es necesario ampliar la muestra.

En resumen, hemos sido capaces de desarrollar un nuevo score circadiano a través de medidas no invasivas, como la variable integradora TAP, mediciones de cortisol en saliva, etc, que parece ser fiable para evaluar el sistema circadiano en niños en edad escolar en condiciones de vida normales. Además, encontramos que las niñas presentaban una mejor salud circadiana que los niños y que estos en su conjunto, mostraban una mejor salud circadiana que los adultos.

### **3. Sobre el uso de la saliva como herramienta no invasiva para la evaluación de biomarcadores metabólicos e inflamatorios en niños**

#### *Asociaciones entre saliva y suero*

Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral confirman el uso de la saliva como fuente de biomarcadores metabólicos e inflamatorios relacionados con el IMC, hábitos dietéticos y actividad física en niños en edad escolar y destaca la importancia de considerar el sexo en este tipo de estudios. Entre los biomarcadores evaluados, se observó una asociación entre la saliva y el suero para la PCR de la población estudiada. De acuerdo con nuestros resultados, la asociación positiva de la PCR entre los dos biofluidos también se ha reportó por diferentes autores en neonatos (169), adolescentes

(141) y adultos (170). La PCR es una importante proteína utilizada para evaluar el estado de inflamación en fase aguda. Además, la PCR se utiliza como marcador para el pronóstico de un gran número de patologías (171). Aunque parece que la PCR salival presenta valores semejantes a la sérica, se necesitan más estudios para confirmar su utilidad clínica en niños.

La insulina salival mostró una tendencia a correlacionarse con la de suero, siendo esta asociación significativa en niñas, pero no en niños. Aunque, ya se ha descrito previamente la existencia de esta asociación entre los valores de insulina en suero y saliva, existe cierta divergencia en la literatura relacionada con este tema (126), ya que, al analizar perfiles individuales, se han observado discrepancias entre el momento y la magnitud de los cambios de insulina en los dos biofluidos (172). La presencia de insulina en saliva se ha explicado por dos hipótesis principales: la primera sugiere que las glándulas salivales sintetizan y secretan insulina (173, 174), mientras que la segunda indica que la insulina entra en la saliva desde sangre por ultrafiltración (175). Sin embargo, ninguno de ellos explicaría las diferencias encontradas en el presente trabajo entre niños y niñas. Deberían, por tanto, realizarse otros estudios que evalúen con más detalle los mecanismos por los que la insulina entra en la saliva y su posible relación con el sexo. Sin embargo, nuestros datos sugieren que en las niñas, las concentraciones de insulina en saliva se asocian con las de suero.

#### *Marcadores de obesidad en niños*

Cuando se analizaron los marcadores salivales en relación con el IMC, encontramos asociaciones positivas entre este índice de obesidad y la PCR y la insulina. En niños con sobrepeso/obesidad la PCR, insulina e IL1 $\beta$  mostraron concentraciones 3 veces más altas en comparación con los niños que presentaban normopeso. Estos resultados coinciden con los obtenidos en estudios previos en niños (126, 176) en los que se detectaron asociaciones entre el aumento de estos biomarcadores y la resistencia a la insulina, así como con otras patologías cardiovasculares.

#### *Marcadores de ingesta en niños*

Por otro lado, cuando analizamos la ingesta dietética de nuestros chicos, encontramos asociaciones significativas entre las características de la dieta y algunos biomarcadores proinflamatorios salivales tales como la PCR, la IL, el TNF y la insulina. Tras estas

observaciones concluimos que el uso de saliva en vez de sangre, puede ser un método fácil y no invasivo para estudiar el impacto de los hábitos alimentarios en el metabolismo en la población infantil. El análisis de estos biomarcadores salivales podría ser útil para corregir comportamientos alimentarios inadecuados y establecer otros más saludables basados en una dieta más equilibrada.

#### *Marcadores de estado físico en niños*

La actividad física es uno de los principales factores para la salud física, psicológica y cognitiva en niños (177). Generalmente se recolectan muestras de suero mediante punción, para evaluar el efecto de la actividad física sobre el metabolismo y/o el estado de salud general (177). La novedad de este estudio es que la determinación de biomarcadores proinflamatorios en saliva es útil para determinar los efectos beneficiosos de la actividad física sobre el metabolismo del niño. Así, de resistencia a la insulina en saliva disminuye en aquellos niños que realizaron una mayor actividad física. Aunque hubo diferencias entre niños y niñas ya que en las niñas las asociaciones entre el grado de actividad física y la insulina se presentaron sólo en niñas, mientras que en los niños fueron varios los biomarcadores salivales inflamatorios (IL6, MCP1, NGF) y metabólicos (glucosa, insulina, HOMA) que se relacionaron con los valores de actividad física.

Las conclusiones de este trabajo es que fueron las características de la dieta las que se asociaron en mayor medida con los biomarcadores salivales. Es cierto que se podría argumentar que este mayor número de asociaciones podría deberse a que se utilizaron un mayor número de variables ( $n = 9$ ) en la composición de la dieta que en la actividad física ( $n = 2$ ) e IMC ( $n = 1$ ); aun así, estos resultados resaltan el potencial que tienen los biomarcadores salivales para evaluar los efectos de la ingesta dietética sobre el estado metabólico del niño.

Es importante resaltar que solamente se hicieron extracciones de sangre en 79 niños, aquellos que asistieron a una consulta pediátrica para revisiones rutinarias. Por ello, en la interpretación de los resultados, tenemos que tener en cuenta que estos niños sufrieron una extracción de sangre invasiva, situación que les podría haber causado ansiedad y estrés y podría repercutir en los valores de los biomarcadores séricos. Sin embargo, este es el procedimiento común utilizado en la práctica clínica y en estudios

de investigación donde diferentes biomarcadores son determinados para evaluar el estado de salud de los niños. Es cierto que un tamaño de muestra mayor habría aumentado la potencia estadística del estudio. No obstante, el tamaño de la muestra del presente estudio (n=129) tuvo suficiente potencia (>80%) para lograr los objetivos, tal y como hemos deducido de estudios previos que también analizaron biomarcadores en saliva y suero, como glucosa y PCR.

En resumen, nuestros resultados profundizan en el análisis de la saliva como técnica no invasiva capaz de recoger alteraciones en la salud. Los biomarcadores en la saliva muestran cambios relacionados con el IMC, la ingesta dietética y la actividad física en niños. Estos datos indican que el análisis de biomarcadores en la saliva puede constituir como una potente herramienta no invasiva y libre de estrés dependiente del sexo, sin embargo, se hacen necesarios nuevos estudios que confirmen la validez de esta técnica.

#### **4. Sobre el papel del cronotipo evaluado objetivamente en niños y su relación con el riesgo metabólico, jet lag social, alteraciones del sueño y notas académicas**

La presente tesis doctoral es la primera en utilizar la variable integradora TAP para evaluar objetivamente el cronotipo en niños en edad escolar. Los resultados obtenidos demuestran la asociación perjudicial entre el cronotipo vespertino y el jet lag social, la exposición a luz nocturna, las alteraciones del sueño, así como su relación con las notas académicas y el riesgo metabólico (valores más altos de insulina, glucosa, triglicéridos y colesterol).

En adultos, previamente nuestro grupo y otros han demostrado que la variable integradora TAP es capaz de capturar el cronotipo endógeno del individuo (18). TAP tiene entre sus ventajas que evalúa el cronotipo de forma no invasiva y en condiciones de vida libre, sin interferir en la rutina del sujeto. Además se ha utilizado en adultos para evaluar el cronotipo individual, su heredabilidad (178) y para estudiar los patrones de sueño (179) y características relacionadas con el sistema circadiano en enfermedades tales como la obesidad (180) y el Parkinson (44). Cuando el cronotipo se evaluó

objetivamente por medio de la acrofase del TAP, los marcadores del cronotipo subjetivo, tales como la hora central del sueño y el punto medio de ingesta, se retrasaron en los cronotipos vespertinos en comparación con los cronotipos matutinos. Los valores de melatonina a la 01:00h fueron significativamente más bajos en los niños vespertinos que en los matutinos, lo que sugiere que la melatonina a esas horas de la noche todavía no ha alcanzado su máximo y puede seguir aumentando ya que la hora de acostarse era en los niños vespertinos más tardía.

Los niños con cronotipo vespertino, a pesar de ser niños en edad escolar con un horario marcado, presentaron hábitos de vida específicos y diferentes a los niños matutinos, principalmente por la noche, cuando los niños eran libres de elegir y cuando podían aparecer sus tendencias más endógenas. El papel de los padres es fundamental en el adecuado cumplimiento de los horarios de sueño y otras actividades de los niños, estudios previos confirman que aquellos niños cuyos padres no establecen la hora de acostarse de sus hijos durante la infancia presentan una mayor preferencia por realizar sus actividades por la noche y ser más vespertinos, en comparación con aquellos cuya hora de acostarse está marcada por sus progenitores (181). Nuestros resultados muestran que los niños vespertinos presentaban más actividad física por la noche, y menos actividad física durante el día, mientras que mostraban una temperatura corporal más alta durante el día lo que sugiere un aumento de la somnolencia diurna.

La duración del sueño juega también un papel importante en el desarrollo de patologías. El sueño es fundamental para mantener una buena salud mental y la falta de éste se ha asociado con la obesidad (29). Como se esperaba, la duración del sueño fue menor en los cronotipos nocturnos que en los diurnos o matutinos. El sueño insuficiente se ha asociado con una mayor la depresión, menor rendimiento escolar, y un aumento del riesgo metabólico y de enfermedades tales como la diabetes tipo II y las enfermedades cardiometabólicas, entre otras (182).

La "robustez" del ritmo del sueño está determinado por varios parámetros, como la amplitud relativa, el índice de función circadiana (CFI) (183), la estabilidad interdiaria y la variabilidad intradiaria. El CFI proporciona información sobre el estado del sistema circadiano y facilita una evaluación objetiva de la cronodisrupción del individuo (42). En el estudio actual, el CFI del sueño fue menor en los cronotipos

vespertinos que en los matutinos, lo que sugiere que los cronotipos nocturnos tenían una peor función circadiana del sueño. Además, los vespertinos tenían menos profundidad del sueño, menor contraste día-noche y hábitos más irregulares.

Valores bajos de CFI representan ritmos de sueño menos regulares día a día, como lo demuestra la menor estabilidad y amplitud del ritmo que presentaron los niños vespertinos al ser comparados con los matutinos.

Otro de los factores estudiados en los niños fue el jet lag social. El jet lag social, se refiere a las diferencias en el centro del sueño entre los días de la semana y del fin de semana, normalmente hacia un retraso del centro del sueño durante el fin de semana. Se entiende que aquellos niños que presentan un retraso de más de 2h en este centro del sueño presentan jet lag social, lo que se ha asociado previamente con alteraciones psicológicas (184) y obesidad (91). Según la literatura científica, en la población adulta, los individuos vespertinos presentaban mayores valores de jet lag social que los matutinos. Los resultados de la presente tesis doctoral muestran que en los niños se produce una situación semejante, tal y como se ha demostrado también en estudios previos en niños de edad preescolar (185).

La luz es el sincronizador externo más importante del reloj central endógeno (186). Los horarios de exposición a la luz tienen un efecto diferente sobre la fase circadiana. La exposición temprana a la luz avanza el ciclo, mientras que la luz tardía retrasa la fase circadiana (187). En el presente estudio, los resultados del patrón de luz de 7 días analizado mostraron que los niños vespertinos presentaban una acrofase o fase de luz más retrasada y menores valores de luz durante el día que los niños matutinos. Además, la exposición a la luz durante las últimas dos horas antes de acostarse (es decir, el momento en que la melatonina comienza a aumentar) fue 3 veces mayor en los vespertinos que en los matutinos, cuyos valores alcanzaron los 50 lux. Aunque existe una variación considerable en la respuesta individual a la luz, se ha demostrado que intensidades de luz de 30 lux son suficientes para suprimir el 50% de la secreción de melatonina (188) y pueden producir un retraso de fase de más de tres horas en el reloj central (187).

Además, en el presente estudio, en comparación con los matutinos, los vespertinos estuvieron menos expuestos a la luz durante la mañana, entre la hora de levantarse y la hora de ir a la escuela, lo que también puede contribuir a un cronotipo más nocturno. Se han reportado hallazgos similares niños en los primeros años de edad (146).

#### *Cronotipo vespertino y síndrome metabólico*

Diversos estudios relacionan los horarios tardíos con problemas de salud. En adultos, el cronotipo vespertino se ha asociado con alteraciones psicológicas, neurológicas, gastrointestinales, respiratorias y con presencia de diabetes (19). En mujeres, el cronotipo nocturno también se ha asociado con tasas más altas de disfunción metabólica, enfermedad cardiovascular y con un aumento de peso respecto a mujeres matutinas (189). Vera y cols demostraron que el cronotipo vespertino se asociaba con el síndrome metabólico, resistencia a la insulina y varios factores del estilo de vida que incluyen peores comportamientos alimentarios, menor actividad física e irse a la cama y levantarse más tarde (190). Otros estudios también han mostrado que mujeres con cronotipo vespertino presentan una mayor probabilidad de padecer cáncer de mama que aquellas de cronotipo matutino (191). En este sentido la obesidad también se relaciona con la tipología circadiana, los sujetos adultos más vespertinos presentan mayor IMC, valores aumentados de cortisol y PCR, que los matutinos (192).

En niños de edad escolar, estudios previos observaron que cuanto más vespertino era el niño, éste presentaba con más frecuencia dolores de cabeza, dolor de estómago y de espalda, mareos y peor salud (193). Los resultados del presente estudio muestran que los niños vespertinos tenían un mayor riesgo metabólico que los niños matutinos, con valores más altos de insulina basal, glucosa, triglicéridos y colesterol. Además, los niños vespertinos tenían un IMC más alto y también presentaban un mayor déficit de sueño, menos actividad física durante el día y una alimentación más tardía que los niños matutinos. Estos hallazgos pueden explicar en parte por qué los cronotipos nocturnos son más obesos a estas edades.

En estudios previos, la mañana se ha relacionado positivamente con la inteligencia, la conciencia y el aprendizaje (194). Aquellos que presentaban un centro del sueño más temprano o adelantado, tenían mejores calificaciones en el colegio (194).

Además, estudios previos también han mostrado que los niños con un cronotipo nocturno clasificados mediante el cuestionario de Munich (MCTQ), presentaron un menor rendimiento académico (136). A pesar de estos resultados, diversos estudios muestran que los cronotipos tardíos son más idealistas, imaginativos e intuitivos (137). lo que coincide con nuestros resultados que muestran que los vespertinos tuvieron mejores calificaciones en arte, mientras que no se encontraron diferencias significativas en otras calificaciones académicas entre matutinos y vespertinos.

Resumiendo, esta tesis aporta un paso significativo en la comprensión del cronotipo y su relación con la cronodisrupción y el riesgo metabólico en los niños (137). Los resultados muestran que en sujetos de edad escolar evaluados objetivamente, los de cronotipo vespertino presentaron mayores alteraciones del sueño, un mayor jet lag social, más obesidad, mayor riesgo metabólico, mayor exposición a la luz nocturna y mejores calificaciones en el arte. Para los niños vespertinos, es aconsejable implementar intervenciones que reduzcan los hábitos nocturnos, mejorar el sueño y disminuir el jet lag social para así disminuir el riesgo metabólico.

## **5. Sobre la importancia de las horas de la comida, y su relación con la obesidad y alteraciones metabólicas y circadianas en niños de edad escolar**

La presente tesis doctoral pone de manifiesto que el momento de la cena es un factor relevante para el desarrollo de la obesidad en los niños en edad escolar. Los niños que cenaron tarde tuvieron 2.1 veces más probabilidades de tener sobrepeso/obesidad que los que cenaron temprano y tuvieron valores significativamente más altos de conocidos marcadores de inflamación como IL6 y PCR. Sorprendentemente, los cenadores tardíos presentaban más del doble las concentraciones de PCR en saliva que los tempranos. Este estudio proporciona una visión circadiana del efecto nocivo de una cena tardía, ya que los niños que cenaban tarde tuvieron también alteraciones en el patrón diario de temperatura corporal, con un retraso de la fase de 30 minutos y una amplitud reducida. Además, los cenadores tardíos presentaron una menor amplitud en el patrón diario de

cortisol (es decir, una disminución en el ratio del cortisol mañana-noche) con respecto a los niños que cenaron temprano.

Las investigaciones que tienen como objetivo el estudio de los horarios de las comidas en niños son escasas y existen algunas divergencias en la literatura pediátrica con respecto a este tema. El aumento de obesidad y el impacto sobre las alteraciones metabólicas como consecuencia de horarios de las comidas inadecuados está todavía en debate, debido a la publicación de resultados contradictorios. Algunos autores observan que una cena tardía se asocia con obesidad en algunos grupos de edad infantil lo que concuerda con nuestros resultados actuales que muestran que los cenadores tardíos presentan un mayor IMC y un aumento en la circunferencia de la cintura respecto a los cenadores tempranos, (149). Sin embargo, otros autores no encuentran esta asociación, por ejemplo, un estudio en más de 1600 niños de 4 a 18 años del Reino Unido, no mostraron ningún vínculo entre cenar más tarde de las 20:00 (hh:mm) y el exceso de peso corporal (150). Las diferencias en los resultados obtenidos entre ambos estudios podrían estar relacionados con la definición de “cena tardía” basada en los valores medios en nuestro trabajo y establecida una hora más tarde (21:00 hh:mm) que en la población de Reino Unido, además de las diferencias culturales entre países (64).

El exceso de peso corporal en los niños está relacionado en gran medida con la inflamación crónica de bajo grado (195). Sin embargo, no hay estudios sobre el impacto de la hora de la cena en los marcadores inflamatorios de niños en edad escolar. Nuestros resultados muestran que aquellos niños que cenaron tarde tuvieron valores más altos de PCR e IL-6, dos biomarcadores proinflamatorios que están relacionados con el IMC y están involucrados en la patogénesis de la obesidad (126), lo que sugiere una asociación perjudicial entre cenar tarde y los marcadores inflamatorios a estas edades. La IL-6 es el principal regulador de la respuesta inflamatoria aguda. Es una citocina pleiotrópica que juega un papel crítico en la inflamación crónica al estimular la síntesis de PCR (28). Actualmente, la PCR se considera como un biomarcador adecuado que se utiliza frecuentemente para estudiar la inflamación en las poblaciones pediátricas y neonatales (196). En niños con síndrome metabólico se ha demostrado que éstos presentan aproximadamente tres veces más probabilidad de tener los valores de PCR elevados que aquellos sin síndrome metabólico. Sin embargo, se desconoce si los niños con valores

elevados de PCR tienen más probabilidades de experimentar complicaciones cardiovasculares en el futuro.

El cortisol se conoce como la hormona del estrés y es una de las hormonas circadianas más relevantes conocidas. Nuestros datos muestran que niños que cenaron tarde tuvieron una disminución significativa en la amplitud del ratio mañana/noche de cortisol. Esta disminución en la amplitud puede ser un indicador de alteraciones del sistema circadiano en estos niños que cenan tarde (197). Sin embargo, los valores más bajos en cortisol a la hora del desayuno también pueden estar relacionados con una fase circadiana más retrasada que caracteriza a los cenadores tardíos. A esas horas del desayuno, los valores de cortisol pueden no haber alcanzado todavía el pico de la mañana, en especial en niños de cronotipo tardío. En nuestra población, la ingesta del desayuno fue alrededor de las 09:00 (hh:mm), y probablemente esta ingesta ocurriría en una fase circadiana anterior a lo que los niños vespertinos desearían, es decir, todavía en su noche biológica, lo que también puede afectar a su metabolismo (198).

En cualquier caso, los valores más bajos de cortisol matutino en los cenadores tardíos (LDE; Late Dinner Eaters) que en los cenadores tempranos (EDE; Early Dinner Eaters) podrían estar relacionados con una disminución del apetito durante el desayuno (199), y pueden explicar en parte la disminución en la ingesta de energía en la mañana que caracteriza a los cenadores tardíos. Esta observación, en parte, podría explicar el IMC más alto del grupo de los LDE en comparación con los EDE ya que un desayuno deficiente o saltarse el desayuno se ha asociado con la obesidad tanto en adultos como en niños (200). La presencia de menores valores de cortisol puede influir en una disminución del apetito en la mañana temprana, y una cena tardía, podría también retrasar el ritmo circadiano del hambre y el apetito en relación con el reloj endógeno, lo que puede inducir por sí mismo la interrupción circadiana. La ingesta de alimentos se considera uno de los principales sincronizadores de los osciladores periféricos y la alimentación tardía puede provocar un desacoplamiento de estos relojes biológicos que inducen alteraciones metabólicas en los niños (20). De hecho, en la población actual, los LDE tuvieron un retraso en el aumento de la temperatura después de la cena, lo que puede ser indicativo de un retraso en los relojes periféricos (41). Además, los valores de temperatura más bajos en las horas postprandiales a la cena de los LDE en comparación con los EDE, pueden estar relacionados con una reducción en la termogénesis inducida

por dieta (DIT) y lo que podría estar involucrado en el mayor peso corporal que presentan los cenadores tardíos (201).

En resumen, gracias a este estudio demostramos que la cena tardía en niños se acompaña con alteraciones metabólicas, obesidad y valores más elevados de ciertos biomarcadores inflamatorios tales como la PCR e la IL6. Además, los cenadores tardíos presentaron mayores alteraciones circadianas que los niños que cenaban temprano.

## **6. Sobre la importancia del ritmo de actividad, la relación con la obesidad y alteraciones metabólicas en niños**

En la presente tesis doctoral se muestra que aquellos ritmos de actividad/reposo menos robustos, representados por una amplitud relativa más baja, una mayor variabilidad intradiaria y una puntuación del CFI más baja, se asociaron con un mayor IMC en niños de edad escolar, independientemente de los factores sociodemográficos. Si bien la asociación de la fragmentación o la variabilidad intradiaria (IV) con el IMC se atenuó ligeramente después del ajuste por la duración total del sueño, las asociaciones de muestran una disminución de la amplitud relativa y del CFI con el aumento de IMC persistieron independientemente del ajuste por la duración total del sueño y el grado de actividad física. Aunque no podemos determinar la direccionalidad de estas asociaciones, estos resultados sugieren que el ritmo de la actividad/reposo en sí mismo puede afectar a la regulación del peso corporal, independientemente de la duración del sueño y del grado de actividad física. Mientras que la alta fragmentación del ritmo de actividad puede conducir al aumento de peso, en parte por la pérdida de sueño.

Anteriormente se ha dado mucha importancia a la falta de ejercicio, como una de las causas de patologías tales como la obesidad, problemas cardiovasculares o cáncer (202). Sin embargo, actualmente se ha demostrado la importancia de una buena sincronización del ritmo de actividad/reposo y su asociación con problemas de salud (203). Por primera vez, en un subconjunto de niños con muestras de saliva, descubrimos que muchos aspectos del ritmo de actividad/reposo también se asociaron de forma

significativa con marcadores proinflamatorios relacionados con la obesidad, como la PCR. Es importante destacar que muchas de estas asociaciones se mantuvieron significativas después de ajustar por posibles factores de confusión como la duración del sueño, la actividad media y/o IMC, lo que indica que la robustez de los ritmos de actividad/reposo puede influir en la inflamación, independientemente de estos factores de riesgo tradicionales.

Existen evidencias que sugieren un vínculo entre la obesidad, la interrupción circadiana y los marcadores proinflamatorios. Estudios en adolescentes muestran que el ritmo de actividad/reposo está más fragmentado en adolescentes obesos y se correlaciona con un mayor riesgo metabólico (204). Además otro estudio observó que la inflamación crónica de bajo grado a causa del sedentarismo se caracteriza por una elevación cuatro veces mayor de los biomarcadores proinflamatorios circulantes (205). Sin embargo, ningún estudio previo ha examinado tales relaciones en niños. La escasez de investigaciones en este campo podría deberse en parte a la naturaleza invasiva y estresante mediante extracciones de sangre, que los padres y los niños califican como "extremadamente angustiante" (87). Como medida alternativa, se han propuesto métodos no invasivos como los biomarcadores salivales (206).

En adultos, existen un número creciente de estudios que relacionan la fuerza y la regularidad de los ritmos diarios de actividad con resultados referentes a la salud (74, 203). Sin embargo, en la población pediátrica, el estudio de la relación entre los ritmos de actividad/reposo y la salud, es un área emergente de investigación, por lo que pocos estudios son directamente comparables. Un reciente estudio transversal de Quante *et al.* examinó cuatro características del ritmo de actividad utilizando el método no paramétrico y descubrió que la amplitud relativa se asociaba negativamente con el IMC en adolescentes, independientemente de la duración del sueño y la actividad física (77). En nuestro estudio, también encontramos esta asociación. Además, incluimos el método paramétrico y no paramétrico para caracterizar la regularidad (estabilidad interdiaria) y la fragmentación (variabilidad intradiaria) del ritmo de actividad/reposo, generando así un estudio más completo. También ajustamos por la duración del sueño y la actividad física media, confirmando así la independencia de las asociaciones con datos más precisos y fiables.

Nuestros resultados van en la misma dirección que un estudio anterior en adolescentes que mostró que la variabilidad intradiaria se asocia positivamente con la obesidad (29). Hay que tener en cuenta que nuestro estudio se representa a una población pediátrica más joven (8-12 años) y no de adolescentes (11-17.5 años), como el anterior. Se ha sugerido que los adolescentes son especialmente susceptibles a la interrupción del ritmo actividad/reposo ya que experimentan una serie de cambios biológicos debido al desarrollo de un cronotipo más nocturno y a los cambios sufridos en su composición corporal. Nuestros resultados indican que ya en niños de una edad más temprana se puede presentar un ritmo de actividad debilitado con consecuencias metabólicas nocivas lo que indica la necesidad de comenzar las intervenciones de salud y cambio de horarios de actividad a edades más tempranas.

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que investiga la asociación entre las características del ritmo de actividad y los marcadores inflamatorios en la población pediátrica. En esta investigación, encontramos que una amplitud relativa más baja se asoció con valores más altos de PCR salival, independientemente de la duración del sueño, la actividad física diaria y/o el IMC. La PCR circulante es un marcador sensible de inflamación sistémica de bajo grado que ha demostrado ser un buen predictor del desarrollo de diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares en adultos aparentemente sanos (207, 208). Las concentraciones elevadas de PCR también se han asociado con elevada adiposidad y una menor aptitud aeróbica en niños (209). Dado que la PCR salival ha demostrado tener una correlación de moderada a fuerte con la PCR plasmática como hemos visto en el objetivo 2, se ha sugerido la saliva como un método alternativo no invasivo para evaluar la inflamación sistémica subclínica (170). Por lo tanto, aunque las asociaciones observadas no pueden determinar la causalidad, nuestros resultados indicaron que un ritmo actividad/reposo debilitado puede contribuir a una inflamación de bajo grado en los niños, lo que podría aumentar el riesgo del síndrome metabólico en la edad adulta.

Del mismo modo, encontramos que la IL-8 salival se asocia positivamente con una característica del ritmo de actividad que marca el centro del sueño y es la hora de TL5, independientemente de la duración del sueño, la actividad diaria y el IMC. TL5, se define como el punto medio del sueño, y se refiere al momento en el que hay menos actividad (la media de las 5 horas de menos actividad). Como TL5 proporciona una

indicación del centro del sueño, este resultado sugiere que un horario de sueño más tardío puede elevar las concentraciones de IL-8. Encontramos también una asociación entre la IL1 $\beta$  y TL5, por lo que un retraso en la hora de irse a la cama, y por tanto del centro del sueño, también puede aumentar los valores de IL1 $\beta$  en los niños. Sin embargo, esta asociación se atribuye en gran medida a la pérdida de sueño, ya que se pierde después de ajustar por la duración total del sueño.

También descubrimos que MCP-1, una quimiocina que desempeña un papel fundamental en el desarrollo de la aterosclerosis (210), se asoció negativamente con el mesor, la regularidad y la fragmentación de los ritmos de actividad en los niños, lo que probablemente estuvo mediado por el grado de actividad física diaria. Tal resultado concuerda con hallazgos previos que muestran que el aumento de la actividad física reduce las concentraciones de MCP-1 en humanos (211). En general, nuestros resultados revelaron que los diferentes parámetros de los ritmos de actividad/reposo se asociaron con marcadores proinflamatorios específicos en niños. Estas asociaciones pueden explicarse completamente tras el ajuste por la duración del sueño, la actividad física media y el IMC, lo que señala una contribución independiente de las características de los ritmos de actividad/descanso.

Los mecanismos subyacentes de la relación entre los ritmos de actividad y los marcadores del IMC/proinflamatorios no se comprenden completamente. Como se mencionó anteriormente, podría ser que los ritmos de actividad/reposo debilitados conduzcan a un aumento del IMC y de marcadores proinflamatorios. Esta posibilidad está respaldada por la literatura que demuestra que la interrupción circadiana en animales y en humanos da lugar a una desregulación del metabolismo energético y respuestas inflamatorias (93, 94) (212), (213).

En resumen, con esta tesis doctoral demostramos que alteraciones en el ritmo de actividad/reposo están asociados con el IMC y los marcadores proinflamatorios en la población infantil, independientemente de la duración del sueño y / o actividad media diaria. Estos resultados sugieren que los ritmos alterados de la actividad reflejan, hasta cierto punto, la interrupción circadiana, por lo que pueden usarse como una característica biológica para la mejora de la función circadiana.

## **7. Sobre la aplicación del score circadiano en la detección de enfermedades como la obesidad**

Uno de los propósitos de la presente tesis doctoral fue utilizar una nueva herramienta circadiana no invasiva que fuese capaz de detectar la relación de las alteraciones circadianas o cronodisrupción con la obesidad u otras patologías asociadas. Para ello utilizamos un score circadiano previamente elaborado en niños en el objetivo 1. Este score circadiano, tal y como se ha descrito anteriormente, integra datos de temperatura, actividad, posición y TAP, análisis de hormonas y consumo de alimentos y tiempo de sueño. Nuestros resultados muestran que este score es capaz de detectar la relación entre la cronodisrupción y la presencia de obesidad en niños en edad escolar. Los niños con una buena salud circadiana (score circadiano alto) presentan una menor probabilidad de ser obesos, de tener obesidad abdominal, de desarrollar alteraciones en el sueño que los niños con un score circadiano más bajo. Lo que puede deberse a sus peores horarios que también son captados por este score circadiano.

En estudios anteriores, las técnicas objetivas para evaluar la salud circadiana solían ser herramientas como la actimetría (214) y subjetivas como cuestionarios (215). Nuestro estudio propone este nuevo score circadiano como un instrumento que unifica todas las técnicas validadas anteriormente en el objetivo 1 en niños, basadas en los ritmos de temperatura, actividad, posición, variable integradora TAP, análisis de hormonas en saliva y horarios de comida y sueño para la detección de enfermedades como obesidad. Estos resultados están de acuerdo con la literatura previa que muestra la relación entre la baja salud circadiana con problemas de salud como obesidad (216) o alteraciones del sueño (217) en niños o en adultos (158).

Para atenuar el riesgo de desarrollar obesidad y mejorar la salud en general, se debería hacer hincapié en no sólo cuidar lo que ingiere el niño sino cuándo lo ingiere, cuándo hace deporte, cuándo duerme etc. Este trabajo demuestra la importancia de los horarios en la población infantil y propone algunas de las bases para seguir profundizando en el área de la cronobiología infantil en relación con la obesidad infantil.

En resumen, hemos comprobado que el score circadiano es capaz de detectar enfermedades tales como la obesidad. Además, confirmamos que alteraciones circadianas se asocian con un mayor grado de obesidad. La alta o baja salud circadiana presentada por el niño va a depender de factores como el sueño, horarios de comida y de actividad física, presencia o ausencia de obesidad, entre otros.



Hank Segal, 8 años, Altadena, CA, fotografiado el 30 de enero de 2016 rodeado de su alimentación habitual. Daily Bread, serie fotográfica de Gregg Segal.

Link: <https://www.greggsegal.com/P-Projects/Daily-Bread/22/thumbs>

## CONCLUSIONES



- 1.** Hemos desarrollado un nuevo score circadiano usando técnicas no invasivas, incluido la variable integradora TAP, que parece ser fiable para evaluar el sistema circadiano en niños en edad escolar bajo condiciones de vida normales. Los niños tenían una mejor función circadiana que los adultos. Además, las niñas parecen tener una función mejor circadiana que los niños.
- 2.** Confirmamos que los biomarcadores en la saliva muestran cambios relacionados con el IMC, la ingesta de alimentos y la actividad física en niños. Estos datos indican que el análisis de biomarcadores en la saliva puede potencialmente constituir una posible herramienta útil no invasiva y libre de estrés para evaluar el efecto de estos factores en estudios epidemiológicos en niños de una manera dependiente del sexo.
- 3.** Evidenciamos la necesaria comprensión del cronotipo y su relación con la cronodisrupción y el riesgo metabólico en niños de edad escolar. Los niños evaluados objetivamente con cronotipo vespertinos presentaron alteraciones del sueño, con un mayor jet lag social, mayor exposición a la luz nocturna, más obesidad, mayor riesgo metabólico y mejores calificaciones en arte. Para estos niños vespertinos, es aconsejable implementar intervenciones para reducir los hábitos nocturnos, mejorar el sueño y disminuir el jet lag social para así, disminuir el riesgo metabólico.
- 4.** Proporcionamos una visión circadiana y metabólica de la deletérea asociación con una cena tardía en niños en edad escolar. Según nuestros resultados, los niños que realizaron una cena tardía eran más obesos, tenían valores más elevados de biomarcadores inflamatorios como la PCR e IL6 y presentaban mayores alteraciones circadianas que los niños que cenaban temprano.
- 5.** Demostramos que alteraciones en el ritmo de actividad/descanso están asociadas con el IMC y los marcadores proinflamatorios en la población infantil, independientemente de la duración del sueño y / o la actividad media diaria.
- 6.** Afirmamos que el score circadiano es capaz de detectar enfermedades tales como la obesidad. La alta o baja salud circadiana en el niño va a depender de factores como el sueño, horarios de comida y de actividad física, presencia o ausencia de obesidad, entre otros.

## **Conclusión general**

Las herramientas circadianas no invasivas son necesarias para la evaluación de la salud circadiana en niños de edad escolar. Una exposición inadecuada a los sincronizadores del sistema circadiano conlleva al igual que en el adulto, al desarrollo de alteraciones metabólicas y circadianas en la población infantil. Horarios tardíos, cronotipos vespertinos, la corta duración del sueño, demuestran relación con la enfermedad.

La cronobiología juega un papel importante en el desarrollo de la obesidad infantil. La evaluación de la salud circadiana en niños es una herramienta útil prevenir diversas enfermedades tales como la obesidad. El desarrollo de score circadiano capaz de detectar la baja salud circadiana ayudará en la prevención de la obesidad. Para mejorar la salud circadiana, será necesario dirigir las recomendaciones hacia un patrón de sueño regular con una duración del sueño suficiente, estimular una actividad diurna vigorosa y tener un patrón fijo en cuando a los horarios de comidas y actividad física. Estos avances en las herramientas circadianas y en la comprensión de aspectos relacionados con la obesidad infantil, esperamos que pronto puedan ser incluidos en el diagnóstico clínico y en el tratamiento de la enfermedad.



Leona "Nona" Del Grosso Sands, 6 años, Glendale, CA, fotografiada el 30 de enero de 2016, rodeada de su alimentación habitual. Daily Bread, serie fotográfica de Gregg Segal. Link: <https://www.greggsegal.com/P-Projects/Daily-Bread/22/thumbs>

## **BIBLIOGRAFÍA**



1. Gomez-Abellan P, Madrid JA, Ordoñas JM, Garaulet M. [Chronobiological aspects of obesity and metabolic syndrome]. *Endocrinología y nutrición : organo de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición*. 2012;59(1):50-61.
2. Garaulet M, Gomez-Abellan P. Chronobiology and obesity. *Nutrición hospitalaria : organo oficial de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral*. 2013;28 Suppl 5:114-20.
3. Martin C. Moore-Ede FMS, Charles A. Fuller. *The Clocks That Time Us: Physiology of the Circadian Timing System* 1984.
4. Botanique. JDO. *Historire de L'Academie Royale des Sciences*, France. 1972:35-6.
5. Pittendrigh CS. Circadian systems. I. The driving oscillation and its assay in *Drosophila pseudoobscura*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1967;58(4):1762-7.
6. Dauvilliers Y. [First Nobel Prize for chronobiology]. *La Revue du praticien*. 2018;68(1):27-30.
7. Sletten TL, Cappuccio FP, Davidson AJ, Van Cauter E, Rajaratnam SMW, Scheer F. Health consequences of circadian disruption. *Sleep*. 2020;43(1).
8. Lopez-Minguez J, Ordonana JR, Sanchez-Romera JF, Madrid JA, Garaulet M. Circadian system heritability as assessed by wrist temperature: a twin study. *Chronobiology international*. 2015;32(1):71-80.
9. Dibner C, Schibler U, Albrecht U. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annual review of physiology*. 2010;72:517-49.
10. Garaulet M, Madrid JA. Chronobiology, genetics and metabolic syndrome. *Current opinion in lipidology*. 2009;20(2):127-34.
11. Qian J, Scheer F. Circadian System and Glucose Metabolism: Implications for Physiology and Disease. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2016;27(5):282-93.
12. Kohsaka A, Bass J. A sense of time: how molecular clocks organize metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2007;18(1):4-11.
13. Garaulet M MJ. Chronobiology: Influences on Metabolic Syndrome and Cardiovascular Risk. *Current Cardiovascular Risk Reports* 2010;volume 4, :pages15–23.
14. Gomez-Santos C, Gomez-Abellan P, Madrid JA, Hernandez-Morante JJ, Lujan JA, Ordoñas JM, et al. Circadian rhythm of clock genes in human adipose explants. *Obesity (Silver Spring)*. 2009;17(8):1481-5.
15. Partch CL, Green CB, Takahashi JS. Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends in cell biology*. 2014;24(2):90-9.
16. Albrecht U, Eichele G. The mammalian circadian clock. *Current opinion in genetics & development*. 2003;13(3):271-7.
17. Roenneberg T, Kuehnle T, Juda M, Kantermann T, Allebrandt K, Gordijn M, et al. Epidemiology of the human circadian clock. *Sleep medicine reviews*. 2007;11(6):429-38.
18. Lara T, Madrid JA, Correa A. The vigilance decrement in executive function is attenuated when individual chronotypes perform at their optimal time of day. *PloS one*. 2014;9(2):e88820.
19. Knutson KL, von Schantz M. Associations between chronotype, morbidity and mortality in the UK Biobank cohort. *Chronobiology international*. 2018;35(8):1045-53.
20. Koren D, Dumin M, Gozal D. Role of sleep quality in the metabolic syndrome. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy*. 2016;9:281-310.

21. Randler C, Engelke J. Gender differences in chronotype diminish with age: a meta-analysis based on morningness/chronotype questionnaires. *Chronobiology international*. 2019;36(7):888-905.
22. Santisteban JA, Brown TG, Gruber R. Association between the Munich Chronotype Questionnaire and Wrist Actigraphy. *Sleep disorders*. 2018;2018:5646848.
23. Terman JS, Terman M, Lo ES, Cooper TB. Circadian time of morning light administration and therapeutic response in winter depression. *Archives of general psychiatry*. 2001;58(1):69-75.
24. Levandovski R, Sasso E, Hidalgo MP. Chronotype: a review of the advances, limits and applicability of the main instruments used in the literature to assess human phenotype. *Trends in psychiatry and psychotherapy*. 2013;35(1):3-11.
25. Phillips AJK, Clerx WM, O'Brien CS, Sano A, Barger LK, Picard RW, et al. Irregular sleep/wake patterns are associated with poorer academic performance and delayed circadian and sleep/wake timing. *Scientific reports*. 2017;7(1):3216.
26. Pandi-Perumal SR, Smits M, Spence W, Srinivasan V, Cardinali DP, Lowe AD, et al. Dim light melatonin onset (DLMO): a tool for the analysis of circadian phase in human sleep and chronobiological disorders. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2007;31(1):1-11.
27. Kantermann T, Sung H, Burgess HJ. Comparing the Morningness-Eveningness Questionnaire and Munich ChronoType Questionnaire to the Dim Light Melatonin Onset. *J Biol Rhythms*. 2015;30(5):449-53.
28. Nunes DM, Goncalves BSB, Tardelli Peixoto CA, De Bruin VMS, Louzada FM, De Bruin PFC. Circadian rest-activity rhythm in chronic obstructive pulmonary disease. *Chronobiology international*. 2017;34(9):1315-9.
29. Garaulet M, Martinez-Nicolas A, Ruiz JR, Konstabel K, Labayen I, Gonzalez-Gross M, et al. Fragmentation of daily rhythms associates with obesity and cardiorespiratory fitness in adolescents: The HELENA study. *Clin Nutr*. 2017;36(6):1558-66.
30. Martoni M, Carissimi A, Fabbri M, Filardi M, Tonetti L, Natale V. 24-h actigraphic monitoring of motor activity, sleeping and eating behaviors in underweight, normal weight, overweight and obese children. *Eating and weight disorders : EWD*. 2016;21(4):669-77.
31. Van Someren EJ, Swaab DF, Colenda CC, Cohen W, McCall WV, Rosenquist PB. Bright light therapy: improved sensitivity to its effects on rest-activity rhythms in Alzheimer patients by application of nonparametric methods. *Chronobiology international*. 1999;16(4):505-18.
32. Calogiuri G, Weydahl A, Carandente F. Methodological issues for studying the rest-activity cycle and sleep disturbances: a chronobiological approach using actigraphy data. *Biological research for nursing*. 2013;15(1):5-12.
33. Martinez-Nicolas A, Ortiz-Tudela E, Rol MA, Madrid JA. Uncovering different masking factors on wrist skin temperature rhythm in free-living subjects. *PloS one*. 2013;8(4):e61142.
34. Bongers C, Hopman MTE, Eijsvogels TMH. Validity and reliability of the myTemp ingestible temperature capsule. *J Sci Med Sport*. 2018;21(3):322-6.
35. Edwards B, Waterhouse J, Reilly T, Atkinson G. A comparison of the suitabilities of rectal, gut, and insulated axilla temperatures for measurement of the circadian rhythm of core temperature in field studies. *Chronobiology international*. 2002;19(3):579-97.
36. Rodriguez-Morilla B, Estivill E, Estivill-Domenech C, Albares J, Segarra F, Correa A, et al. Application of Machine Learning Methods to Ambulatory Circadian

Monitoring (ACM) for Discriminating Sleep and Circadian Disorders. *Frontiers in neuroscience*. 2019;13:1318.

37. Abe N, Kodama H. Distal-proximal skin temperature gradient prior to sleep onset in infants for clinical use. *Pediatr Int*. 2015;57(2):227-33.

38. 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;14(4):260-74.

39. Sarabia JA, Rol MA, Mendiola P, Madrid JA. Circadian rhythm of wrist temperature in normal-living subjects A candidate of new index of the circadian system. *Physiology & behavior*. 2008;95(4):570-80.

40. Pronina TS, Orlova NI, Rybakov VP. [Circadian rhythm of skin temperature of children during puberty]. *Fiziologiya cheloveka*. 2015;41(2):74-84.

41. Pronina TS, Rybakov BP. [Features of the circadian rhythm of temperature of the skin at children of 8-9 years and young men and girls]. *Fiziologiya cheloveka*. 2011;37(4):98-104.

42. Ortiz-Tudela E, Martinez-Nicolas A, Campos M, Rol MA, Madrid JA. A new integrated variable based on thermometry, actimetry and body position (TAP) to evaluate circadian system status in humans. *PLoS Comput Biol*. 2010;6(11):e1000996.

43. Ancoli-Israel S, Cole R, Alessi C, Chambers M, Moorcroft W, Pollak CP. The role of actigraphy in the study of sleep and circadian rhythms. *Sleep*. 2003;26(3):342-92.

44. Madrid-Navarro CJ, Escamilla-Sevilla F, Minguéz-Castellanos A, Campos M, Ruiz-Abellan F, Madrid JA, et al. Multidimensional Circadian Monitoring by Wearable Biosensors in Parkinson's Disease. *Frontiers in neurology*. 2018;9:157.

45. Krauchi K, Cajochen C, Werth E, Wirz-Justice A. Functional link between distal vasodilation and sleep-onset latency? *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2000;278(3):R741-8.

46. Madrid-Navarro CJ, Puertas Cuesta FJ, Escamilla-Sevilla F, Campos M, Ruiz Abellan F, Rol MA, et al. Validation of a Device for the Ambulatory Monitoring of Sleep Patterns: A Pilot Study on Parkinson's Disease. *Frontiers in neurology*. 2019;10:356.

47. Lopez-Minguéz J, Colodro-Conde L, Bandin C, Ordonana JR, Garaulet M, Madrid JA. Application of multiparametric procedures for assessing the heritability of circadian health. *Chronobiology international*. 2016;33(2):234-44.

48. Ortiz-Tudela E, Martinez-Nicolas A, Albares J, Segarra F, Campos M, Estivill E, et al. Ambulatory circadian monitoring (ACM) based on thermometry, motor activity and body position (TAP): a comparison with polysomnography. *Physiology & behavior*. 2014;126:30-8.

49. Bagenyi J. [Prevention and treatment of postoperative lung complications]. *Fogorvosi szemle*. 1976;69(11):321-4.

50. Bandin C, Scheer FA, Luque AJ, Avila-Gandia V, Zamora S, Madrid JA, et al. Meal timing affects glucose tolerance, substrate oxidation and circadian-related variables: A randomized, crossover trial. *Int J Obes (Lond)*. 2015;39(5):828-33.

51. Scheer FA, Buijs RM. Light affects morning salivary cortisol in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1999;84(9):3395-8.

52. Garcia-Prieto MD, Tebar FJ, Nicolas F, Larque 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. *Clinical endocrinology*. 2007;66(2):185-91.

53. Dockray S, Steptoe A. Chronotype and diurnal cortisol profile in working women: differences between work and leisure days. *Psychoneuroendocrinology*. 2011;36(5):649-55.
54. Weidenauer C, Vollmer C, Scheiter K, Randler C. Weak Associations of Morningness-Eveningness and Stability with Skin Temperature and Cortisol Levels. *Journal of circadian rhythms*. 2019;17:8.
55. Lucassen EA, Zhao X, Rother KI, Mattingly MS, Courville AB, de Jonge L, et al. Evening chronotype is associated with changes in eating behavior, more sleep apnea, and increased stress hormones in short sleeping obese individuals. *PloS one*. 2013;8(3):e56519.
56. Touitou Y, Reinberg A, Touitou D. Association between light at night, melatonin secretion, sleep deprivation, and the internal clock: Health impacts and mechanisms of circadian disruption. *Life sciences*. 2017;173:94-106.
57. Shilo L, Sabbah H, Hadari R, Kovatz S, Weinberg U, Dolev S, et al. The effects of coffee consumption on sleep and melatonin secretion. *Sleep medicine*. 2002;3(3):271-3.
58. Cardinali DP, Pevet P. Basic aspects of melatonin action. *Sleep medicine reviews*. 1998;2(3):175-90.
59. Dijk DJ, Cajochen C. Melatonin and the circadian regulation of sleep initiation, consolidation, structure, and the sleep EEG. *J Biol Rhythms*. 1997;12(6):627-35.
60. Razavi P, Devore EE, Bajaj A, Lockley SW, Figueiro MG, Ricchiuti V, et al. Shift Work, Chronotype, and Melatonin Rhythm in Nurses. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2019;28(7):1177-86.
61. Simon SL, Diniz Behn C, Laikin A, Kaar JL, Rahat H, Cree-Green M, et al. Sleep & Circadian Health are Associated with Mood & Behavior in Adolescents with Overweight/Obesity. *Behavioral sleep medicine*. 2019:1-10.
62. Akacem LD, Wright KP, Jr., LeBourgeois MK. Sensitivity of the circadian system to evening bright light in preschool-age children. *Physiological reports*. 2018;6(5).
63. Arble DM, Bass J, Laposky AD, Vitaterna MH, Turek FW. Circadian timing of food intake contributes to weight gain. *Obesity (Silver Spring)*. 2009;17(11):2100-2.
64. Xiao Q, Garaulet M, Scheer F. Meal timing and obesity: interactions with macronutrient intake and chronotype. *Int J Obes (Lond)*. 2019;43(9):1701-11.
65. McHill AW, Phillips AJ, Czeisler CA, Keating L, Yee K, Barger LK, et al. Later circadian timing of food intake is associated with increased body fat. *The American journal of clinical nutrition*. 2017;106(5):1213-9.
66. Nakajima K, Suwa K. Association of hyperglycemia in a general Japanese population with late-night-dinner eating alone, but not breakfast skipping alone. *Journal of diabetes and metabolic disorders*. 2015;14:16.
67. Lopez-Minguez J, Saxena R, Bandin C, Scheer FA, Garaulet M. Late dinner impairs glucose tolerance in MTNR1B risk allele carriers: A randomized, cross-over study. *Clin Nutr*. 2018;37(4):1133-40.
68. Lopes T, Borba ME, Lopes R, Fisberg RM, Lemos Paim S, Vasconcelos Teodoro V, et al. Eating Late Negatively Affects Sleep Pattern and Apnea Severity in Individuals With Sleep Apnea. *Journal of clinical sleep medicine : JCSM : official publication of the American Academy of Sleep Medicine*. 2019;15(3):383-92.

69. Yoncheva YN, Castellanos FX, Pizinger T, Kovtun K, St-Onge MP. Sleep and meal-time misalignment alters functional connectivity: a pilot resting-state study. *Int J Obes (Lond)*. 2016;40(11):1813-6.
70. Garaulet M, Gomez-Abellan P, Albuquerque-Bejar JJ, Lee YC, Ordovas JM, Scheer FA. Timing of food intake predicts weight loss effectiveness. *Int J Obes (Lond)*. 2013;37(4):604-11.
71. Lopez-Minguez J, Gomez-Abellan P, Garaulet M. Timing of Breakfast, Lunch, and Dinner. Effects on Obesity and Metabolic Risk. *Nutrients*. 2019;11(11).
72. Rubio-Sastre P, Gomez-Abellan P, Martinez-Nicolas A, Ordovas JM, Madrid JA, Garaulet M. Evening physical activity alters wrist temperature circadian rhythmicity. *Chronobiology international*. 2014;31(2):276-82.
73. Rogers-Soeder TS, Blackwell T, Yaffe K, Ancoli-Israel S, Redline S, Cauley JA, et al. Rest-Activity Rhythms and Cognitive Decline in Older Men: The Osteoporotic Fractures in Men Sleep Study. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2018;66(11):2136-43.
74. Chang WP, Smith R, Lin CC. Age and rest-activity rhythm as predictors of survival in patients with newly diagnosed lung cancer. *Chronobiology international*. 2018;35(2):188-97.
75. Christman MF, Dietrich FS, Fink GR. Mitotic recombination in the rDNA of *S. cerevisiae* is suppressed by the combined action of DNA topoisomerases I and II. *Cell*. 1988;55(3):413-25.
76. Hooghiemstra AM, Eggermont LH, Scheltens P, van der Flier WM, Scherder EJ. The rest-activity rhythm and physical activity in early-onset dementia. *Alzheimer disease and associated disorders*. 2015;29(1):45-9.
77. Quante M, Cespedes Feliciano EM, Rifas-Shiman SL, Mariani S, Kaplan ER, Rueschman M, et al. Association of Daily Rest-Activity Patterns With Adiposity and Cardiometabolic Risk Measures in Teens. *The Journal of adolescent health : official publication of the Society for Adolescent Medicine*. 2019;65(2):224-31.
78. Duffy JF, Kronauer RE, Czeisler CA. Phase-shifting human circadian rhythms: influence of sleep timing, social contact and light exposure. *The Journal of physiology*. 1996;495 ( Pt 1):289-97.
79. Lee SI, Matsumori K, Nishimura K, Nishimura Y, Ikeda Y, Eto T, et al. Melatonin suppression and sleepiness in children exposed to blue-enriched white LED lighting at night. *Physiological reports*. 2018;6(24):e13942.
80. Ueda R, Takeichi H, Kaga Y, Oguri M, Saito Y, Nakagawa E, et al. Atypical gamma functional connectivity pattern during light sleep in children with attention deficit hyperactivity disorder. *Brain & development*. 2020;42(2):129-39.
81. Abbott SM, Zee PC. Irregular Sleep-Wake Rhythm Disorder. *Sleep Med Clin*. 2015;10(4):517-22.
82. Light JC, Drager KD. Improving the design of augmentative and alternative technologies for young children. *Assistive technology : the official journal of RESNA*. 2002;14(1):17-32.
83. Saxvig IW, Wilhelmsen-Langeland A, Pallesen S, Vedaa O, Nordhus IH, Bjorvatn B. A randomized controlled trial with bright light and melatonin for delayed sleep phase disorder: effects on subjective and objective sleep. *Chronobiology international*. 2014;31(1):72-86.
84. Geerdink M, Walbeek TJ, Beersma DG, Hommes V, Gordijn MC. Short Blue Light Pulses (30 Min) in the Morning Support a Sleep-Advancing Protocol in a Home Setting. *J Biol Rhythms*. 2016;31(5):483-97.

85. Erren TC, Reiter RJ. Defining chronodisruption. *Journal of pineal research*. 2009;46(3):245-7.
86. Evans JA, Davidson AJ. Health consequences of circadian disruption in humans and animal models. *Progress in molecular biology and translational science*. 2013;119:283-323.
87. Hands C, Round J, Thomas J. Evaluating venepuncture practice on a general children's ward. *Paediatric nursing*. 2010;22(2):32-5.
88. Crowley SJ, Cain SW, Burns AC, Acebo C, Carskadon MA. Increased Sensitivity of the Circadian System to Light in Early/Mid-Puberty. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2015;100(11):4067-73.
89. LeBourgeois MK, Hale L, Chang AM, Akacem LD, Montgomery-Downs HE, Buxton OM. Digital Media and Sleep in Childhood and Adolescence. *Pediatrics*. 2017;140(Suppl 2):S92-S6.
90. Sun M, Feng W, Wang F, Li P, Li Z, Li M, et al. Meta-analysis on shift work and risks of specific obesity types. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2018;19(1):28-40.
91. Roenneberg T, Allebrandt KV, Merrow M, Vetter C. Social jetlag and obesity. *Current biology : CB*. 2012;22(10):939-43.
92. Shan Z, Li Y, Zong G, Guo Y, Li J, Manson JE, et al. Rotating night shift work and adherence to unhealthy lifestyle in predicting risk of type 2 diabetes: results from two large US cohorts of female nurses. *BMJ (Clinical research ed)*. 2018;363:k4641.
93. McHill AW, Melanson EL, Higgins J, Connick E, Moehlman TM, Stothard ER, et al. Impact of circadian misalignment on energy metabolism during simulated nightshift work. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(48):17302-7.
94. Qian J, Morris CJ, Caputo R, Wang W, Garaulet M, Scheer F. Sex differences in the circadian misalignment effects on energy regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(47):23806-12.
95. Broussard JL, Van Cauter E. Disturbances of sleep and circadian rhythms: novel risk factors for obesity. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*. 2016;23(5):353-9.
96. Paul GR, Pinto S. Sleep and the Cardiovascular System in Children. *Sleep Med Clin*. 2017;12(2):179-91.
97. Fobian AD, Elliott L, Louie T. A Systematic Review of Sleep, Hypertension, and Cardiovascular Risk in Children and Adolescents. *Current hypertension reports*. 2018;20(5):42.
98. Li L, Zhang S, Huang Y, Chen K. Sleep duration and obesity in children: A systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Journal of paediatrics and child health*. 2017;53(4):378-85.
99. Ogilvie RP, Patel SR. The epidemiology of sleep and obesity. *Sleep Health*. 2017;3(5):383-8.
100. Sayin FK, Buyukinan M. Sleep Duration and Media Time Have a Major Impact on Insulin Resistance and Metabolic Risk Factors in Obese Children and Adolescents. *Child Obes*. 2016;12(4):272-8.
101. Jansen EC, Dunietz GL, Felt BT, O'Brien LM. Sleep and Gastrointestinal Symptoms in a Community-Based Survey of Children. *Clinical pediatrics*. 2018;57(13):1515-22.
102. Fatima Y, Doi SA, Mamun AA. Sleep quality and obesity in young subjects: a meta-analysis. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2016;17(11):1154-66.

103. Borisenkov MF, Petrova NB, Timonin VD, Fradkova LI, Kolomeichuk SN, Kosova AL, et al. Sleep characteristics, chronotype and winter depression in 10-20-year-olds in northern European Russia. *Journal of sleep research*. 2015;24(3):288-95.
104. Haraszti RA, Ella K, Gyongyosi N, Roenneberg T, Kaldi K. Social jetlag negatively correlates with academic performance in undergraduates. *Chronobiology international*. 2014;31(5):603-12.
105. Parsons MJ, Moffitt TE, Gregory AM, Goldman-Mellor S, Nolan PM, Poulton R, et al. Social jetlag, obesity and metabolic disorder: investigation in a cohort study. *Int J Obes (Lond)*. 2015;39(5):842-8.
106. Stoner L, Castro N, Signal L, Skidmore P, Faulkner J, Lark S, et al. Sleep and Adiposity in Preadolescent Children: The Importance of Social Jetlag. *Child Obes*. 2018;14(3):158-64.
107. Rybnikova NA, Haim A, Portnov BA. Does artificial light-at-night exposure contribute to the worldwide obesity pandemic? *Int J Obes (Lond)*. 2016;40(5):815-23.
108. Stevens RG. Light-at-night, circadian disruption and breast cancer: assessment of existing evidence. *International journal of epidemiology*. 2009;38(4):963-70.
109. Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A, Ma S. Obesity and metabolic syndrome: association with chronodisruption, sleep deprivation, and melatonin suppression. *Annals of medicine*. 2012;44(6):564-77.
110. Owens J, Maxim R, McGuinn M, Nobile C, Msall M, Alario A. Television-viewing habits and sleep disturbance in school children. *Pediatrics*. 1999;104(3):e27.
111. Cain N, Gradisar M. Electronic media use and sleep in school-aged children and adolescents: A review. *Sleep medicine*. 2010;11(8):735-42.
112. 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(5724):1043-5.
113. Hills AP, Andersen LB, Byrne NM. Physical activity and obesity in children. *Br J Sports Med*. 2011;45(11):866-70.
114. Williams EP, Mesidor M, Winters K, Dubbert PM, Wyatt SB. Overweight and Obesity: Prevalence, Consequences, and Causes of a Growing Public Health Problem. *Current obesity reports*. 2015;4(3):363-70.
115. Federatio WO. Global Atlas on Childhood Obesity: <https://www.worldobesity.org/>; 2019 [Available from: <https://www.worldobesity.org/>].
116. Lopez KN, Knudson JD. Obesity: from the agricultural revolution to the contemporary pediatric epidemic. *Congenital heart disease*. 2012;7(2):189-99.
117. Cao H, Yan SQ, Tao FB. [Early adiposity rebound: prevalence and the effect on metabolic risk in children]. *Zhonghua yu fang yi xue za zhi [Chinese journal of preventive medicine]*. 2017;51(9):861-4.
118. MacDermott RP, Bertovich MJ, Bragdon MJ, Nash GS, Leusch MS, Wedner HJ. Inhibition of cell-mediated cytotoxicity by 2-cyclohexene-1-one: evidence for a role for glutathione and/or glutathione-protein interactions in cytotoxicity. *Immunology*. 1986;57(4):521-6.
119. Reijnen MJ, Sladek FM, Bertina RM, Reitsma PH. Disruption of a binding site for hepatocyte nuclear factor 4 results in hemophilia B Leyden. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(14):6300-3.
120. Corbalan-Tutau D, Madrid JA, Nicolas F, Garaulet M. Daily profile in two circadian markers "melatonin and cortisol" and associations with metabolic syndrome components. *Physiology & behavior*. 2014;123:231-5.
121. Loef B, Baarle DV, van der Beek AJ, Beekhof PK, van Kerkhof LW, Proper KI. The association between exposure to different aspects of shift work and metabolic risk

- factors in health care workers, and the role of chronotype. *PloS one*. 2019;14(2):e0211557.
122. Morris CJ, Purvis TE, Mistretta J, Hu K, Scheer F. Circadian Misalignment Increases C-Reactive Protein and Blood Pressure in Chronic Shift Workers. *J Biol Rhythms*. 2017;32(2):154-64.
123. Cuevas-Cordoba B, Santiago-Garcia J. Saliva: a fluid of study for OMICS. *Omics : a journal of integrative biology*. 2014;18(2):87-97.
124. Pirsean C, Negut C, Stefan-van Staden RI, Dinu-Pirvu CE, Armean P, Udeanu DI. The salivary levels of leptin and interleukin-6 as potential inflammatory markers in children obesity. *PloS one*. 2019;14(1):e0210288.
125. Gao X, Jiang S, Koh D, Hsu CY. Salivary biomarkers for dental caries. *Periodontology 2000*. 2016;70(1):128-41.
126. Goodson JM, Kantarci A, Hartman ML, Denis GV, Stephens D, Hasturk H, et al. Metabolic disease risk in children by salivary biomarker analysis. *PloS one*. 2014;9(6):e98799.
127. Hartman ML, Goodson JM, Barake R, Alsmadi O, Al-Mutawa S, Ariga J, et al. Salivary Biomarkers in Pediatric Metabolic Disease Research. *Pediatric endocrinology reviews : PER*. 2016;13(3):602-11.
128. Rodrigues L, Espanca R, Costa AR, Antunes CM, Pomar C, Capela-Silva F, et al. Comparison of salivary proteome of children with different sensitivities for bitter and sweet tastes: association with body mass index. *Int J Obes (Lond)*. 2019;43(4):701-12.
129. Mirmiran M, Maas YG, Ariagno RL. Development of fetal and neonatal sleep and circadian rhythms. *Sleep medicine reviews*. 2003;7(4):321-34.
130. Rivkees SA. Developing circadian rhythmicity in infants. *Pediatric endocrinology reviews : PER*. 2003;1(1):38-45.
131. McGraw K, Hoffmann R, Harker C, Herman JH. The development of circadian rhythms in a human infant. *Sleep*. 1999;22(3):303-10.
132. Jafar NK, Tham EK, Eng DZ, Goh DY, Teoh OH, Lee YS, et al. The association between chronotype and sleep problems in preschool children. *Sleep medicine*. 2017;30:240-4.
133. Kuula L, Pesonen AK, Merikanto I, Gradisar M, Lahti J, Heinonen K, et al. Development of Late Circadian Preference: Sleep Timing From Childhood to Late Adolescence. *The Journal of pediatrics*. 2018;194:182-9 e1.
134. Carissimi A, Martins AC, Dresch F, da Silva LC, Zeni CP, Hidalgo MP. School start time influences melatonin and cortisol levels in children and adolescents - a community-based study. *Chronobiology international*. 2016;33(10):1400-9.
135. Jafar NK, Tham EK, Eng DZ, Goh DY, Teoh OH, Lee YS, et al. The association between chronotype and sleep problems in preschool children. *Sleep medicine*. 2017;30:240-4.
136. Zerbini G, van der Vinne V, Otto LKM, Kantermann T, Krijnen WP, Roenneberg T, et al. Lower school performance in late chronotypes: underlying factors and mechanisms. *Scientific reports*. 2017;7(1):4385.
137. Simor P, Polner B. Differential influence of asynchrony in early and late chronotypes on convergent thinking. *Chronobiology international*. 2017;34(1):118-28.
138. McMahon DM, Burch JB, Youngstedt SD, Wirth MD, Hardin JW, Hurley TG, et al. Relationships between chronotype, social jetlag, sleep, obesity and blood pressure in healthy young adults. *Chronobiology international*. 2019;36(4):493-509.
139. Tsai SY, Lee WT, Lee CC, Jeng SF, Weng WC. Agreement Between Actigraphy and Diary-Recorded Measures of Sleep in Children With Epilepsy. *J Nurs Scholarsh*. 2018;50(2):143-50.

140. Arora T, Taheri S. Associations among late chronotype, body mass index and dietary behaviors in young adolescents. *Int J Obes (Lond)*. 2015;39(1):39-44.
141. Byrne ML, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC, Walsh KA, Laughton K, Waloszek JM, et al. Acute phase protein and cytokine levels in serum and saliva: a comparison of detectable levels and correlations in a depressed and healthy adolescent sample. *Brain, behavior, and immunity*. 2013;34:164-75.
142. Zornoza-Moreno M, Fuentes-Hernandez S, Sanchez-Solis M, Rol MA, Larque E, Madrid JA. Assessment of circadian rhythms of both skin temperature and motor activity in infants during the first 6 months of life. *Chronobiology international*. 2011;28(4):330-7.
143. Carpenter JS, Robillard R, Hermens DF, Naismith SL, Gordon C, Scott EM, et al. Sleep-wake profiles and circadian rhythms of core temperature and melatonin in young people with affective disorders. *J Psychiatr Res*. 2017;94:131-8.
144. McCabe SM, Elliott C, Langdon K, Abbiss CR. Patterns and reliability of children's skin temperature prior to and during sleep in the home setting. *Physiology & behavior*. 2018;194:292-301.
145. Checa-Ros A, Munoz-Hoyos A, Molina-Carballo A, Munoz-Gallego A, Narbona-Galdo S, Jerez-Calero A, et al. Analysis of Different Melatonin Secretion Patterns in Children With Sleep Disorders: Melatonin Secretion Patterns in Children. *Journal of child neurology*. 2017;32(12):1000-8.
146. Simpkin CT, Jenni OG, Carskadon MA, Wright KP, Jr., Akacem LD, Garlo KG, et al. Chronotype is associated with the timing of the circadian clock and sleep in toddlers. *Journal of sleep research*. 2014;23(4):397-405.
147. Simons SS, Cillessen AH, de Weerth C. Associations between circadian and stress response cortisol in children. *Stress*. 2017;20(1):52-8.
148. Kjolhede EA, Gustafsson PE, Gustafsson PA, Nelson N. Overweight and obese children have lower cortisol levels than normal weight children. *Acta Paediatr*. 2014;103(3):295-9.
149. Eng S, Wagstaff DA, Kranz S. Eating late in the evening is associated with childhood obesity in some age groups but not in all children: the relationship between time of consumption and body weight status in U.S. children. *The international journal of behavioral nutrition and physical activity*. 2009;6:27.
150. Coulthard JD, Pot GK. The timing of the evening meal: how is this associated with weight status in UK children? *The British journal of nutrition*. 2016;115(9):1616-22.
151. Ruperez AI, Olza J, Gil-Campos M, Leis R, Bueno G, Aguilera CM, et al. Cardiovascular risk biomarkers and metabolically unhealthy status in prepubertal children: Comparison of definitions. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2018;28(5):524-30.
152. Lopez-Alcaraz F, Del Toro-Equihua M, Orta-Duarte M, Flores-Ruelas Y, Sanchez-Ramirez CA. Higher levels of C-reactive protein associated with higher adiposity in mexican schoolchildren. *Nutricion hospitalaria*. 2014;29(3):531-6.
153. Olza J, Aguilera CM, Gil-Campos M, Leis R, Bueno G, Valle M, et al. Waist-to-height ratio, inflammation and CVD risk in obese children. *Public Health Nutr*. 2014;17(10):2378-85.
154. Marti A, Morell-Azanza L, Rendo-Urteaga T, Garcia-Calzon S, Ojeda-Rodriguez A, Martin-Calvo N, et al. Serum and gene expression levels of CT-1, IL-6, and TNF-alpha after a lifestyle intervention in obese children. *Pediatric diabetes*. 2018;19(2):217-22.
155. I PK, MacLeish M, Mondejar M, Sarabia J, et al. . Teaching chronobiology and sleep habits in school and university. *Mind, Brain Educ*

2008;;2(1):34e47.

156. Garaulet M, Madrid JA. Methods for monitoring the functional status of the circadian system in dietary surveys studies: application criteria and interpretation of results. *Nutricion hospitalaria : organo oficial de la Sociedad Espanola de Nutricion Parenteral y Enteral*. 2015;31 Suppl 3:279-89.

157. Kirschbaum C, Hellhammer DH. Salivary cortisol in psychoneuroendocrine research: recent developments and applications. *Psychoneuroendocrinology*. 1994;19(4):313-33.

158. Corbalan-Tutau MD, Gomez-Abellan P, Madrid JA, Canteras M, Ordovas JM, Garaulet M. Toward a chronobiological characterization of obesity and metabolic syndrome in clinical practice. *Clin Nutr*. 2015;34(3):477-83.

159. Salgado AL, Carvalho L, Oliveira AC, Santos VN, Vieira JG, Parise ER. Insulin resistance index (HOMA-IR) in the differentiation of patients with non-alcoholic fatty liver disease and healthy individuals. *Arquivos de gastroenterologia*. 2010;47(2):165-9.

160. Decaux G, Unger J, Marneffe C. Psychosis, central hyperventilation and inappropriate secretion of antidiuretic hormone in systemic lupus erythematosus. *Postgraduate medical journal*. 1981;57(673):719-20.

161. Cole TJ, Flegal KM, Nicholls D, Jackson AA. Body mass index cut offs to define thinness in children and adolescents: international survey. *BMJ (Clinical research ed)*. 2007;335(7612):194.

162. Pathan M, Keerthikumar S, Chisanga D, Alessandro R, Ang CS, Askenase P, et al. A novel community driven software for functional enrichment analysis of extracellular vesicles data. *Journal of extracellular vesicles*. 2017;6(1):1321455.

163. Batinga H, Martinez-Nicolas A, Zornoza-Moreno M, Sanchez-Solis M, Larque E, Mondejar MT, et al. Ontogeny and aging of the distal skin temperature rhythm in humans. *Age (Dordr)*. 2015;37(2):29.

164. Larsson CA, Gullberg B, Rastam L, Lindblad U. Salivary cortisol differs with age and sex and shows inverse associations with WHR in Swedish women: a cross-sectional study. *BMC endocrine disorders*. 2009;9:16.

165. Luik AI, Zuurbier LA, Hofman A, Van Someren EJ, Tiemeier H. Stability and fragmentation of the activity rhythm across the sleep-wake cycle: the importance of age, lifestyle, and mental health. *Chronobiology international*. 2013;30(10):1223-30.

166. Tonetti L, Fabbri M, Natale V. Sex difference in sleep-time preference and sleep need: a cross-sectional survey among Italian pre-adolescents, adolescents, and adults. *Chronobiology international*. 2008;25(5):745-59.

167. Rosenwasser AM. Functional neuroanatomy of sleep and circadian rhythms. *Brain research reviews*. 2009;61(2):281-306.

168. Wehr TA. In short photoperiods, human sleep is biphasic. *Journal of sleep research*. 1992;1(2):103-7.

169. Iyengar A, Paulus JK, Gerlanc DJ, Maron JL. Detection and potential utility of C-reactive protein in saliva of neonates. *Frontiers in pediatrics*. 2014;2:131.

170. Ouellet-Morin I, Danese A, Williams B, Arseneault L. Validation of a high-sensitivity assay for C-reactive protein in human saliva. *Brain, behavior, and immunity*. 2011;25(4):640-6.

171. Lunetta C, Lizio A, Maestri E, Sansone VA, Mora G, Miller RG, et al. Serum C-Reactive Protein as a Prognostic Biomarker in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA neurology*. 2017;74(6):660-7.

172. Pasic J, Pickup JC. Salivary insulin in normal and type I diabetic subjects. *Diabetes care*. 1988;11(6):489-94.

173. Shubnikova EA, Volkova EF, Printseva O. Submandibular glands as organs of synthesis and accumulation of insulin-like protein. *Acta histochemica*. 1984;74(2):157-71.
174. Taouis M, Deville de Periere D, Hillaire-Buys D, Derouet M, Gross R, Simon J, et al. Biological activity of immunoreactive insulin-like activity extracted from rat submandibular gland. *The American journal of physiology*. 1995;269(2 Pt 1):E277-82.
175. Messenger B, Clifford MN, Morgan LM. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide and insulin-like immunoreactivity in saliva following sham-fed and swallowed meals. *The Journal of endocrinology*. 2003;177(3):407-12.
176. Naidoo T, Konkol K, Biccard B, Dudose K, McKune AJ. Elevated salivary C-reactive protein predicted by low cardio-respiratory fitness and being overweight in African children. *Cardiovascular journal of Africa*. 2012;23(9):501-6.
177. Saunders TJ, Gray CE, Poitras VJ, Chaput JP, Janssen I, Katzmarzyk PT, et al. Combinations of physical activity, sedentary behaviour and sleep: relationships with health indicators in school-aged children and youth. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme*. 2016;41(6 Suppl 3):S283-93.
178. Lopez-Minguez J, Dashti HS, Madrid-Valero JJ, Madrid JA, Saxena R, Scheer F, et al. Heritability of the timing of food intake. *Clin Nutr*. 2019;38(2):767-73.
179. Lopez-Minguez J, Morosoli JJ, Madrid JA, Garaulet M, Ordonana JR. Heritability of siesta and night-time sleep as continuously assessed by a circadian-related integrated measure. *Scientific reports*. 2017;7(1):12340.
180. Ruiz-Lozano T, Vidal J, de Hollanda A, Canteras M, Garaulet M, Izquierdo-Pulido M. Evening chronotype associates with obesity in severely obese subjects: interaction with CLOCK 3111T/C. *Int J Obes (Lond)*. 2016;40(10):1550-7.
181. Takeuchi H, Inoue M, Watanabe N, Yamashita Y, Hamada M, Kadota G, et al. Parental enforcement of bedtime during childhood modulates preference of Japanese junior high school students for eveningness chronotype. *Chronobiology international*. 2001;18(5):823-9.
182. Shochat T, Cohen-Zion M, Tzischinsky O. Functional consequences of inadequate sleep in adolescents: a systematic review. *Sleep medicine reviews*. 2014;18(1):75-87.
183. Ullah S, Arsalani-Zadeh R, MacFie J. Accuracy of prediction equations for calculating resting energy expenditure in morbidly obese patients. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*. 2012;94(2):129-32.
184. Levandovski R, Dantas G, Fernandes LC, Caumo W, Torres I, Roenneberg T, et al. Depression scores associate with chronotype and social jetlag in a rural population. *Chronobiology international*. 2011;28(9):771-8.
185. Doi Y, Ishihara K, Uchiyama M. Associations of chronotype with social jetlag and behavioral problems in preschool children. *Chronobiology international*. 2015;32(8):1101-8.
186. Husse J, Eichele G, Oster H. Synchronization of the mammalian circadian timing system: Light can control peripheral clocks independently of the SCN clock: alternate routes of entrainment optimize the alignment of the body's circadian clock network with external time. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2015;37(10):1119-28.
187. Boivin DB, Duffy JF, Kronauer RE, Czeisler CA. Sensitivity of the human circadian pacemaker to moderately bright light. *J Biol Rhythms*. 1994;9(3-4):315-31.

188. Nagare R, Rea MS, Plitnick B, Figueiro MG. Effect of White Light Devoid of "Cyan" Spectrum Radiation on Nighttime Melatonin Suppression Over a 1-h Exposure Duration. *J Biol Rhythms*. 2019;34(2):195-204.
189. Maukonen M, Kanerva N, Partonen T, Mannisto S. Chronotype and energy intake timing in relation to changes in anthropometrics: a 7-year follow-up study in adults. *Chronobiology international*. 2019;36(1):27-41.
190. Vera B, Dashti HS, Gomez-Abellan P, Hernandez-Martinez AM, Esteban A, Scheer F, et al. Modifiable lifestyle behaviors, but not a genetic risk score, associate with metabolic syndrome in evening chronotypes. *Scientific reports*. 2018;8(1):945.
191. Hurley S, Goldberg D, Von Behren J, Clague DeHart J, Wang S, Reynolds P. Chronotype and postmenopausal breast cancer risk among women in the California Teachers Study. *Chronobiology international*. 2019;36(11):1504-14.
192. de Punder K, Heim C, Entringer S. Association between chronotype and body mass index: The role of C-reactive protein and the cortisol response to stress. *Psychoneuroendocrinology*. 2019;109:104388.
193. Garipey G, Dore I, Whitehead RD, Elgar FJ. More than just sleeping in: a late timing of sleep is associated with health problems and unhealthy behaviours in adolescents. *Sleep medicine*. 2019;56:66-72.
194. Arbabi T, Vollmer C, Dorfler T, Randler C. The influence of chronotype and intelligence on academic achievement in primary school is mediated by conscientiousness, midpoint of sleep and motivation. *Chronobiology international*. 2015;32(3):349-57.
195. Marginean CO, Melit LE, Ghiga DV, Marginean MO. Early Inflammatory Status Related to Pediatric Obesity. *Frontiers in pediatrics*. 2019;7:241.
196. Cetinkaya M, Ozkan H, Koksall N, Celebi S, Hacimustafaoglu M. Comparison of serum amyloid A concentrations with those of C-reactive protein and procalcitonin in diagnosis and follow-up of neonatal sepsis in premature infants. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association*. 2009;29(3):225-31.
197. Corbalan-Tutau MD, Madrid JA, Ordovas JM, Smith CE, Nicolas F, Garaulet M. Differences in daily rhythms of wrist temperature between obese and normal-weight women: associations with metabolic syndrome features. *Chronobiology international*. 2011;28(5):425-33.
198. Garaulet M, Qian J, Florez JC, Arendt J, Saxena R, Scheer F. Melatonin Effects on Glucose Metabolism: Time To Unlock the Controversy. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2020.
199. Sinha R, Gu P, Hart R, Guarnaccia JB. Food craving, cortisol and ghrelin responses in modeling highly palatable snack intake in the laboratory. *Physiology & behavior*. 2019;208:112563.
200. Vilela S, Oliveira A, Severo M, Lopes C. Chrono-Nutrition: The Relationship between Time-of-Day Energy and Macronutrient Intake and Children's Body Weight Status. *J Biol Rhythms*. 2019;34(3):332-42.
201. Krauchi K. How is the circadian rhythm of core body temperature regulated? *Clinical autonomic research : official journal of the Clinical Autonomic Research Society*. 2002;12(3):147-9.
202. Lee JY, Ryu S, Cheong E, Sung KC. Association of Physical Activity and Inflammation With All-Cause, Cardiovascular-Related, and Cancer-Related Mortality. *Mayo Clinic proceedings*. 2016;91(12):1706-16.
203. Cespedes Feliciano EM, Quante M, Weng J, Mitchell JA, James P, Marinac CR, et al. Actigraphy-Derived Daily Rest-Activity Patterns and Body Mass Index in Community-Dwelling Adults. *Sleep*. 2017;40(12).

204. Sohail S, Yu L, Bennett DA, Buchman AS, Lim AS. Irregular 24-hour activity rhythms and the metabolic syndrome in older adults. *Chronobiology international*. 2015;32(6):802-13.
205. Bruunsgaard H. Physical activity and modulation of systemic low-level inflammation. *Journal of leukocyte biology*. 2005;78(4):819-35.
206. Lindsay A, Costello JT. Realising the Potential of Urine and Saliva as Diagnostic Tools in Sport and Exercise Medicine. *Sports Med*. 2017;47(1):11-31.
207. Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1999;19(4):972-8.
208. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2001;286(3):327-34.
209. Steene-Johannessen J, Kolle E, Andersen LB, Anderssen SA. Adiposity, aerobic fitness, muscle fitness, and markers of inflammation in children. *Medicine and science in sports and exercise*. 2013;45(4):714-21.
210. Namiki M, Kawashima S, Yamashita T, Ozaki M, Hirase T, Ishida T, et al. Local overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 at vessel wall induces infiltration of macrophages and formation of atherosclerotic lesion: synergism with hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2002;22(1):115-20.
211. Troseid M, Lappegaard KT, Claudi T, Damas JK, Morkrid L, Brendberg R, et al. Exercise reduces plasma levels of the chemokines MCP-1 and IL-8 in subjects with the metabolic syndrome. *European heart journal*. 2004;25(4):349-55.
212. Andersen IG, Holm JC, Homoe P. Obstructive sleep apnea in obese children and adolescents, treatment methods and outcome of treatment - A systematic review. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*. 2016;87:190-7.
213. Tam CS, Wong M, McBain R, Bailey S, Waters KA. Inflammatory measures in children with obstructive sleep apnoea. *Journal of paediatrics and child health*. 2006;42(5):277-82.
214. Ferreira ABD, Schaedler T, Mendes JV, Anacleto TS, Louzada FM. Circadian ontogeny through the lens of nonparametric variables of actigraphy. *Chronobiology international*. 2019;36(9):1184-9.
215. Yang X, Chen JY, Zhai Y, Zhao WH. [A systematic review of evaluation studies on physical activity questionnaires for children and adolescents]. *Zhonghua yu fang yi xue za zhi [Chinese journal of preventive medicine]*. 2019;53(12):1290-5.
216. Pereira LR, Moreira FP, Reyes AN, Bach SL, Amaral PLD, Motta JDS, et al. Biological Rhythm Disruption Associated with Obesity in School Children. *Child Obes*. 2019;15(3):200-5.
217. Moreno JP, Crowley SJ, Alfano CA, Hannay KM, Thompson D, Baranowski T. Potential circadian and circannual rhythm contributions to the obesity epidemic in elementary school age children. *The international journal of behavioral nutrition and physical activity*. 2019;16(1):25.





Greta Moeller, Hamburgo, Alemania, 7 años, fotografiada el 11 de agosto de 2017 rodeado de su alimentación habitual. Daily Bread, serie fotográfica de Gregg Segal. Link: <https://www.greggsegal.com/P-Projects/Daily-Bread/22/thumbs>

## ANEXOS



**Tabla 1 suplementaria.** Cambio porcentual de la concentración del marcador inflamatorio IgA por un aumento de la desviación estándar en los parámetros de actividad

	<b>IgA (n=121)</b>				
	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3	Modelo 4	Modelo 5
<b>Mesor</b>	-23.2% (-40.1%, -1.4%) <b>p = 0.04</b>	-23.6% (-41.7%, 0%) <b>p = 0.04997</b>	-45% (-84.7%, 97.7%) p = 0.36	-23.5% (-41.6%, 0.2%) p = 0.05	-45.9% (-85.2%, 97.3%) p = 0.35
<b>Acrofase</b>	7.9% (-15.8%, 38.1%) p = 0.55	9.6% (-15.1%, 41.4%) p = 0.48	7.5% (-15.8%, 37.3%) p = 0.56	9.5% (-15.2%, 41.3%) p = 0.48	7.7% (-15.8%, 37.7%) p = 0.55
<b>Amplitud relativa</b>	1.7% (-16.8%, 24.4%) p = 0.87	3.9% (-19.4%, 33.8%) p = 0.77	1.8% (-16.6%, 24.2%) p = 0.86	6.1% (-18%, 37.2%) p = 0.65	2.2% (-16.9%, 25.7%) p = 0.83
<b>Estabilidad interdiaria</b>	6.9% (-16.9%, 37.5%) p = 0.6	4.6% (-19.9%, 36.6%) p = 0.74	35.4% (0.5%, 82.3%) p = 0.05	5.1% (-19.6%, 37.4%) p = 0.71	36.6% (1%, 84.7%) p = 0.04
<b>Variabilidad intradiaria</b>	-10% (-27.6%, 11.9%) p = 0.34	-7.5% (-26.5%, 16.6%) p = 0.51	-9.8% (-27.3%, 11.8%) p = 0.34	-7.7% (-26.7%, 16.4%) p = 0.5	-9.9% (-27.4%, 11.8%) p = 0.34
<b>M10</b>	-1.2% (-20.4%, 22.6%) p = 0.91	0.3% (-20.2%, 26.2%) p = 0.98	-0.4% (-19.5%, 23.3%) p = 0.97	-0.1% (-20.6%, 25.7%) p = 0.99	-0.3% (-19.6%, 23.7%) p = 0.98
<b>L5</b>	8.9% (-12.9%, 36%) p = 0.45	11.6% (-11.7%, 40.9%) p = 0.36	9.1% (-12.4%, 36%) p = 0.43	11.7% (-11.6%, 41.2%) p = 0.35	9.2% (-12.5%, 36.2%) p = 0.43
<b>CFI</b>	8.3% (-14.3%, 36.9%) p = 0.5	7.4% (-17.4%, 39.5%) p = 0.59	20.1% (-6%, 53.6%) p = 0.14	8.7% (-16.4%, 41.5%) p = 0.53	21.7% (-5.5%, 56.8%) p = 0.13

Los datos se expresan como media (IC 95%). (Modelo 1) Ajustado por edad, sexo, colegio y curso. (Modelo 2) Modelo 1 + duración total de sueño. (Modelo 3) Modelo 1 + actividad diaria. (Modelo 4) Modelo 2 + IMC. (Modelo 5) Modelo 3 + IMC

**Tabla 2 suplementaria.** Cambio porcentual de la concentración del marcador inflamatorio PCR por un aumento de la desviación estándar en los parámetros de actividad

	<b>PCR (n=118)</b>				
	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3	Modelo 4	Modelo 5
<b>Mesor</b>	-3.5% (-31.4%, 35.8%) p = 0.84	-3.5% (-33%, 39.1%) p = 0.85	-47.7% (-91%, 204.5%) p = 0.47	-2.1% (-28.6%, 34.2%) p = 0.89	-68.2% (-93.3%, 49.8%) p = 0.15
<b>Acrofase</b>	-10% (-35.2%, 25%) p = 0.53	-4.6% (-31.8%, 33.4%) p = 0.78	-10% (-35.3%, 25.2%) p = 0.53	-5.4% (-29.2%, 26.5%) p = 0.71	-5.4% (-29.4%, 26.7%) p = 0.71
<b>Amplitud relativa</b>	-33.2% (-48.4%, -13.6%) p = <b>0.002</b>	-29.6% (-49.3%, -2.1%) p = <b>0.04</b>	-33.2% (-48.4%, -13.5%) p = <b>0.003</b>	-19.1% (-39.6%, 8.3%) p = 0.15	-21.7% (-38.5%, -0.3%) p = <b>0.047</b>
<b>Estabilidad interdiaria</b>	1% (-28%, 41.6%) p = 0.96	1.3% (-28.9%, 44.4%) p = 0.94	2.4% (-32.2%, 54.4%) p = 0.91	4.2% (-23.3%, 41.5%) p = 0.79	18.6% (-17.7%, 70.8%) p = 0.36
<b>Variabilidad intradiaria</b>	19.7% (-10.9%, 61%) p = 0.23	16.2% (-15%, 59%) p = 0.34	19.8% (-11%, 61.3%) p = 0.23	16.4% (-11.1%, 52.5%) p = 0.27	15.9% (-10.9%, 50.8%) p = 0.27
<b>M10</b>	-15% (-36.2%, 13.3%) p = 0.26	-10.4% (-33.9%, 21.3%) p = 0.47	-15% (-36.3%, 13.5%) p = 0.27	-14.4% (-34.1%, 11.2%) p = 0.24	-10.5% (-30.7%, 15.6%) p = 0.39
<b>L5</b>	14.3% (-15.5%, 54.6%) p = 0.38	16.4% (-14.9%, 59.3%) p = 0.34	14.4% (-15.6%, 54.9%) p = 0.38	18.7% (-9.4%, 55.5%) p = 0.21	17.7% (-9.9%, 53.7%) p = 0.23
<b>CFI</b>	-23.6% (-44.2%, 4.4%) p = 0.09	-17.4% (-41.8%, 17.1%) p = 0.28	-26.1% (-47.1%, 3.3%) p = 0.08	-10.6% (-34%, 21.1%) p = 0.47	-11.5% (-34.8%, 20.2%) p = 0.43

Los datos se expresan como media (IC 95%). (Modelo 1) Ajustado por edad, sexo, colegio y curso. (Modelo 2) Modelo 1 + duración total de sueño. (Modelo 3)

Modelo 1 + actividad diaria. (Modelo 4) Modelo 2 + IMC. (Modelo 5) Modelo 3 + IMC

**Tabla 3 suplementaria.** Cambio porcentual de la concentración del marcador inflamatorio IL8 por un aumento de la desviación estándar en los parámetros de actividad

	IL8 (n=57)				
	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3	Modelo 4	Modelo 5
<b>Mesor</b>	14% (-11.5%, 46.8%) p = 0.3	15% (-12.7%, 51.5%) p = 0.31	-47.5% (-87.1%, 114.4%) p = 0.36	15.4% (-11.8%, 50.9%) p = 0.29	-50.3% (-88%, 106.5%) p = 0.33
<b>Acrofase</b>	-4.3% (-26.9%, 25.3%) p = 0.74	-7.4% (-29.8%, 22%) p = 0.57	-4.4% (-26.9%, 25.1%) p = 0.74	-7.9% (-29.7%, 20.6%) p = 0.54	-4.2% (-26.9%, 25.6%) p = 0.75
<b>Amplitud relativa</b>	5.7% (-13.1%, 28.7%) p = 0.57	-14.5% (-35.5%, 13.3%) p = 0.27	6.1% (-12.7%, 29%) p = 0.55	-8.6% (-31.8%, 22.5%) p = 0.54	11% (-10.7%, 38%) p = 0.34
<b>Estabilidad interdiaria</b>	3.4% (-26.3%, 45%) p = 0.85	-14.3% (-42.7%, 28%) p = 0.44	-20% (-50.2%, 28.4%) p = 0.35	-10.4% (-39.8%, 33.3%) p = 0.58	-18% (-50.6%, 36.2%) p = 0.44
<b>Variabilidad intradiaria</b>	-9.5% (-28.1%, 13.8%) p = 0.39	-0.8% (-23.2%, 28.1%) p = 0.95	-11.9% (-30.1%, 11%) p = 0.28	-1.1% (-23%, 27%) p = 0.93	-12.8% (-31%, 10.1%) p = 0.24
<b>M10</b>	9.3% (-14.1%, 39.1%) p = 0.46	5.1% (-19.6%, 37.2%) p = 0.71	9.2% (-14.1%, 38.8%) p = 0.47	4.6% (-19.4%, 35.8%) p = 0.73	10.4% (-13.5%, 40.8%) p = 0.42
<b>L5</b>	33.9% (5.9%, 69.1%) p = 0.02	35.6% (6.3%, 72.9%) p = 0.02	34.8% (6.9%, 70%) p = 0.01	35.4% (6.9%, 71.5%) p = 0.01	35.1% (7%, 70.6%) p = 0.01
<b>CFI</b>	9.1% (-16.1%, 42%) p = 0.51	-14.1% (-38.2%, 19.6%) p = 0.36	4.3% (-20.9%, 37.5%) p = 0.76	-8.9% (-34.7%, 27.1%) p = 0.58	9.6% (-19.2%, 48.6%) p = 0.55

Los datos se expresan como media (IC 95%). (Modelo 1) Ajustado por edad, sexo, colegio y curso. (Modelo 2) Modelo 1 + duración total de sueño. (Modelo 3) Modelo 1 + actividad diaria. (Modelo 4) Modelo 2 + IMC. (Modelo 5) Modelo 3 + IMC

**Tabla 4 suplementaria.** Cambio porcentual de la concentración del marcador inflamatorio IL1 $\beta$  por un aumento de la desviación estándar en los parámetros de actividad

	IL1 $\beta$ (n=60)				
	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3	Modelo 4	Modelo 5
<b>Mesor</b>	-6.6% (-33.8%, 31.7%) p = 0.69	5.9% (-27.3%, 54.4%) p = 0.76	65.9% (-74.5%, 979.5%) p = 0.59	7.3% (-25.7%, 55.1%) p = 0.7	51.5% (-77.2%, 906.6%) p = 0.66
<b>Acrofase</b>	-5% (-32.7%, 34.1%) p = 0.77	-12.3% (-38.4%, 25%) p = 0.46	-4.6% (-32.6%, 35%) p = 0.79	-12.2% (-37.9%, 24.1%) p = 0.45	-4% (-32.3%, 36%) p = 0.81
<b>Amplitud relativa</b>	14.1% (-12.2%, 48.2%) p = 0.32	4.3% (-29%, 53.3%) p = 0.83	13.8% (-12.6%, 48.2%) p = 0.33	17.1% (-21%, 73.4%) p = 0.42	25.1% (-6.5%, 67.3%) p = 0.13
<b>Estabilidad interdiaria</b>	-7.2% (-41%, 46.1%) p = 0.74	-1.6% (-42.8%, 69.1%) p = 0.95	0.8% (-46.1%, 88.7%) p = 0.98	5.4% (-38.3%, 80%) p = 0.84	10.9% (-42.8%, 115%) p = 0.76
<b>Variabilidad intradiaria</b>	-5.5% (-30.9%, 29.2%) p = 0.72	-3.9% (-32.3%, 36.5%) p = 0.82	-4.4% (-30.6%, 31.6%) p = 0.78	-4.3% (-32.1%, 34.8%) p = 0.8	-6.3% (-32.2%, 29.5%) p = 0.69
<b>M10</b>	-7.9% (-32.9%, 26.3%) p = 0.6	-15.1% (-39.9%, 19.9%) p = 0.34	-7.8% (-33%, 26.8%) p = 0.61	-16% (-40%, 17.7%) p = 0.3	-6.6% (-32.3%, 28.9%) p = 0.67
<b>L5</b>	43.9% (6.4%, 94.7%) p = <b>0.02</b>	31.1% (-5.4%, 81.8%) p = 0.1	43.9% (6.2%, 95.1%) p = <b>0.02</b>	31.4% (-4.5%, 80.6%) p = 0.09	44.6% (6.6%, 96%) p = <b>0.02</b>
<b>CFI</b>	8.4% (-23.7%, 54.2%) p = 0.65	3.2% (-34.1%, 61.5%) p = 0.89	12.5% (-22.3%, 62.9%) p = 0.53	13.3% (-27.6%, 77.3%) p = 0.58	24.6% (-16.8%, 86.6%) p = 0.28

Los datos se expresan como media (IC 95%). (Modelo 1) Ajustado por edad, sexo, colegio y curso. (Modelo 2) Modelo 1 + duración total de sueño. (Modelo 3) Modelo 1 + actividad diaria. (Modelo 4) Modelo 2 + IMC. (Modelo 5) Modelo 3 + IMC

**Tabla 5 suplementaria.** Cambio porcentual de la concentración del marcador inflamatorio TNF $\alpha$  por un aumento de la desviación estándar en los parámetros de actividad

	TNF $\alpha$ (n=59)				
	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3	Modelo 4	Modelo 5
<b>Mesor</b>	6.7% (-14.7%, 33.6%) p = 0.56	10.1% (-15.2%, 42.8%) p = 0.46	153.1% (-24.1%, 743.9%) p = 0.13	10.4% (-15.1%, 43.6%) p = 0.45	146.7% (-27.4%, 738.4%) p = 0.14
<b>Acrofase</b>	-4% (-24%, 21.3%) p = 0.73	-7.9% (-28.8%, 19.1%) p = 0.52	-4.1% (-24.3%, 21.4%) p = 0.72	-7.8% (-28.9%, 19.5%) p = 0.53	-3.7% (-24.2%, 22.2%) p = 0.75
<b>Amplitud relativa</b>	-0.2% (-16.1%, 18.8%) p = 0.98	-10.3% (-31.5%, 17.5%) p = 0.42	-0.1% (-16.2%, 19.1%) p = 0.99	-9.1% (-31.8%, 21%) p = 0.5	2.4% (-15.9%, 24.7%) p = 0.81
<b>Estabilidad interdiaria</b>	-17% (-38.2%, 11.5%) p = 0.21	-18.9% (-44.3%, 18.2%) p = 0.27	-34.6% (-56.3%, -2%) p = 0.04	-18% (-44.2%, 20.4%) p = 0.3	-35% (-57.7%, -0.1%) p = 0.049
<b>Variabilidad intradiaria</b>	-7.9% (-24.8%, 12.9%) p = 0.42	-9.6% (-29.1%, 15.1%) p = 0.4	-8.6% (-25.7%, 12.5%) p = 0.39	-9.7% (-29.3%, 15.3%) p = 0.4	-9.4% (-26.6%, 11.9%) p = 0.35
<b>M10</b>	0.6% (-18.8%, 24.6%) p = 0.95	0.6% (-22%, 29.7%) p = 0.96	0.6% (-19%, 24.8%) p = 0.96	0.4% (-22.3%, 29.8%) p = 0.97	1.3% (-18.6%, 26.2%) p = 0.91
<b>L5</b>	13.3% (-8%, 39.5%) p = 0.23	9.8% (-13.3%, 38.9%) p = 0.43	13.3% (-8.1%, 39.8%) p = 0.24	9.9% (-13.4%, 39.3%) p = 0.43	13.6% (-8%, 40.4%) p = 0.23
<b>CFI</b>	-4.8% (-24.6%, 20.1%) p = 0.67	-10.4% (-34.5%, 22.6%) p = 0.48	-6.4% (-26.8%, 19.7%) p = 0.59	-9.1% (-34.3%, 25.7%) p = 0.55	-4.7% (-27.3%, 25.1%) p = 0.73

Los datos se expresan como media (IC 95%). (Modelo 1) Ajustado por edad, sexo, colegio y curso. (Modelo 2) Modelo 1 + duración total de sueño. (Modelo 3) Modelo 1 + actividad diaria. (Modelo 4) Modelo 2 + IMC. (Modelo 5) Modelo 3 + IMC

**Tabla 6 suplementaria.** Cambio porcentual de la concentración del marcador inflamatorio MCP1 por un aumento de la desviación estándar en los parámetros de actividad

	MCP1 (n=60)				
	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3	Modelo 4	Modelo 5
<b>Mesor</b>	-30.7% (-44.1%, -14.1%) <b>p = 0.001</b>	-34.9% (-48.6%, -17.5%) <b>p = 0.001</b>	-57% (-86.6%, 37.7%) <b>p = 0.15</b>	-34.6% (-48.5%, -17.1%) <b>p = 0.001</b>	-58.7% (-87.3%, 34.7%) <b>p = 0.14</b>
<b>Acrofase</b>	-14.5% (-32.3%, 7.9%) <b>p = 0.18</b>	-11.8% (-31.4%, 13.5%) <b>p = 0.32</b>	-13.1% (-30%, 7.9%) <b>p = 0.2</b>	-11.8% (-31.5%, 13.6%) <b>p = 0.32</b>	-13% (-30%, 8.3%) <b>p = 0.21</b>
<b>Amplitud relativa</b>	1.6% (-15.3%, 21.9%) <b>p = 0.86</b>	3.3% (-21.6%, 36%) <b>p = 0.81</b>	0.8% (-14.8%, 19.3%) <b>p = 0.92</b>	8.2% (-19%, 44.5%) <b>p = 0.59</b>	2.7% (-15%, 24.1%) <b>p = 0.78</b>
<b>Estabilidad interdiaria</b>	-33% (-50%, -10.3%) <b>p = 0.01</b>	-42.6% (-59.6%, -18.6%) <b>p = 0.003</b>	-15.7% (-43.1%, 25%) <b>p = 0.39</b>	-41.8% (-59.2%, -16.9%) <b>p = 0.004</b>	-15.1% (-44.2%, 29.1%) <b>p = 0.44</b>
<b>Variabilidad intradiaria</b>	-22.8% (-37%, -5.3%) <b>p = 0.01</b>	-22.6% (-39%, -1.6%) <b>p = 0.04</b>	-19.2% (-33.4%, -2%) <b>p = 0.03</b>	-22.7% (-39.1%, -1.8%) <b>p = 0.04</b>	-19.9% (-34.2%, -2.6%) <b>p = 0.03</b>
<b>M10</b>	-5.7% (-24.2%, 17.2%) <b>p = 0.59</b>	-0.8% (-22.6%, 27.3%) <b>p = 0.95</b>	-5.1% (-22.5%, 16.1%) <b>p = 0.6</b>	-1.2% (-23%, 26.9%) <b>p = 0.93</b>	-4.8% (-22.4%, 16.8%) <b>p = 0.63</b>
<b>L5</b>	14.1% (-8%, 41.6%) <b>p = 0.23</b>	18% (-6.8%, 49.3%) <b>p = 0.16</b>	14.1% (-6.6%, 39.2%) <b>p = 0.19</b>	18.1% (-6.7%, 49.5%) <b>p = 0.16</b>	14.2% (-6.6%, 39.6%) <b>p = 0.19</b>
<b>CFI</b>	-6.4% (-26.5%, 19.2%) <b>p = 0.59</b>	-12.2% (-36.1%, 20.7%) <b>p = 0.41</b>	4.2% (-17.6%, 31.8%) <b>p = 0.73</b>	-9.7% (-34.9%, 25.4%) <b>p = 0.54</b>	7.3% (-17.2%, 39.1%) <b>p = 0.59</b>

Los datos se expresan como media (IC 95%). (Modelo 1) Ajustado por edad, sexo, colegio y curso. (Modelo 2) Modelo 1 + duración total de sueño. (Modelo 3) Modelo 1 + actividad diaria. (Modelo 4) Modelo 2 + IMC. (Modelo 5) Modelo 3 + IMC



Chetan Menge, 10 años, Deonar, India. Fotografiado el 12 de marzo de 2017, rodeado de su alimentación habitual. Daily Bread, serie fotográfica de Gregg Segal.

Link: <https://www.greggsegal.com/P-Projects/Daily-Bread/22/thumbs>

## PRODUCCIÓN CIENTÍFICA



**I. ARTÍCULO 1:**

**“La salud circadiana es diferente entre niños y niñas evaluada por técnicas no invasivas en niños de edad escolar”.**

Barraco GM\*, **Martínez-Lozano N\***, Claudia Vales-Villamarín C, Blaya C, Rios R, Madrid JM, Fardy P, Garaulet M.

Clinical Nutrition (2019)

(Índice de Impacto= 6,402; cuartil: 1º)

<https://www.journals.elsevier.com/clinical-nutrition>

## **Resumen**

**Antecedentes y objetivos:** la evaluación de la salud circadiana está limitada a adultos. Sin embargo, es necesario comprender el estado circadiano de los niños en edad escolar debido a sus implicaciones para la salud. El objetivo fue desarrollar 1) un protocolo para evaluar la función circadiana en niños en edad escolar mediante la combinación de las mejores herramientas no invasivas previamente validadas en adultos; 2) un score para capturar la función circadiana en niños de edad escolar, incluyendo los horarios de comida. Este protocolo permitirá explorar las diferencias de sexo y comparar la función circadiana de niños en edad escolar con adultos de la misma área Mediterránea.

**Métodos:** Se reclutaron niños sanos (8-12 años) de 3 escuelas de un área Mediterránea de España (n = 248; 125 niños y 123 niñas). Se utilizaron varias técnicas no invasivas: a) cuestionarios de 7 días de consumo de alimentos y horarios de comida y sueño, b) Cuestionario de Munich; c) determinaciones de cortisol y melatonina en saliva; d) ritmos de 7 días de temperatura (T), actividad (A), posición (P) y la variable integradora TAP e) exposición a la luz de 7 días.

**Resultados:** Hemos construido la primera población de niños en edad escolar para la evaluar la función circadiana (ONTIME-Jr) y se ha desarrollado un nuevo score circadiano. Entre las medidas relacionadas con la función circadiana, TAP fue la más adecuada y fiable para determinar las características del sistema circadiano. La función circadiana fue mejor en niñas que en niños [score circadiano (AU) Media  $\pm$  SD (niñas,  $1216 \pm 153$  vs.  $1159 \pm 173$  niños,  $P=0.012$ )], y también en niños en edad escolar que en adultos de la misma área mediterránea (índice de función circadiana: niños  $0.47 \pm 0.06$  frente a adultos  $0.45 \pm 0.06$ ,  $P=0.001$ ).

**Conclusiones:** Un nuevo protocolo, que incluye TAP y horarios de comida, demostró ser fiable para evaluar la función circadiana en niños. Estas técnicas no invasivas proporcionan medios para que pediatras evalúen la función circadiana en la práctica clínica.

## II. ARTÍCULO 2:

### **“La saliva como herramienta no invasiva para la evaluación de biomarcadores metabólicos e inflamatorios en niños”.**

Tvarijonaviute A\*, **Martínez-Lozano N\***, Rios R, Marcilla de Teruel C,  
Garaulet M\*, Cerón JJ\*.

Clinical Nutrition (2019)

(Índice de Impacto= 6,402; cuartil: 1º)

<https://www.journals.elsevier.com/clinical-nutrition>

## **Resumen**

**Antecedentes y objetivos:** Los estudios epidemiológicos en niños en edad escolar son desafiantes, particularmente aquellos que apuntan a analizar marcadores metabólicos en muestras de sangre obtenidas mediante procedimientos invasivos y estresantes. El objetivo de este trabajo es evaluar el uso de saliva, como herramienta no invasiva en estudios epidemiológicos realizados en niños de edad escolar, para capturar los cambios metabólicos asociados con el índice de masa corporal (IMC), las características dietéticas (ingesta y composición) y actividad física en niños y niñas.

**Métodos:** Este es un estudio observacional en el que se incluyen niños sanos de edades comprendidas entre 8 y 12 años ( $n = 129$ , 60 niñas y 69 niños) de tres escuelas en un área mediterránea de España. Se midió una serie de biomarcadores en suero y saliva y se correlacionó con el IMC, las características dietéticas (ingesta y composición) y la actividad física.

**Resultados:** Se detectó una correlación positiva significativa entre los niveles séricos y salivales para la PCR ( $r = 0.770$ ) en todos incluyeron niños, y niños ( $r = 0.805$ ) y niñas ( $r = 0.775$ ) por separado ( $P < 0.001$ , en todos los casos) y para insulina en niñas ( $r = 0.442$ ;  $P < 0.05$ ). Entre todos los biomarcadores salivales estudiados, la insulina se correlacionó significativamente con los tres factores estudiados: positivamente con IMC y negativamente con características dietéticas (ingesta y composición) y actividad física ( $P < 0.05$ ). La obesidad y algunos componentes de la dieta se asociaron positivamente a biomarcadores proinflamatorios, PCR e IL1 $\beta$ ; mientras que la composición de la dieta compartió con los niveles de actividad física la correlación con IL6 (positivamente con la ingesta de energía, grasas, carbohidratos y ácidos grasos saturados, y negativamente con ingesta de colesterol y actividad física media en niños), NGF y glucosa (en ambos casos las correlaciones fueron negativas con composición de la dieta y variables de actividad física) ( $P < 0.05$ , en todos los casos). Se detectaron diferencias de sexo en suero de glucosa y TNF $\alpha$ .

**Conclusiones:** Los biomarcadores en la saliva pueden capturar diferencias en el IMC, las características dietéticas y la actividad física en niños en edad escolar. La saliva puede constituir una herramienta útil, no invasiva y libre de estrés para evaluar marcadores metabólicos de inflamación y / o relacionados con el metabolismo con el IMC y el estilo de vida en la conducta dependiente del sexo.



Kawakanih Yawalapiti, 9 años, región del Alto Xingu de Mato Grosso, Brasil, fotografiada el 19 de agosto de 2018 en Brasil, rodeada de su alimentación habitual. Daily Bread, serie fotográfica de Gregg Segal. Link: <https://www.greggsegal.com/P-Projects/Daily-Bread/22/thumbs>

## CUESTIONARIOS





**Diario de sueño**

DIA	SUEÑO NOCTURNO			SIESTA			OBSERVACIONES DEL SUEÑO, NÚMERO DE DESPERTARES Y DURACIÓN
	H. DORMIR	H. DESPETAR	DURAC.	H. DORMIR	H. DESPETAR	DURAC.	
EJEMPLO	00:30	9:30	09:00	16:00	16:30	00:30	
DIA 1							
DIA 2							
DIA 3							
DIA 4							
DIA 5							
DIA 6							
DIA 7							

Nota: H. Dormir es decir la hora en que se va a la cama y la luz y cualquier fuente de distracción

## Cuestionario de Munich

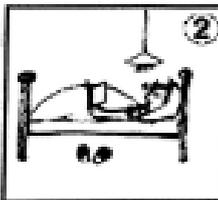
Nombre: ..... ID: #..... Fecha: .....

### CUESTIONARIO CRONOTIPO MUNICH

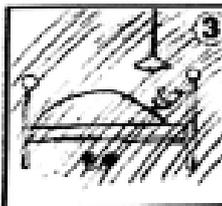
#### DÍAS LABORABLES



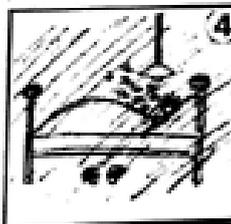
1. Me acuesto a las ..... horas



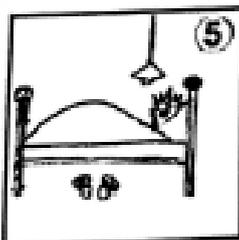
2. ¡Tenga en cuenta que algunas personas permanecen despiertas algún tiempo cuando están en la cama!



3. En realidad estoy listo/a para dormirme a las ..... horas



4. Necesito ... minutos para conciliar el sueño



5. Me despierto a las ..... horas  
 a. Con despertador  
 b. Sin despertador



6. Me levanto después de ... minutos

DÍAS NO LABORABLES



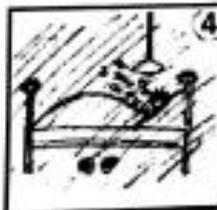
1. Me acuesto a las ...:... horas.



2. ¡Tenga en cuenta que algunas personas permanecen despiertas algún tiempo cuando están en la cama!



3. En realidad estoy listo para dormirme a las ...:... horas.



4. Necesito ... minutos para conciliar el sueño



5. Me despierto a las ...:... horas:  
 a. Con despertador  
 b. Sin despertador



6. Me levanto después de ... minutos

DEPARTAMENTO DE FISILOGIA ANIMAL.

FACULTAD DE BIOLOGIA. ESPINARDO



**CODIGO:**

NOMBRE.....

Dirección ..... TLF.....

### ENCUESTA DE NUTRICIÓN

(Seguimiento de siete días)

Esta encuesta está concebida para poder informarte de las DESCOMPENSACIONES MARCADAS de principios inmediatos (proteínas, lípidos, ...) que puedas presentar en tu alimentación.

Por ello, elige una semana normal de tu vida en la cual no hayan existido excesos no habituales de tus comidas.

Debes indicar todos los alimentos ingeridos, desde que te levantes hasta que te acuestes. No olvidar los aperitivos y tomas entre comidas, inclusive un caramelo.

Si la comida te la preparase algún familiar, le puedes preguntar sobre los ingredientes y cantidad aproximada de cada uno de ellos que compongan dicho plato. Por ejemplo en Arroz y conejo: 80 gr se arroz, 150 gr de conejo, 1 cucharada de aceite, 25 gr de pimiento,...

RECUERDA que de la exactitud de los datos de tu encuesta dependerá la fiabilidad de los resultados que obtengamos. Por lo tanto, te rogamos la máxima cooperación.

NO OLVIDES QUE: *“Los defectos nutricionales, crean importantes repercusiones a largo plazo sobre tu salud”.*

<b>Día 1:</b>	<b>Alimentos</b>	<b>Cantidad (g)</b>
<b>Desayuno</b> Hora inicio Hora final Número Comensales Lugar		
<b>Almuerzo</b> Hora inicio Hora final Número Comensales Lugar		
<b>Comida</b> Hora inicio Hora final Número Comensales Lugar		
<b>Merienda</b> Hora inicio Hora final Número Comensales Lugar		
<b>Cena</b> Hora inicio Hora final Número Comensales Lugar		

<b>Día 2:</b>	<b>Alimentos</b>	<b>Cantidad (g)</b>
<b>Desayuno</b> Hora inicio Hora final Número Comensales Lugar		
<b>Almuerzo</b> Hora inicio Hora final Número Comensales Lugar		
<b>Comida</b> Hora inicio Hora final Número Comensales Lugar		
<b>Merienda</b> Hora inicio Hora final Número Comensales Lugar		
<b>Cena</b> Hora inicio Hora final Número Comensales Lugar		

<b>Día 3:</b>	<b>Alimentos</b>	<b>Cantidad (g)</b>
<b>Desayuno</b> Hora inicio Hora final Número Comensales Lugar		
<b>Almuerzo</b> Hora inicio Hora final Número Comensales Lugar		
<b>Comida</b> Hora inicio Hora final Número Comensales Lugar		
<b>Merienda</b> Hora inicio Hora final Número Comensales Lugar		
<b>Cena</b> Hora inicio Hora final Número Comensales Lugar		

<b>Día 4:</b>	<b>Alimentos</b>	<b>Cantidad (g)</b>
<b>Desayuno</b>  Hora inicio  Hora final  Número Comensales  Lugar		
<b>Almuerzo</b>  Hora inicio  Hora final  Número Comensales  Lugar		
<b>Comida</b>  Hora inicio  Hora final  Número Comensales  Lugar		
<b>Merienda</b>  Hora inicio  Hora final  Número Comensales  Lugar		
<b>Cena</b>  Hora inicio  Hora final  Número Comensales  Lugar		

<b>Día 5:</b>	<b>Alimentos</b>	<b>Cantidad (g)</b>
<b>Desayuno</b>  Hora inicio  Hora final  Número Comensales  Lugar		
<b>Almuerzo</b>  Hora inicio  Hora final  Número Comensales  Lugar		
<b>Comida</b>  Hora inicio  Hora final  Número Comensales  Lugar		
<b>Merienda</b>  Hora inicio  Hora final  Número Comensales  Lugar		
<b>Cena</b>  Hora inicio  Hora final  Número Comensales  Lugar		

<b>Día 6:</b>	<b>Alimentos</b>	<b>Cantidad (g)</b>
<b>Desayuno</b> Hora inicio Hora final Número Comensales Lugar		
<b>Almuerzo</b> Hora inicio Hora final Número Comensales Lugar		
<b>Comida</b> Hora inicio Hora final Número Comensales Lugar		
<b>Merienda</b> Hora inicio Hora final Número Comensales Lugar		
<b>Cena</b> Hora inicio Hora final Número Comensales Lugar		

<b>Día 7:</b>	<b>Alimentos</b>	<b>Cantidad (g)</b>
<b>Desayuno</b>  Hora inicio  Hora final  Número Comensales  Lugar		
<b>Almuerzo</b>  Hora inicio  Hora final  Número Comensales  Lugar		
<b>Comida</b>  Hora inicio  Hora final  Número Comensales  Lugar		
<b>Merienda</b>  Hora inicio  Hora final  Número Comensales  Lugar		
<b>Cena</b>  Hora inicio  Hora final  Número Comensales  Lugar		

