



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

RITMOS CIRCADIANOS DEL TEJIDO ADIPOSO Y RELACIÓN
CON LOS HÁBITOS DE VIDA EN INDIVIDUOS CON OBESIDAD
SEVERA

D.^a Ana Carolina Zambrano Paredes

2024



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

RITMOS CIRCADIANOS DEL TEJIDO ADIPOSO Y RELACIÓN CON
LOS HÁBITOS DE VIDA EN INDIVIDUOS CON OBESIDAD SEVERA

Autor: D.^a Ana Carolina Zambrano Paredes

Director/es: D.^a MARTA GARAULET AZA



**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD
DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022

D./Dña. Ana Carolina Zambrano Paredes
doctorando del Programa de Doctorado en

INTEGRACIÓN Y MODULACIÓN DE SEÑALES EN BIOMEDICINA

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

RITMOS CIRCADIANOS DEL TEJIDO ADIPOSO Y RELACIÓN CON LOS HÁBITOS DE VIDA EN INDIVIDUOS CON OBESIDAD SEVERA

y dirigida por,

D./Dña. Marta Garaulet Aza

D./Dña.

D./Dña.

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Si la tesis hubiera sido autorizada como tesis por compendio de publicaciones o incluyese 1 o 2 publicaciones (como prevé el artículo 29.8 del reglamento), declarar que cuenta con:

- *La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- *En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 12 de Diciembre de 2023

Fdo.:

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados	
Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

A mis padres, y a Carlos

Por ser mi fuente constante de inspiración y apoyo

AGRADECIMIENTOS

En este punto de mi vida, todavía me cuesta creer que haya logrado, no solo empezar, sino completar el doctorado. A pesar de haber vivido una pandemia de por medio, lo que comenzó como una breve prueba de una semana en el grupo de obesidad de la universidad de Murcia se convirtió en cuatro años de dedicación completa. Ha sido mucho lo que he aprendido a lo largo de estos años y no solo de ciencia, sino de mí misma y de todas las personas que he conocido por el camino. Soy consciente de que ni todas las palabras del mundo son suficientes para expresar mi agradecimiento hacia todos ellos.

Mi primer agradecimiento va dirigido a mi directora de tesis, la catedrática de fisiología de la universidad de Murcia, D^a. **Marta Garaulet Aza**. Gracias por brindarme esta oportunidad y por confiar en mí. Siempre he admirado tu capacidad de trabajo y tu constante pasión e ilusión por la ciencia. Te agradezco mucho que me hayas “empujado” siempre para que no me acomodase. Pero sobre todo te agradeceré siempre el que me hayas permitido formar parte de tu equipo y brindarme la oportunidad de haber conocido a gente tan maravillosa.

Siempre he dicho que en el equipo he pasado por 3 generaciones, cada una con su particularidad, pero todos muy especiales. La primera generación, aquella que considero de alguna forma mis mentores, empezando por:

Puri, mi maestra, de ella aprendí todo sobre el tejido adiposo, y le estoy muy agradecida, una persona con un corazón que no le cabe en el pecho y que siempre se preocupa por los demás, la “mami del grupo”.

Jesús, una persona con gran capacidad de superación, no se ha rendido hasta que ha conseguido lo que realmente quería y sin perder la sonrisa. Eres un gran investigador, talentoso, vas a llegar muy lejos, gracias por inspirarme.

A **Nuria, Laura y Teresa**, tres mujeres brillantes con gran perseverancia, gracias por los momentos compartidos. Sin olvidarme de mi brasileña favorita, **Cecilia**, su paciencia y sus enseñanzas en el laboratorio me ha servido a lo largo de todos estos años.

La segunda generación entró arrasando, y me acompañaron a lo largo de mi tesis, fueron fundamentales y hoy en día son una parte importante de mi vida.

Empezando por **Jazmín**, una persona con grandes capacidades, y dispuesta a ayudar en todo, daba igual lo que fuese, gracias por la ayuda y todas las risas compartidas, pero sobre todo gracias por hacer posible que **Vero** se cruzara en mi camino. Las noches interminables de experimentos, las horas de espera en el quirófano, las idas y venidas nos unió e hicimos un gran equipo. Gracias por todos los momentos compartidos, de risas, llantos, y bailes. Vas a llegar donde te propongas porque a tenacidad no te gana nadie.

Mi **Tere**, confidente dentro y fuera, un gran apoyo, menos mal que a pesar de todas las restricciones decidiste hacer unas prácticas, porque agradezco el que hayamos coincidido en esta etapa, ya sabemos, lo que no te mata, te hace más fuerte y nos une. Llegarás lejos porque eres una gran profesional.

Tampoco quiero olvidarme de los alumnos de prácticas que ha pasado por aquí, que, aunque breve, siempre venían con mucha energía: **Gema, Clara, Elena, Oscar, Corintia** etc. Y, sobre todo a **María**, doy gracias por haberte conocido, tu pasión, la alegría y la energía que tramites es contagiosa. No cambies nunca, eso te llevará lejos.

A las cuatro, solo os puedo decir que gracias por aguantarme, que os quiero mucho, y como decimos “lo que ha unido la ciencia, que no lo separe nadie”

A pesar de ser la veterana del grupo, la tercera generación, me enseñó más a mí que yo a ellas, las ganas y la energía inyectada fue esencial. Nunca imaginé que volvería a coincidir con mi profesora de carrera **Ana**, una persona meticulosa y siempre con una gran sonrisa, gracias por las charlas y consejos. **Noemi**, quien estaba siempre cuando se te necesitaba, eres estupenda. A mi nueva compi doctoranda **María**, una persona con ganas de aprender y con un potencial colosal, gracias de corazón por acompañarme en este último empujón de la tesis, llegarás muy lejos.

A las compañeras de la sexta, **Consuelo, Teresa y Claudia**, gracias por estar siempre dispuestas a ayudar en lo que necesitase, por todos los momentos compartidos.

A **Roque Ortíz González**, jefe del área del Área Científica y Técnica de Investigación (ACTI), agradecerle que nos cediese la biblioteca para poder resguardarnos en las noches de experimentos. Y aunque me resulta muy difícil resumir lo que han significado para mí toda la plantilla del Servicio de apoyo a la investigación de la Universidad de Murcia (SACE), a **Juana**, por ser mi gran apoyo en el laboratorio, por transmitirme sus conocimientos, por todos sus consejos y por cuidarme tanto. A **Silvia**, por nuestras charlas infinitas en los pasillos, a **Pepe y Toñi** por el conocimiento transmitido. A **Pilar, Vero y Rosario** gracias por toda vuestra ayuda.

Sin olvidarme de los colaboradores, **Olga y Fermín** de la facultad de farmacia de la universidad de Granada, gracias por ofrecernos vuestros conocimientos y la experiencia. A **Diego** y a **Fernando**, os estoy agradecida por vuestra paciencia y profesionalidad. Mención especial al Dr. **Luján**, sin cuya ayuda no habría sido posible realizar esta tesis doctoral sobre el tejido adiposo en humanos. Y por supuesto, gracias a todos los pacientes que, desinteresadamente, han participado en los estudios.

A mis amigos de toda la vida, a “The pains”, gracias por seguir allí, por aguantarme y escuchar mis batallitas, mis locuras de laboratorio, se os quiere hoy y siempre.

Por último, a mis padres, a ellos más que a nadie les estoy muy agradecida, sin su apoyo incondicional no hubiese sido posible. **Guido** por ser mi referente en humildad y trabajo, **Ana**, por tu amor incondicional y tus palabras tiernas siempre que lo necesitaba. Gracias a los dos por luchar y darme la mejor educación, os quiero mucho a los dos. A mi hermano, **Eduardo**, mi “Abo”, no podría haber tenido mejor hermano mayor, gracias por darme a mi sobrina **Emma**.

Y a **Carlos**, gracias por tu paciencia, tu amor incondicional y tu inquebrantable apoyo. Por creer en mí cuando más lo necesitaba, y alentarme a dar lo mejor de mí. Eres el causante de mis días más felices y estoy agradecida por tenerte a mi lado en este viaje.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	5
ÍNDICE	11
ABREVIATURAS.....	17
GLOSARIO.....	21
I. INTRODUCCIÓN	23
1. OBESIDAD.....	25
1.1. Definición de la obesidad	25
1.2. Clasificación de la obesidad.....	25
1.3. Breve origen e historia de la obesidad	26
1.4. Estado actual de la obesidad.....	27
2. FISIOLÓGÍA DEL TEJIDO ADIPOSO	29
2.1. Función y clasificación del tejido adiposo.....	29
2.2. Tamaño y localización del tejido adiposo blanco.....	30
2.2.1. Diferencias entre tejido adiposo visceral y subcutáneo	32
2.3. Lipólisis.....	33
3. OBESIDAD Y CRONODISRUPCIÓN.....	35
3.1. Introducción cronobiología	35
3.2. Explicación de los ritmos biológicos	37
3.3. Reloj central.....	38
3.4. Relojes periféricos	41
3.5. Interacción entre ritmos circadianos y obesidad.....	42
3.5.1. La obesidad como consecuencia de alteraciones circadianas	42
3.5.2. La obesidad como causa de alteraciones circadianas.....	43
4. RITMOS CIRCADIANOS EN EL TEJIDO ADIPOSO HUMANO	43
4.1. Sensibilidad del tejido adiposo a la insulina	45
4.2. Alteraciones en el ritmo circadiano de tejido adiposo con obesidad.....	46
5. HABITOS DE VIDA Y RITMOS CIRCADIANOS.....	48
5.1. Horario de la comida	49
5.1.1. Ayuno intermitente	51
5.2. Cenas tardías o trabajadores por turno (melatonina e insulina)	53

5.2.1. Melatonina y obesidad.....	56
5.3. Hábitos de sueño y siesta	57
II. OBJETIVOS.....	59
1. ESTADO ACTUAL Y OBJETIVOS.....	61
1.1. Objetivo general.....	62
1.2. Objetivos específicos	62
III. MATERIAL Y MÉTODOS	65
1. MATERIAL Y MÉTODOS COMÚN PARA TODOS LOS OBJETIVOS	67
1.1 Población de estudio	67
1.2. Mediciones antropométricas y composición corporal	68
1.3. Cuestionarios.....	74
1.4. Obtención y preparación de muestras biológicas.....	75
1.4.1. Preparación de muestras	75
1.4.2. Medición de tamaño de adipocitos	76
2. PROTOCOLO DEL OBJETIVO 1A Y 1B	78
2.1. Procedimiento común entre el objetivo 1A y 1B	78
2.2. Exclusivo del objetivo 1B.....	82
3. PROTOCOLO DEL OBJETIVO 2.....	82
4. PROTOCOLO DEL OBJETIVO 3.....	87
5. MÉTODO ESTADÍSTICO	92
5.1. Estadística del objetivo 1A	92
5.2. Estadística del objetivo 1B	93
5.3. Estadística del objetivo 2.....	94
5.4. Estadística del objetivo 3.....	95
6. ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO	96
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	97
RESULTADOS Y DISCUSIÓN DEL OBJETIVO 1A. ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE RITMOS CIRCADIANOS EN LIPASA SENSIBLE A HORMONA Y EL GEN <i>LIPE</i> EN EXPLANTES DE TEJIDO ADIPOSO HUMANOS: HORARIO DE COMIDA Y AYUNO.....	99
Existencia de ritmo circadiano.....	101

Existencia de ritmo circadiano robusto en LSH y <i>LIPE</i>	101
La acrofase de <i>LIPE</i> y LSH.....	104
Relación entre la lipasa sensible a hormona, gen <i>LIPE</i> con el horario de la comida y el ayuno.....	105
Relación del ayuno con la actividad de la LSH.....	106
Relación de la cena con la amplitud y porcentaje de ritmo de la LSH.....	108
Relación entre el tamaño de adipocitos y la actividad de LSH	112
Relación entre la amplitud de <i>LIPE</i> y la hora de la comida	114
RESULTADO Y DISCUSIÓN DEL OBJETIVO 1B. LA SIESTA Y <i>LIPE</i>: SIESTA Y RITMOS CIRCADIANOS DEL TEJIDO ADIPOSEO.....	117
Características de la población	119
Existencia de ritmo circadiano.....	121
Existencia de ritmo circadiano robusto en <i>LIPE</i>	121
Características de los parámetros de los ritmos circadianos de 24 h de <i>LIPE</i>	126
Existencia de ritmo circadiano robusto en la LSH.....	128
Características de los parámetros de los ritmos circadianos de LSH.....	130
Relación entre los parámetros de ritmo y los hábitos de vida y las características de la población	131
Relación entre las características metabólicas y la duración de siesta	132
RESULTADO Y DISCUSIÓN DEL OBJETIVO 2. EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A LA INSULINA EN EL TEJIDO ADIPOSEO EXPUESTO A MELATONINA.....	135
La melatonina y la señalización de insulina	137
Característica de la población de estudio.....	137
Tratamiento simultaneo de melatonina e insulina	139
Sensibilidad nocturna de la insulina a la melatonina	142
Genes implicados en el tratamiento simultaneo de insulina + melatonina.....	145
RESULTADO Y DISCUSIÓN DEL OBJETIVO 3. VARIACIÓN DE LA LIPÓLISIS EN EXPLANTES DE TEJIDO ADIPOSEO HUMANOS: AYUNO INTERMITENTE.....	157
Características de la población	159
Variación en la liberación de glicerol en distintos momentos del día (24 h)	160

Liberación de glicerol total (24 h) entre los distintos tratamientos.....	162
Movilización de grasa en condición de mañana y noche.....	165
Comparación entre eTRE y dTRE según las horas de ayuno	168
VI. CONCLUSIÓN	173
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	177
VIII. ANEXOS.....	207
CUESTIONARIOS.....	209
IX. CONTRIBUCIÓN CIENTÍFICA.....	219
Contribuciones a congresos nacionales	222
Contribuciones a seminarios internacionales	222

ABREVIATURAS

A	Amplitud
AC	Adenil ciclasa
ADF	Alternative fast day (Ayuno Alterno)
ADIPOR1	“Adiponectin receptor”, receptor de adiponectina
AGL	Ácidos grasos libres
AR	Receptor adrenérgico
ATP	Adenosín trifosfato
BAT	“Brown adipose tissue”, Tejido adiposo marrón
BMAL1	Brain and muscle ARNT-like protein
cAMP	Adenosín-monofosfato cíclico
CCGs	Genes controlados por los genes reloj (siglas en inglés: clock controlled genes)
CD	Cronodisrupción
cGMP	Guanosín trifosfato cíclico
CLOCK	Circadian locomotor out-put cycles kaput
CRY	Cryptochrome
DAG	Diacilglicéridos
DS	Desviación estándar
dTRE	“Delay time restricted eating” Alimentación restringida en el tiempo tardío
eTRE	“Early time restricted eating”, Alimentación restringida en el tiempo temprano
EEM	Error Estándar de la Media
GPCR	Receptores acoplados a proteína G
GTP	Guanosín trifosfato

IC	Intervalo de confianza
IL6	Interleuquina 6
IMC	Índice de masa corporal
INE	Instituto nacional de estadística
LEPR	“Leptin receptor”, receptor de leptina
LSH	Lipasa sensible a hormona
M	Mesor
MAG	Monoacilglicérido
MGL	Monoglicérido lipasa
NR1D1	Miembro 1 del grupo D de la subfamilia 1 de receptores nucleares
P	Periodo
PAS	Period circadian protein-Aryl hydrocarbon receptor nuclear-Single minde protein
PBS	“Phosphate buffered saline”, Tampón fosfato salino
PER	“Period”, periodo
PKA	Proteína Kinasa A
pL	Picolitro
PLIN1	Perilipina 1
PN	Péptidos natriuréticos
PNA	Péptidos natriuréticos A
PNB	Péptidos natriuréticos B
PPARα	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha
PR	Porcentaje de ritmicidad
REV- ERBα	Receptor nuclear subfamilia 1 grupo D miembro 1

RORα	RAR-related orphan receptor alpha
SCN	“suprachiasmatic nucleus”, Núcleo supraquiasmático
SMet	Síndrome metabólico
t0	Acrofase
TA	Tejido adiposo
TAG	Triacilglicéridos
TAS	Tejido adiposo subcutáneo
TAV	Tejido adiposo visceral
TNF α	Factor de Necrosis Tumoral α
TRE	Time restricted eating (alimentación restringida en el tiempo). Término usado en humanos.
TRF	Time restricted feeding (alimentación restringida en el tiempo). Término usado en animales.
WAT	“White adipose tissue”, Tejido adiposo blanco

GLOSARIO

Acrofase	Momento de mayor expresión de proteínas y genes que se alcanza durante el ciclo diario de una variable.
Alimentación restringida en el tiempo	Estrategia dietética que consiste en ajustar las horas de alimentación en una única franja horaria.
Amplitud	Diferencia entre el valor máximo (o mínimo) de la función coseno con respecto al mesor.
Cosinor	Procedimiento para el análisis de ritmos biológicos basado en la adaptación de datos brutos a una onda cosenoidal.
Cronodisrupción	Estado de alteración del ritmo circadiano afectando al funcionamiento óptimo del ciclo de 24 horas.
Genes reloj	Genes implicados en generar y mantener el ritmo circadiano.
Jet lag social	Síndrome que ocurre cuando nuestros horarios sociales no coinciden con el reloj biológico de nuestro cuerpo. Se calcula con la diferencia entre el promedio de sueño de los días no laborables y el promedio de los días no laborables (entre semana y fines de semana). Cuando esta diferencia es mayor a 2 h se considera que existe jet lag social.
Lipólisis	Proceso bioquímico que consiste en la ruptura de células de Triacilglicéridos en ácidos grasos libres y glicerol, esto se traduce en movilización de grasa.
Mesor	Valor medio del ritmo ajustado a una función coseno que por lo general coincide con la media de los datos.
Núcleo supraquiasmático	Llamado también reloj central, está situado en el hipotálamo, y se encarga de regular los ciclos circadianos. Es el principal reloj biológico interno o marcapasos en los mamíferos.
Ritmo circadiano	Procesos naturales 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.
Zeitgebers	Término alemán que procede del Zeit “tiempo” y geber “dador”, hace referencia a señales ambientales capaces de modificar la duración del ciclo o período al que oscila nuestro reloj endógeno.

I. INTRODUCCIÓN

1. OBESIDAD

1.1. Definición de la obesidad

La obesidad se define como una acumulación excesiva o anormal de tejido adiposo (TA) que puede ser perjudicial para la salud [1]. Es un estado crónico de alta prevalencia en España y en la mayoría de los países del mundo [2], por lo que se considera como uno de los problemas más relevantes en la salud pública actual [3, 4].

1.2. Clasificación de la obesidad

A mediados del siglo XIX, Adolphus Quetelet observó que el peso corporal era proporcional al cuadrado de la altura en adultos con constitución estándar (kg/m^2); desde entonces se viene usando el índice de Quetelet [5], más conocido como índice de masa corporal (IMC) para el diagnóstico de la obesidad. Usándose tanto en la práctica clínica como epidemiológica.

Acorde al IMC, un individuo puede clasificarse en cualquiera de las siguientes categorías [6] observadas en la siguiente tabla (**Tabla 1**).

Tabla 1. Percentil de clasificación de IMC.

Clasificación	IMC (kg/m^2)
Bajo peso	<18,5
Normo peso	18,5-24,9
Sobrepeso	25 - 29,9
Obesidad clase I	30-34,9
Obesidad clase II	35-39,9
Obesidad clase III	≥ 40
Tabla elaborada con los resultados obtenidos por WeirCB, <i>et al.</i> (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31082114/)	

Esta es la medida más usada para el diagnóstico de la obesidad, aunque sabemos que un diagnóstico basado solo en el uso de IMC es impreciso para un verdadero conocimiento de la composición corporal. Esto se debe a que no diferencia la masa grasa de la masa magra [7]; un ejemplo de ello lo podemos encontrar en personas con un IMC elevado, categorizados como individuos con

obesidad, pero que no reflejan signos de complicaciones metabólicas. Aun así, el IMC es el método estandarizado y aceptado internacionalmente para la clasificación del grado de obesidad y el riesgo asociado a ella [6]. Por ello, hoy en día se complementa con otras técnicas para el análisis de composición corporal como lo son la: impedanciometría, plicometría, resonancia magnética, etc.[8].

1.3. Breve origen e historia de la obesidad

La postura sobre la obesidad no siempre ha sido la misma. Aunque nuestros inicios fueron de carácter nómada cazador-recolector con una vida muy activa en el paleolítico; el hallazgo de diversas esculturas paleolíticas como la venus de Willendorf o de Hohle Fels [9, 10] mostraron un reflejo de la posible constitución humana (**Figura 1**). Sin embargo, la obesidad de décadas pasadas era probablemente una excepción, debido a la escasez de alimentos y a la desnutrición crónica, que ha sido la norma la mayor parte de nuestra historia, por lo que los cuerpos voluminosos se vinculaban al bienestar social y económico [11]. No fue hasta la época de la antigua Grecia cuando diferentes pensadores como Hipócrates y Platón asociaron el aspecto orondo con una disminución de la esperanza de vida y, por tanto, con una muerte prematura [12].

El término “obeso” fue usado por primera vez en 1920, por el médico británico Tobias Venner [13], para describir a personas que tenían sobrepeso.

En la actualidad, el desarrollo de la industria alimentaria, que es continuo e incesante, el fácil acceso a alimentos de elevada densidad energética, el aumento del tamaño de las raciones y la disminución de la actividad física; junto con la presencia de otros factores ambientales, metabólicos, hormonales y genéticos propios del hombre moderno, que presentan un impacto sobre la obesidad, ha supuesto que, desde hace unas décadas, la incidencia de obesidad haya aumentado de manera vertiginosa y que últimamente se considere una epidemia global [14, 15].

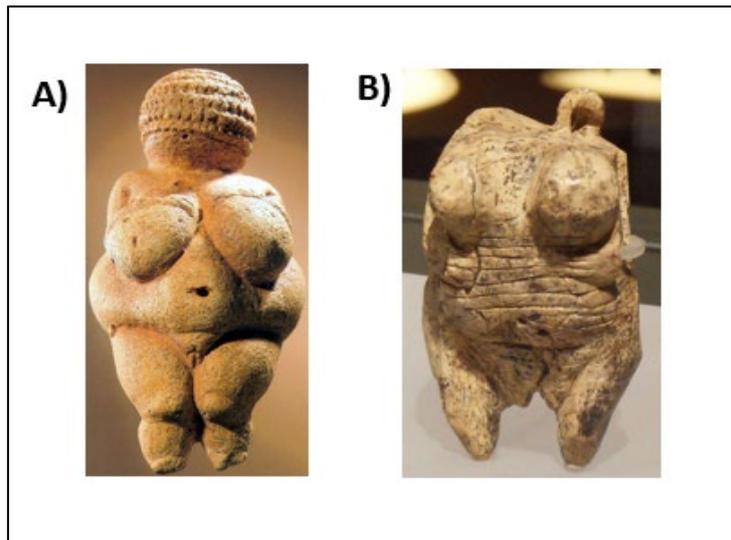


Figura 1. Representaciones femeninas humanas: A) Venus de Willendorf y B) venus de Hohle Fels [9, 10].

1.4. Estado actual de la obesidad

A pesar de la gran información que dispone la sociedad sobre las consecuencias que conlleva el aumento de peso, la situación actual no es muy prometedora. Se estima que para el año 2030 un billón de la población mundial padecerá obesidad, según los datos de la IOTF (“International Obesity Taskforce”, según sus siglas en inglés) [2] (**Tabla 2**).

Hace 14 años (en el año 2010), los datos eran preocupantes, como podemos observar en la Tabla 2, pero el pronóstico en los próximos 6 años parece ser aún peor.

A pesar de estas previsiones, la sociedad actual sigue normalizando y banalizando la obesidad.

Tabla 2. Estimación global sobre la prevalencia y número de adultos viviendo con obesidad en 2010-2030.

Prevalencia de obesidad (IMC kg/m ²)	2010		2025		2030	
	Porcentaje	N.º millones	Porcentaje	N.º millones	Porcentaje	N.º millones
≥30	11	511	15	892	18	1,025
≥35	3	143	5	284	6	333
≥40	1	42	2	93	2	111

Información procedente de NCD Risk Factor Collaboration (NCD-Risk).
(<https://www.worldobesityday.org/resources/entry/world-obesity-atlas-2022>)

En España, según el instituto nacional de estadística (INE), en el 2020 el grado de obesidad y sobrepeso era superior en hombres (16,5% de obesidad) que en mujeres (15,5% de obesidad). Y el porcentaje de individuos que padecen sobrepeso es también superior en hombres (44,9% de sobrepeso) que en mujeres (30,6% de sobrepeso) (**Figura 2**).

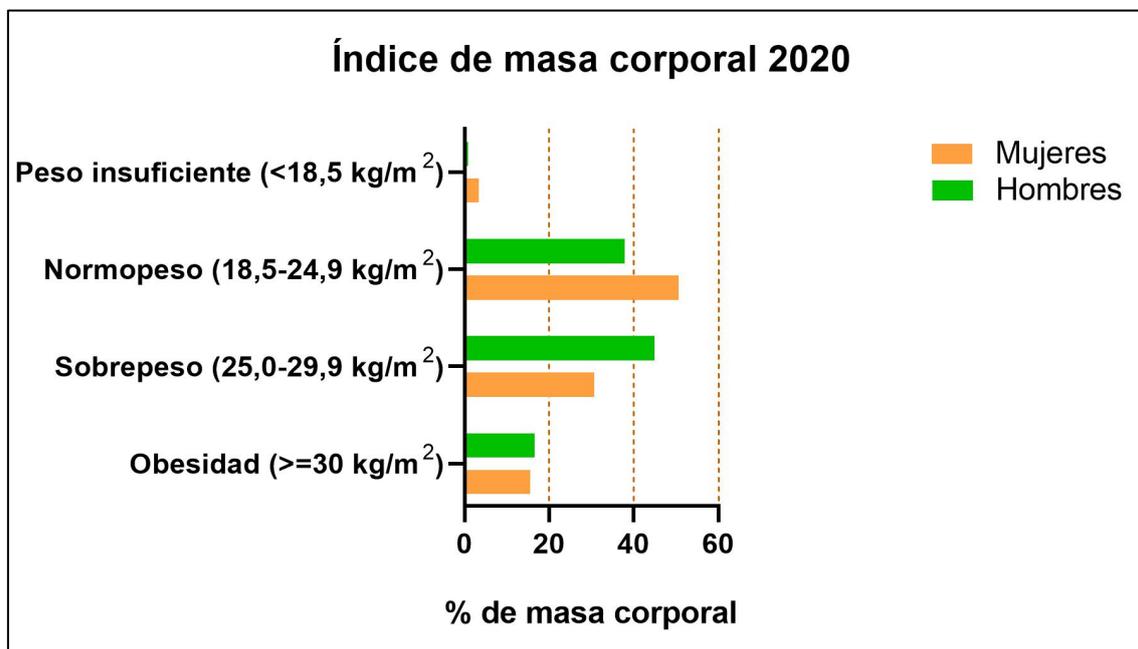


Figura 2. Índice de masa corporal 2020. Información obtenida del Instituto Nacional de Estadística (https://www.ine.es/ss/Satellite?L=es_ES&c=INESeccion_C&cid=1259926457058&p=%5C&pagename=ProductosYServicios%2FPYSLayout).

La obesidad severa es una condición que aumenta exponencialmente el riesgo de complicaciones relacionadas con la misma obesidad debida a su excesiva cantidad de TA [16]. Como podemos observar en la Tabla 2 la proporción estimada de obesidad severa para 2030 supera con respecto a la registrada en 2010 [2]. Los tratamientos más usados para el control de la obesidad severa van desde la terapia de modificación del estilo de vida, pasando por la cirugía bariátrica tanto en adultos como en niños [17, 18], hasta la farmacoterapia, con los últimos avances demostrados en el uso de los análogos de GLP1, como Ozempic o Adlyxin, que están demostrando una eficacia considerable en el tratamiento de la obesidad [19].

2. FISIOLÓGÍA DEL TEJIDO ADIPOSO

2.1. Función y clasificación del tejido adiposo

El exceso TA es la característica principal en la obesidad y, en especial, en la obesidad severa. Durante muchos años se ha pensado que la función más destacada del TA era actuar como almacén de reserva y liberación de energía. Lejos de la realidad, en la actualidad el TA es considerado el mayor órgano endocrino implicado en la secreción de hormonas peptídicas y mediadores inmunológicos e inflamatorios como las citoquinas y adipocinas. Es por ello, que el TA juega un papel importante en la regulación de la homeostasis general del cuerpo [20, 21].

El adipocito se considera la unidad básica funcional del TA, pero además este tejido, también está compuesto por células no grasas como los macrófagos, los fibroblastos, células inmunes, tejido conectivo y vascular [22].

Hasta el momento, se han descrito tres subclases de tejido adiposo: el tejido adiposo blanco, WAT (“White Adipose Tissue” por sus siglas en inglés), el tejido adiposo marrón, BAT (“Brown Adipose Tissue” por sus siglas en inglés) y el tejido adiposo beige o brite (“Brown in whiTe” por sus siglas en inglés). El WAT es el más abundante dentro del TA, y encargado principalmente de la reserva general de energía en forma de triacilglicéridos (TAG). En este tejido WAT, el 90-95% del volumen de sus células (adipocito blanco) está ocupado por una gran gota lipídica y alguna mitocondria [23]. El BAT, se encuentra en mucha menor

proporción que el WAT en humanos y su función es la termorregulación, es decir, la de producir calor. Esto se debe a que posee grandes cantidades de mitocondrias y numerosas gotas lipídicas de pequeño tamaño en su interior [23]. Por último, el tercer tipo de tejido adiposo es el denominado “beige” o “brite”. Estos adipocitos tienen morfología y propiedades termogénicas similares a los adipocitos marrones, pero distinta localización anatómica. El origen de este nuevo tipo sigue siendo cuestionado, se ha propuesto que el TA beige procede de la diferenciación de los adipocitos blancos maduros, lo que se conoce como “pardeamiento de tejido adiposo blanco” o que directamente el tejido beige proviene de un precursor propio [23, 24].

2.2. Tamaño y localización del tejido adiposo blanco

En función de la localización del WAT podemos encontrar: tejido adiposo subcutáneo (TAS), que en el humano abunda debajo de la piel y predomina en los extremos superiores e inferiores del cuerpo; este tejido adiposo subcutáneo constituye aproximadamente el 80% del WAT, mientras que el tejido adiposo visceral (TAV) conforma el resto de WAT en un (20%), y corresponde a la grasa omental y mesentérica, predominando en la cavidad abdominal [25].

Actualmente sabemos que no sólo la cantidad de tejido adiposo acumulado, sino la distribución de los depósitos de grasa es relevante en las alteraciones metabólicas asociadas con la obesidad [26]. El TAS y el TAV, presentan patrones diferentes de secreción hormonal, lo que hace que la localización juegue un papel importante en la salud del individuo. Si bien el TAV se localiza en el abdomen alrededor de las vísceras (localización central), y es por tanto el responsable de la obesidad central, es el que menos espacio ocupa en el organismo en comparación con el TAS. Varios estudios han podido observar que un mayor acumulo de adiposidad central está ligado al riesgo de desarrollar diabetes y trastornos cardiovasculares, lo que viene dando lugar a un cuadro de síndrome metabólico (SMet) [27-29]. En la **Tabla 3** se presentan los factores que contribuyen al desarrollo del SMet basadas en la definición aportada por ATP-III, del inglés Adult Treatment Panel III [30].

Tabla 3. Factores de Riesgo de Síndrome Metabólico.

Factor de riesgo	Definición
Obesidad abdominal	Circunferencia de la cintura > 102 cm en hombres > 88 cm en mujeres
Triglicéridos altos	≥ 150 mg/dL o ≥ 1,7 mmol/L
Colesterol HDL bajo	< 40 mg/dL o < 0,9 mmol/L en hombres < 50 mg/dL o < 1,1 mmol/L en mujeres
Hipertensión arterial	≥ 130/≥ 85 mmHg
Hiperglucemia en ayunas	≥100mg/dL o ≥5,5 mmol/L
Datos obtenidos de ATP-III [30]	

El paso de un fenotipo delgado a uno obeso viene acompañado de la expansión del TA, ya sea en tamaño y/o número de adipocitos. Si lo que predomina es el aumento del número de adipocitos, estaremos hablando de *hiperplasia*, que se caracteriza por un estado en el que hay muchos adipocitos de tamaño pequeño; mientras que el aumento en tamaño de los adipocitos se llamara *hipertrofia*, caracterizado por un estado en el que hay pocos adipocitos, pero de gran tamaño [31].

Durante mucho tiempo se creyó que el número de adipocitos formados durante la infancia era predictor para saber si un individuo iba a ser delgado u obeso de mayor [32]; sin embargo, a día de hoy sabemos, gracias al uso de la técnica del carbono-14, que durante la vida adulta se produce una renovación anual del 10% de los adipocitos [33]. Varios estudios transversales asocian la *hipertrofia* del adipocito con una peor salud metabólica [34, 35], dado que en sujetos con obesidad y sin obesidad con SMet, se observó un tamaño de adipocitos mayor que en sujetos de peso normal [36, 37]. Por otro lado, nos encontramos que, una vez alcanzado el límite de 200µm de diámetro, los lípidos se depositan en otros órganos no destinados al acúmulo de grasa, como el hígado, el corazón, etc., provocando lo que se conoce como lipotoxicidad y dando como resultado el desarrollo de complicaciones metabólicas [38].

También se ha visto que los adipocitos de mayor tamaño liberan una mayor cantidad de citoquinas inflamatorias y tienen un ratio de lipólisis aumentado respecto a los adipocitos más pequeños [28, 39], siendo esto un factor de desarrollo de problemas metabólicos.

2.2.1. Diferencias entre tejido adiposo visceral y subcutáneo

Las diferencias anatómicas, fisiológicas y bioquímicas entre TAV y TAS juegan un papel importante en cuanto a sensibilidad a la insulina, actividad lipolítica y liberación de proteínas inflamatorias, por lo que puede explicar por qué el tejido adiposo visceral se asocia más con problemas metabólicos que el tejido adiposo subcutáneo [40].

La vascularización de ambos tejidos también muestra diferencias, el drenaje venoso del TAS es sistémico [25], mientras que el sistema de drenaje venoso del TAV tiene como objetivo principal el hígado, lo que puede aumentar el riesgo de enfermedad hepática y disfunción metabólica [40].

Dentro de las diferencias moleculares, se ha observado que el TAV tiene grandes cantidades de macrófagos [41], siendo estos una fuente de TNF- α e IL-6, lo que da lugar a una mayor respuesta inflamatoria que en TAS [42, 43]. Además, la actividad inflamatoria está asociada al proceso de envejecimiento y alteración en la capacidad de replicarse de los adipocitos, a lo que se le conoce como senescencia [44].

La ratio de lipólisis, es decir la proporción de la tasa de descomposición de los Triacilglicéridos (TAG) en ácidos grasos libres y glicerol, también presenta diferencias entre subtipos de TA. En varios estudios *in vitro* se ha observado una alta actividad lipolítica en adipocitos viscerales [25]. Uno de los órganos más afectados por el aumento de liberación de ácidos grasos libres (AGL) es el hígado, y varios estudios han observado un aumento de las concentraciones de IL-6 en vena porta durante la lipólisis [45, 46]. Por otro lado, la disminución de grasa visceral se asoció a la reducción del estado inflamatorio en pacientes con SMet [47]. Estos y otros múltiples estudios señalan al tejido visceral como un tejido metabólicamente más activo que el subcutáneo.

2.3. Lipólisis

La movilización de las reservas de energía se realiza mediante un proceso denominado lipólisis, caracterizado por la hidrólisis, es decir, la rotura de los TAG en ácidos grasos libres y glicerol [48]. Periodos de restricción energética y actividad física, ponen en marcha a los mayores reguladores de la lipólisis, como son las catecolaminas y los péptidos natriuréticos. Tras la liberación de neurotransmisores, como la epinefrina y la norepinefrina, éstos se unen a sus receptores adrenérgicos, AR (“adrenergic receptors”, por sus siglas en inglés) localizados en el adipocito, en humanos. Los receptores de catecolaminas tienen dos isoformas específicas ($\beta 1$ y $\beta 2$) que pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G, GPCR (“G protein-coupled receptors”, por sus siglas en inglés); La unión de las catecolaminas a estos receptores hace que la proteína G interactúe con la adenilil ciclasa (AC), activándola y convirtiendo el trifosfato de adenosina (ATP) en adenosin monofosfato cíclico, cAMP (“Cyclic adenosine monophosphate”, por sus siglas en inglés). El aumento de las concentraciones de cAMP es el desencadenante de la activación de la proteína quinasa A, PKA (“Protein Kinase A”, por sus siglas en inglés), encargada de fosforilar la proteína perilipina 1, PLIN1 (“lipid droplet-associated protein perilipin 1”, por sus siglas en inglés) que se encuentra rodeando a la gota de lípido, y a su vez a la lipasa sensible a hormona (LSH) o HSL (“Hormone-Sensitive Lipase”, por sus siglas en inglés). Al activarse la PLIN1 facilitará la lipólisis favoreciendo la acción de una serie de enzimas fundamentales para la hidrólisis de TAG, entre ellas la translocación de la LSH a la gota lipídica [49, 50] (**Figura 3**).

Existen dos tipos de péptidos natriuréticos (PN): del tipo A (PNA) y del tipo B (PNB). El tipo A (PNA) es capaz de unirse a su receptor que se encuentra en el adipocito, el cual está vinculado a la guanilil ciclasa (GC). La unión del PNA a su receptor hará que la GC convierta el guanósín trifosfato (GTP) en guanósín monofosfato cíclico, GMPc (“Cyclic guanosine monophosphate”, por sus siglas en inglés). Esto da lugar a la activación de la PKG (también conocida como proteína quinasa) y, al igual que la PKA, esta quinasa activa la cascada lipolítica mediante la fosforilación de PLIN1 y de la LSH [48, 51]. Para romper los triglicéridos en diacilglicéridos (DAG) es necesaria la activación de la enzima triglicérido adiposo lipasa (ATGL) que requiere una proteína coactivadora (CGI-

58) y que se pone en marcha gracias a la fosforilación de la PLIN1. La activación de esta enzima ATGL, se produce junto con la activación de LSH para acelerar el proceso de lipólisis, siendo ATGL y LSH las encargadas de hidrolizar alrededor del 95% del TAG [52]. La lipólisis comienza gracias al inicio de esta cascada de degradación de los TAG descomponiéndose en diacilglicéridos (DAG). A continuación, mediante la actuación únicamente de la enzima lipasa sensible a hormona (LSH), se descompondrá el DAG en monoacilglicérido (MAG) y, sobre este último, actuará la enzima monoglicérido lipasa (MGL), que será la encargada de terminar la hidrolisis dando lugar a los ácidos grasos libres y glicerol, que viajarán a través del torrente sanguíneo [52-54] (Figura 3).

De todas estas enzimas y factores implicados en la lipólisis, la LSH se considera la principal enzima reguladora ya que es de las primeras enzimas en estar presente y la predominante en la cascada de lipólisis [50, 55, 56].

La lipólisis también se ve regulada por factores endocrinos, gracias a la acción de diferentes hormonas como puede ser la leptina, la hormona de crecimiento, la hormona tiroidea, el cortisol, la paratohormona [48], etc. El mayor agente antilipolítico es la insulina, ya que inhibe la lipólisis bloqueando la activación de PKA, como consecuencia de la disminución de cAMP [51].

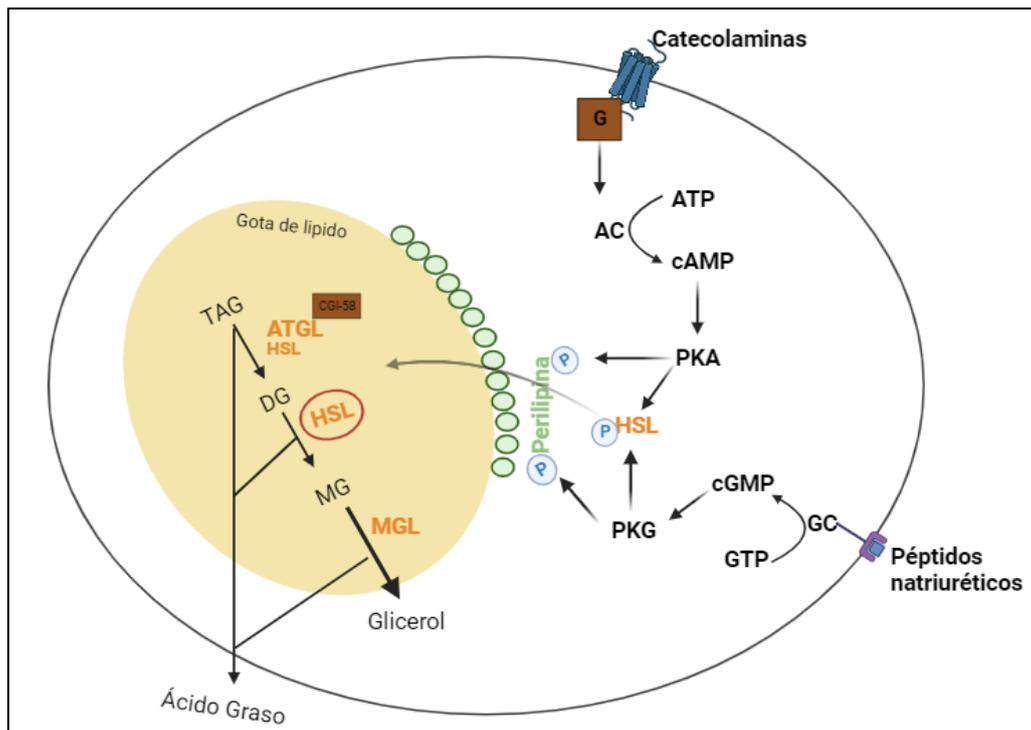


Figura 3. Lipólisis en los adipocitos. Adenil ciclasa (AC), Adenosín trifosfato (ATP), Adenosín monofosfato cíclico (AMPc), Proteína quinasa A (PKA), Guanilil ciclasa (GC), Guanosín trifosfato (GTP), Guanosin monofosfato cíclico (GMPc), proteína quinasa G (PKG), triacilglicerol (TAG), diacilglicerol (DG), monoacilglicerol (MG), lipasa de triglicéridos adiposos (ATGL), lipasa sensible a las hormonas (LSH), monoacilglicerol lipasa (MGL). Creación propia mediante el uso del programa Biorender. Fuente [49, 50, 52].

3. OBESIDAD Y CRONODISRUPCIÓN

3.1. Introducción cronobiología

Prácticamente todos los mamíferos exhiben cambios fisiológicos internos como consecuencia de los cambios externos del medio ambiente. La importancia de estos cambios fisiológicos en respuesta al ambiente radica en que estos ritmos de 24 h se repiten diariamente, y son endógenos, **un ritmo circadiano** se refiere a un ritmo diario de circa, alrededor; y diario, de día, que se produce de manera endógena, y que es inherente a la fisiología del animal. Lo interesante de estos ritmos circadianos, es que, aunque endógenos, son capaces de adaptarse al ambiente, en especial a los cambios de luz/oscuridad, aunque se sabe que también pueden responder a otros sincronizadores ambientales, como son los cambios de temperatura, actividad, o cambios de ayuno/ingesta [57]. Esta capacidad de adaptación favorece la vida del animal, ya que, si las condiciones

ambientales son constantes, el animal puede “predecir” lo que va a pasar, y preparar su fisiología para lo que va a suceder. Es decir, el sistema circadiano pone en hora a todos los órganos y tejidos, para que estén preparados para los cambios ambientales, de luz y oscuridad, entre otros.

Y es que la vida está marcada por ritmos, patrones de repetición que se producen a causa de la rotación de la tierra sobre su eje. Nuestro propio organismo es capaz de anticiparse a los cambios que se van a producir en el ambiente gracias al reloj biológico, asegurándose de que nuestro organismo “hará lo correcto” en el momento correcto del día. La sincronía de nuestro organismo con el entorno exterior e interior es fundamental para nuestro bienestar ya que la desincronización puede acarrear problemas metabólicos entre otros.

El paso del día a la noche es un cambio brusco en la naturaleza. Biológicamente, los humanos somos animales diurnos, ya que estamos diseñados para realizar actividades durante el día y descansar por la noche.

Se considera que un individuo presenta una adecuada **salud circadiana** cuando sus ritmos biológicos son adecuados para sus necesidades, es decir que presentan elevada amplitud, la frecuencia necesaria, y según el tipo de función fisiológica, tendrán una hora de máxima actividad, llamada acrofase. Lo importante es que estos ritmos endógenos estén alineados con el medio ambiente [58]. Cuando esta situación se altera, y se produce un desalineamiento, nos referimos a cronodisrupción (CD), que se asocia directamente con patologías como la obesidad, entre otras [59].

En definitiva, la CD se define como una alteración de los ritmos circadianos internos como consecuencia del desajuste con el entorno [60]. Esta situación se produce de manera evidente en los trabajadores por turnos, ya que su reloj endógeno no es capaz de predecir lo que va a suceder, ya que presenta en general, sincronizadores externos ambientales, pues las fases de sueño y vigilia van a cambiar en los diferentes días de la semana [61]. Otra situación mucho más frecuente en la sociedad actual es el “Jetlag social” que se refiere al cambio en los horarios de sueño entre los días de trabajo, y los fines de semana [62]. Un reciente metaanálisis realizado por nuestro grupo ha mostrado que este jetlag

social, se asocia con obesidad y alteraciones metabólicas [63]. De hecho, varios estudios han demostrado que la cronodisrupción circadiana, ya sea causada por factores medioambientales (Jetlag social, exposición luz artificial-nocturna, horario de comida a destiempo, etc.) o por alteraciones genéticas (cambios en la expresión en ciertos genes reloj por presencia de ciertas variantes genéticas [64], o como consecuencia de cambios epigenéticos [65, 66], se ha visto que repercute en el metabolismo de los lípidos [67] (en la acción de varias hormonas (insulina, glucagón, hormona del crecimiento, cortisol, leptina y ghrelina)) muy ligadas a las señales de hambre y saciedad, lo que podría acelerar el desarrollo de la obesidad [68, 69]. Así mismo, otros estudios relacionan la cronodisrupción con otras patologías, como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y envejecimiento prematuro [59, 70, 71].

3.2. Explicación de los ritmos biológicos

Existen diferentes patrones de ritmos biológicos que se diferencian por la duración de su periodo, entre los diferentes ritmos encontrados tenemos los ritmos ultradianos, aquellos con una periodicidad inferior a 24 horas como son la frecuencia cardíaca y respiratoria; los ritmos que duran más de un día, también llamados ritmos infradianos, como es el ciclo menstrual; y los ritmos circadianos, que ya hemos introducido y que son aquellos que se repiten cada 24 horas como: el ciclo vigilia-sueño [72]. Los ritmos a los que nos vamos a referir en esta memoria son los ritmos circadianos.

El estudio de los ritmos circadianos se remonta al siglo XVIII, cuando el astrónomo francés Jean-Jacques d'Ortous de Mairan observó que los movimientos diarios de la planta *mimosa púdica*, que se producían en presencia de luz solar, se mantenían estando la planta aislada en el interior y exenta de luz solar [73]. Esto sugería, que los movimientos mecánicos diarios de esta planta eran endógenos, ya que funcionaban incluso cuando no había cambios en las condiciones ambientales, y en su principal sincronizador que es la luz. Este trabajo, junto al trabajo de Colin Pittendrigh [74] sobre el ritmo circadiano en moscas de la fruta, y el estudio en humanos realizados por Jürgen Aschoff, fueron las investigaciones clave que asentaron las bases de la cronobiología [75]. El reconocimiento de la cronobiología como ciencia de importancia en la

medicina, se ha producido recientemente, gracias a la concesión del premio nobel al cronobiólogo Michael Rosbash, en el año 2023, por su contribución a descifrar los engranajes moleculares del reloj biológico que controlan los ritmos circadianos en la mosca de la fruta [76].

Ejemplos de ritmos circadianos, cuya periodicidad se acerca a las 24 horas, son: los ciclos de sueño/vigilia, ingesta/ayuno, la secreción hormonal tales como el cortisol, la melatonina, insulina, etc. [72]. Todos estos procesos rítmicos los estudia la cronobiología, cuya palabra proviene de términos griegos: *kronos* de “tiempo”, *bio* de “vida” y *logos* de “estudio”, y se define como la ciencia que estudia los ritmos biológicos de los organismos vivos [77].

3.3. Reloj central

El sistema circadiano de los mamíferos es el encargado en generar los ritmos circadianos y desencadenar la sincronización con el entorno, se organiza como un entramado de estructuras jerárquicas.

Todo empieza en el marcapasos o reloj central, que se encuentra situado en el hipotálamo, en el núcleo supraquiasmático (SCN, “suprachiasmatic nucleus, por sus siglas en inglés”) y que está compuesto por más de 20.000 neuronas. La relevancia de su papel en fisiología y medicina, surgió al observar como el daño producido en el SCN en roedores era capaz de producir interrupciones en los ritmos circadianos endocrinos [78, 79] mientras que al trasplantar un SCN sano en aquellos animales, se restauraban gran parte de esos ritmos [80]. Llamamos sincronizador “zeitgeber” a cualquier señal del medio ambiente capaz de estimular los relojes biológicos, siendo la luz el principal sincronizador del SCN. En este caso, al penetrar la luz por los ojos, se produce la conducción de la información fótica gracias a células ganglionares de la retina que contienen un fotorpigmento conocido como melanopsina, una proteína muy fotosensible implicada en la percepción del brillo así como de los patrones de baja frecuencia, que envían las señales mediante vía tracto retino hipotalámico la información al reloj central (NSQ) [81, 82].

Aunque la luz es el principal sincronizador del sistema circadiano en el ser humano, no es el único, existen otras entradas de estímulos capaces de poner

en hora el sistema circadiano, como son los ciclos de ayuno/ingesta, actividad/reposo y temperatura (**Figura 4**).

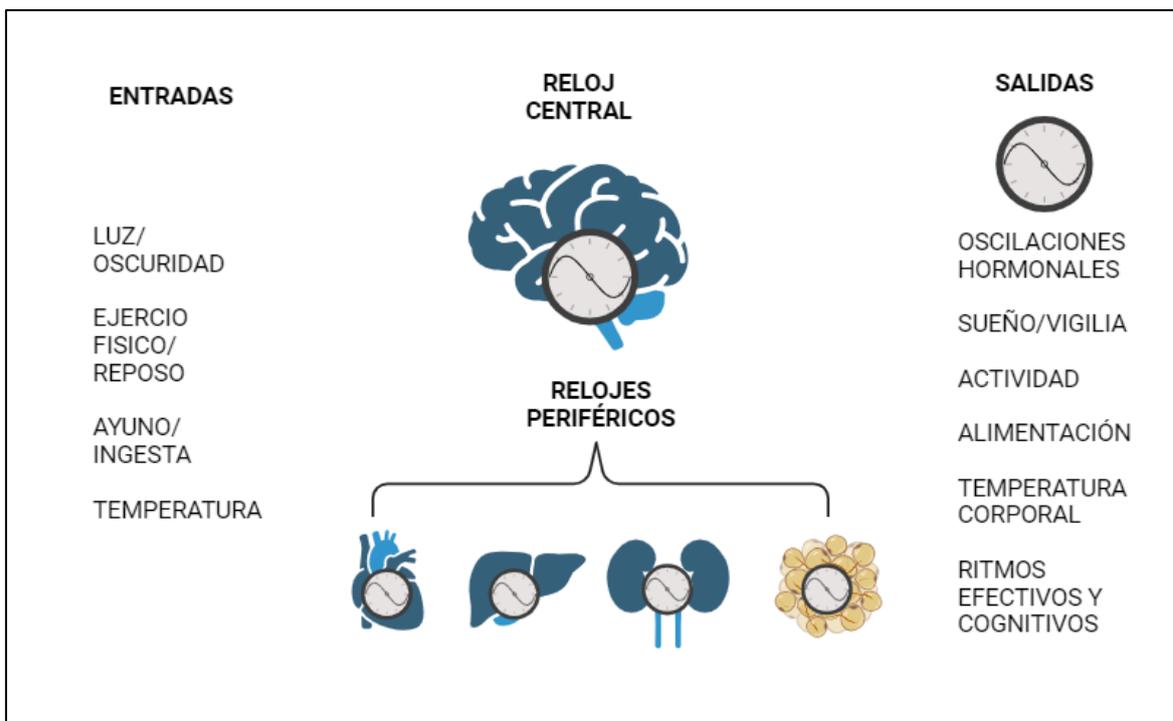


Figura 4. Organización general del sistema circadiano en mamíferos. Compuesto por el reloj central, que coordina la actividad de los relojes periféricos; las señales de entradas, encargadas de mantener la sincronización con el ciclo natural de 24 horas; y las de salida, las consecuencias de la actividad de los diferentes relojes, que se manifestarán en ritmos que podemos detectar en el organismo. (Figura adaptada de Madrid JA, 2019. Fuente “Ritmos relojes y tiempo”). Figura diseñada en Biorender.

En lo que se refiere al mecanismo molecular, el control de la expresión de los ritmos circadianos se realiza a través de los denominados “genes reloj”. Estos genes codifican una serie de proteínas que generan mecanismos de autorregulación mediante bucles de retroalimentación transcripcionales positivos y negativos [83]. El *CLOCK* (Circadian Locomotor Out-put Cycles Kaput) y el *BMAL1* (“Brain and Muscle ARNT-Like protein 1”, por sus siglas en inglés) se conocen como genes positivos. Son dos proteínas con estructura de hélice-bucle-hélice que contienen dominios PAS (“Per-Arnt-Sim”, por sus siglas en inglés) que permiten la unión proteína-proteína para factores de transcripción. La heteromerización de *CLOCK/BMAL1* tiene lugar en el citoplasma y se transloca al núcleo activando la transcripción de *PER* (period) y *CRY* (cryptochrome) que son los componentes negativos del bucle de retroalimentación. La traslocación y

acumulación de estas enzimas en el citoplasma deriva en la heteromerización del complejo PER/CRY que se traslada al núcleo para interactuar con el heterodímero CLOCK/BMAL1 inhibiéndolo, a la vez que inhibe también su propia síntesis. Paralelamente, se induce la expresión del gen *NR1D1*, el cual codifica la proteína REV-ERB α y el receptor ROR α , que desactivan y activan respectivamente la transcripción de *BMAL1* [84]. A medida que las proteínas PER y CRY se degradan en el citoplasma, la represión en CLOCK/BMAL1 se activa y el ciclo comienza nuevamente con una periodicidad de ~24 horas, completando así el bucle de retroalimentación transcripcional/traslacional [85]. Todo este entramado de activación y desactivación es el que monitoriza los ritmos circadianos de numerosas enzimas metabólicas, entre ellas podemos encontrar la acil-CoA oxidasa, la HMG-CoA sintasa y sistemas de transporte como la sirtuina-1; por lo que estas enzimas se consideran como enzimas controladas por los genes reloj CCGs (“Clock controlled genes” por sus siglas en inglés) [86]. El mecanismo molecular del reloj está representado en la **Figura 5**.

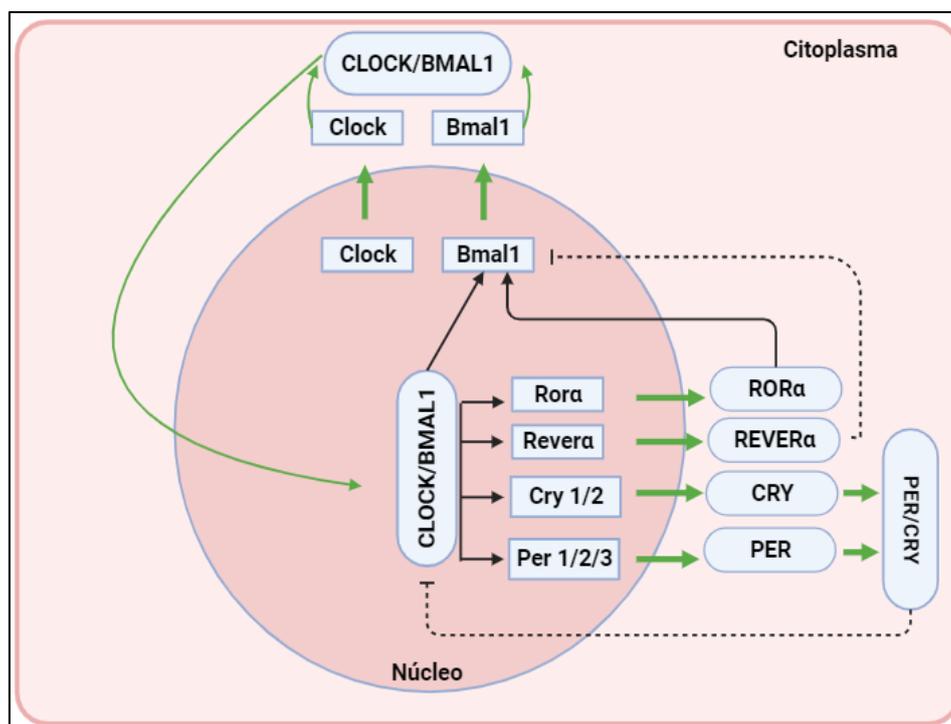


Figura 5. Bucles de retroalimentación transcripcional-traduccionales de los mecanismos moleculares de los ritmos circadianos. CLOCK y BMAL1, forman un complejo proteico que se transloca al núcleo donde controlará la expresión de varios genes controlados por el reloj (*PER1*, *PER2*, *PER3*, *CRY1*, *CRY2*, *REVERB α* , *ROR α*). Por otro lado, el bucle de retroalimentación negativo regulado principalmente por *PER* y *CRY*, forman un complejo proteico que se transloca al núcleo e inhibe la transcripción de CLOCK/BMAL1. La expresión de *BMAL1* también está controlada por *REVERB α* (la inhibe) y *ROR α* (la estimula). Creación propia, figura diseñada en Biorender.

La importancia de este reloj, y su conexión con alteraciones metabólicas, y con la obesidad se explica porque los genes reloj, son capaces de activar diferentes factores de transcripción que conectan el reloj con nuestro metabolismo. Este es el caso del *BMAL1* que se sabe que activa al factor de transcripción PPAR α , de gran importancia en el metabolismo del tejido adiposo; o por ejemplo, el gen reloj REV-ERB α que influye en el metabolismo de lípidos. También sabemos que los genes *BMAL1* y *CLOCK* influyen en la homeostasis de la glucosa; Además, una proporción relevante de las proteínas del organismo presentan oscilaciones rítmicas de 24 horas, por ejemplo los estudios muestran que en primates más del 80% de las proteínas codificadas por genes tienen ritmos circadianos y mientras que en roedores, la proporción fluctúa entre un 10-40% según el estudio [87]. Esto demuestra que la mayoría de los procesos metabólicos están siendo influenciados por los genes reloj y confirman la importancia del sistema circadiano sobre la salud metabólica [87, 88].

3.4. Relojes periféricos

Además del reloj central, muchos estudios han dado a conocer que cada órgano, como el corazón, el páncreas o el tejido adiposo entre otros, tienen su propio reloj, que es autónomo y por el cual pueden expresar sus propios “genes reloj” [89-91]. Es decir, que no es necesaria la influencia del reloj central para poner en marcha la expresión de los genes, lo que no impide que también puedan ser sincronizados por el reloj central [92], ya que su función como sincronizador de los relojes periféricos es ajustar “la hora” según la necesidad biológica (Figura 4) [57].

Nuestro grupo ha mostrado como hormonas clásicas secretadas por el tejido adiposo, como las adipoquinas, adiponectina, leptina, etc. presentan patrones rítmicos [93, 94] entre otras, implicadas en el mantenimiento adecuado del metabolismo. Un desajuste de estas hormonas podría desencadenar el desarrollo de SMet y por consiguiente obesidad [91].

Es importante recalcar el hallazgo de nuestro grupo de investigación en el 2009, acerca de la existencia de un reloj interno en el tejido adiposo humano, con capacidad de sincronización autónoma independiente del SCN, ya que la

expresión de los genes reloj y su ritmo circadiano se demostró en cultivos celulares de tejido adiposo humano en placa fuera del organismo [95].

3.5. Interacción entre ritmos circadianos y obesidad

La relación establecida entre la obesidad y los ritmos circadianos se produce como consecuencia del importante papel de los ritmos circadianos en la regulación de procesos metabólicos; como el control del apetito, el comportamiento de los patrones alimentarios, entre otros. Tal y como se ha podido observar en estudios llevados a cabo en modelos animales y también en líneas celulares humanas [96]. Pero, además, la obesidad es capaz de alterar y afectar a las señales de sincronización dando lugar a la disrupción del ritmo, por ello realmente se considera una relación bidireccional, lo que significa que uno puede influir en el otro [97].

3.5.1. La obesidad como consecuencia de alteraciones circadianas

En 2005 Turek y cols. observaron que una mutación del *Clock*, gen circadiano por excelencia, daba lugar a obesidad en ratones ya que se producían alteraciones en el metabolismo de lípidos y glucosa [98]. Este estudio fue de gran relevancia en la conexión entre cronobiología y obesidad ya que demostraba que la disrupción del ritmo circadiano causaba en el metabolismo del animal, un efecto parecido al que se producía en estudios clásicos de obesidad en ratones, en los que se inducía un estilo alimentario inadecuado (por ejemplo, dieta hipergrasa o de cafetería), y se producía obesidad [98]. Este estudio fue clave para conectar la alteración en los genes reloj con la obesidad y el desarrollo del SMet; conexión que a día de hoy se sigue investigando [99]. En relación a otras alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad, múltiples estudios han mostrado que el metabolismo de la glucosa se altera como consecuencia de la mutación del gen *Bmal1*, dando lugar a una disminución de la tolerancia de la glucosa en ratones [100] y viéndose comprometida la liberación de insulina [101, 102]. Otro estudio relevante, fue el realizado por Ando y cols *et al.* [103] al demostrar cómo se atenuaba levemente la expresión rítmica de los genes reloj en aquellos ratones con obesidad, deteriorándose aún más los ritmos cuando los ratones, además de ser obesos, eran diabéticos. Esta revelación sugirió que la condición obesa de los ratones desajustaba el sistema circadiano del gen reloj

intracelular de los tejidos adiposos viscerales [103]. Siguiendo esa misma línea, también se han observado alteraciones en el metabolismo de lípidos como causa de la mutación del gen *Per* en la mosca de la fruta *Drosophila* [104].

3.5.2. La obesidad como causa de alteraciones circadianas

La obesidad puede ser además causa de alteraciones en el ritmo circadiano. Así se apreció en un estudio donde se observaron diferencias en la variación del perfil de expresión de los genes reloj *BMAL1*, *CRY1*, *CRY2* y *PER2*, en células mononucleares de sangre periférica humana, entre sujetos con o sin obesidad, [105]. En WAT se ha podido observar la reducción de la expresión de *BMAL1* tanto en ratones como en sujetos con obesidad, y también una expresión alterada del *PPAR-γ* [106].

Además de estas alteraciones genéticas en el propio reloj circadiano, conductas inadecuadas, o la exposición a un entorno poco favorable como podría ser la disminución de horas de sueño [107], la exposición de la luz nocturna, o el consumo de alimentos a altas horas de la noche [68, 108], puede dar lugar a alteraciones metabólicas y a obesidad. Lo que se podría denominar alteraciones del ritmo circadiano producidas por los sincronizadores externos, de los que hablaremos con mayor detenimiento en el apartado 5, “HÁBITOS DE VIDA Y RITMOS CIRCADIANOS”. La investigación entre obesidad y ritmos circadianos está en constante evolución. Estos son algunos ejemplos de cronodisrupción que se presentaron en la figura 4 (ver apartado 3.3) que muestra que las alteraciones en los relojes se pueden producir en las entradas al reloj, en el propio reloj, por cambios en genes reloj, por ejemplo, y en las salidas de este reloj. Todas ellas pueden dar lugar a alteraciones metabólicas y a obesidad.

4. RITMOS CIRCADIANOS EN EL TEJIDO ADIPOSO HUMANO

En lo que se refiere al tejido adiposo, principal tejido protagonista en la obesidad, se han encontrado ritmos circadianos en cultivos celulares tanto en preadipocitos como en adipocitos maduros en líneas celulares humanas (3T3-L1). Además, tal y como se comentó anteriormente, Ando y col *et al.* observaron como la obesidad era capaz de deteriorar los ritmos circadianos del tejido adiposo [103].

Las investigaciones relacionadas con el tejido adiposo humano empezaron con el estudio de las hormonas liberadas por el propio tejido, que juegan un papel crucial en el apetito y en el balance energético. Christos S Mantzoros *et al.* [109] observaron de manera significativa la expresión de ritmos endógenos de estas hormonas y su comportamiento según el momento del día en humanos. No fue hasta el 2008, cuando nuestro grupo de investigación observó por primera vez la existencia de la expresión de genes reloj en el tejido adiposo humano. Esto abría el camino y ponía el foco en el potencial riesgo de la alteración de estos genes reloj y su influencia directa sobre los problemas de obesidad [110]. El estudio que identificó por primera vez un ritmo circadiano "endógeno" en el tejido adiposo, que se presentaba con independencia de SCN se realizó en 2009 para los genes *PER2*, *BMAL1*, and *CRY1*. En dicho estudio, realizado en mujeres con obesidad, se observaron diferencias entre el tejido subcutáneo y el visceral, viéndose en este último una mayor asociación con las características del síndrome metabólico [95]. Establecida la existencia de los genes reloj y de un ritmo circadiano periférico en el tejido adiposo, el siguiente paso fue estudiar las hormonas relacionadas con dicho órgano. Los metabolitos de glucocorticoides implicados en la ingesta de alimentos y la acumulación central de grasa, mostraron un ritmo circadiano robusto [111]. Dentro de las citoquinas, la expresión circadiana de la adiponectina y sus receptores (*ADIPOR1* y *ADIPOR2*) revelaron que la adiposidad y la obesidad abdominal se correlacionó con una disminución de la amplitud de la adiponectina y sus receptores [93]. Por otro lado, tanto la leptina (la hormona de la saciedad) como su receptor (*LEPR*) exhibieron un patrón oscilatorio consistente del ritmo, con una máxima expresión por la noche y cuya acrofase en el tejido visceral, al igual que con la adiponectina, se vio adelantada con respecto al tejido subcutáneo [94]. El efecto de los glucocorticoides sobre los genes reloj en el tejido adiposo se vio en la alteración sobre patrones del ritmo en comparación con aquellos que no estaban bajo la influencia de los glucocorticoides [112].

Es importante que las hormonas se liberen en el momento y de manera correcta, ya que desempeñan un papel fisiológico relevante en el balance energético. Las concentraciones de estas hormonas se verán directamente influenciadas por la expresión de sus genes [113]. En la siguiente figura

representamos la hora de máxima expresión de los genes reloj, y genes relacionados directamente con la obesidad y las características del tejido adiposo. Tal y como se observa, la máxima expresión de la leptina se produce por la noche, como era de esperar, para evitar el apetito mientras dormimos, mientras que la máxima expresión de la adiponectina se produce por la mañana [93, 94].



Figura 6. Horarios de máxima expresión de genes reloj y metabólicos en el tejido adiposo humano. Fuente: Tesis “ASPECTOS CRONOBIOLOGICOS DEL TEJIDO ADIPOSEO HUMANO IN VITRO” Dra. María Paz Carrasco Benso, 2017.

4.1. Sensibilidad del tejido adiposo a la insulina

Muy ligado a la condición del sobrepeso y obesidad se encuentra la insulina. La insulina estimula la acumulación de triacilglicéridos y es un potente inhibidor de la lipólisis. Una menor respuesta por parte del tejido adiposo a esta hormona (una sensibilidad disminuida) puede ocasionar efectos nocivos como la acumulación ectópica de lípidos [114].

Nuestro grupo de investigación demostró la presencia de un ritmo circadiano endógeno en la sensibilidad a la insulina del tejido adiposo. Es interesante resaltar que la mayor sensibilidad del tejido adiposo a la acción de la insulina se producía a media mañana (alrededor de las 12 h) [115], lo que sugiere

que el tejido adiposo podría tolerar la ingesta de carbohidratos simples en mayor medida por la mañana que por la noche. Estos resultados concuerdan con los estudios circadianos sobre tolerancia a la glucosa, que muestran que presentan un ritmo circadiano, y que la tolerancia es mayor por la mañana, mientras que disminuye por la tarde/noche [116-118].

4.2. Alteraciones en el ritmo circadiano de tejido adiposo con obesidad

A la hora de estudiar los ritmos circadianos de distintas variables fisiológicas, y en especial los ritmos del tejido adiposo humano, debido a las características ya conocidas de este ritmo, que son semejantes a los de una curva coseinodal, se suele utilizar el método cosinor, que consiste en ajustar los datos originales obtenidos a una curva cosenoidal (función coseno) mediante el método del mínimo cuadrado [119] (**Figura 7**). Un ritmo se considera significativo, cuando su patrón se ajusta a esta curva.

La fórmula del método cosinor es la siguiente:

$$f(t) = M + A \cos \left[\frac{2\pi(t - t_0)}{P} \right]$$

Donde el M, es el mesor, el A, la amplitud del ritmo, y P el periodo:

- M es el MESOR: valor medio de todos los valores observados de un ciclo del coseno ajustado que representa una media ajustada al ritmo.
- A es la AMPLITUD: distancia que hay entre el valor máximo y el mínimo de la curva con respecto al mesor.
- P es el PERIODO: tiempo que tarda en repetirse el ritmo, completando el ciclo.
- t_0 es la ACROFASE: momento en el que el ritmo alcanza su punto máximo.

Para determinar si un ritmo es adecuado, también se puede calcular porcentaje de ritmo (PR), que representa la robustez del ritmo (es decir, la fuerza y resistencia de un ritmo) y que se obtiene mediante el cálculo de la varianza de la señal original de los datos a lo que se llamará varianza 1 (V1), seguido del cálculo de la varianza de los datos estimados por el modelo coseno, varianza 2

(V_2), la división $V_2/V_1 \cdot 100$ nos dará el PR, refiriéndose al porcentaje de la varianza de los datos originales que es explicado por el modelo coseno. Posteriormente se calculará el residuo de la varianza 2 (RV_2) mediante el siguiente cálculo, $100 - PR$. Para finalmente obtener el factor F de Snedecor que es una prueba que compara la varianza de los datos estimados por el modelo coseno (V_2) con la varianza no explicada por el modelo o (varianza residual) mediante el siguiente cálculo V_2/RV_2 . Con el valor F obtenido, se puede calcular la P que nos indica si la presencia del ritmo es estadísticamente significativa.

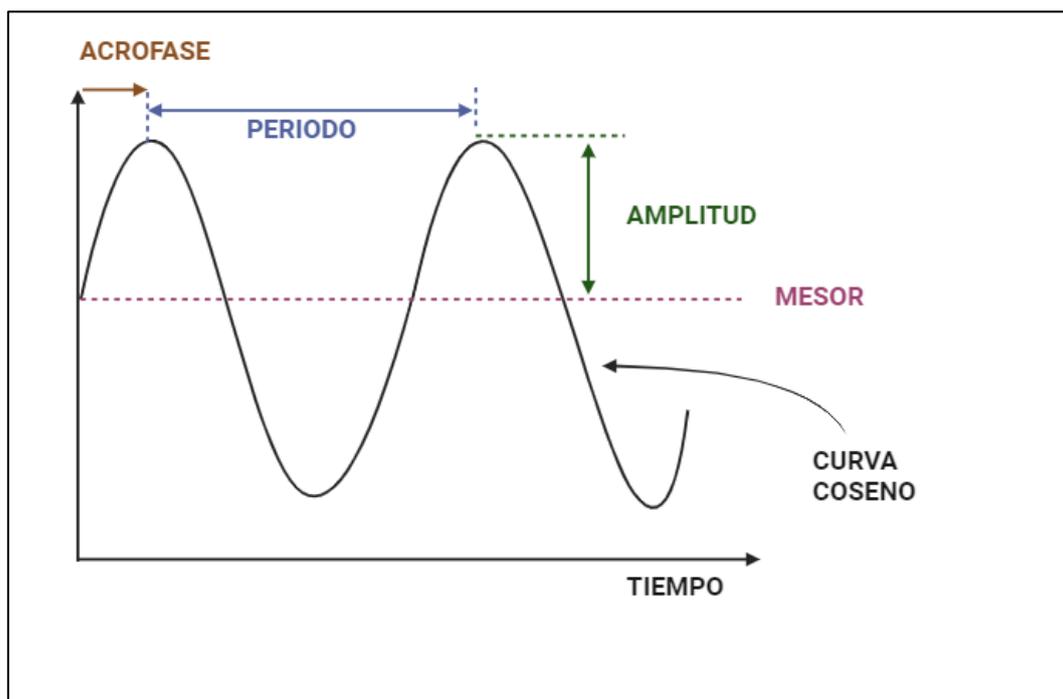


Figura 7. Representación de un ritmo mediante el análisis cosinor. La curva coseno puede caracterizarse a través de varios parámetros: Mesor, Amplitud, Periodo.

Nuestro grupo de investigación fue el primero en descubrir, analizando explantes de tejidos adiposos extraídos a sujetos con obesidad sometidos a bypass gástrico, que el tejido adiposo humano subcutáneo y visceral posee ritmicidad endógena. De esta forma no solo se reveló la existencia de genes reloj, sino también que el tejido adiposo humano es capaz de mantener un ritmo circadiano *in vivo* sin influencia de SCN. Abrimos así el camino a una mejor comprensión de la obesidad y la cronobiología.

5. HABITOS DE VIDA Y RITMOS CIRCADIANOS

Los hábitos de vida del individuo son factores en la mayoría de los casos modificables que pueden actuar de forma directa o indirecta sobre los ritmos circadianos del individuo.

Se sabe que unos hábitos adecuados favorecen la salud del individuo y en especial aquellos hábitos relacionados con la cronobiología del sujeto. Entre los hábitos más característicos relacionados con el sistema circadiano están aquellos que se refieren a factores externos capaces de actuar sobre nosotros a modo de sincronizadores.

Desde el inicio de la revolución industrial, el estilo de vida de la sociedad ha cambiado hacia un aumento excesivo del consumo de alimentos, combinado con la incorporación de alimentos de alta densidad energética y escaso contenido nutricional [120]. Además, las extensas jornadas laborales aplazan las interacciones sociales a última hora del día lo que conlleva un aplazamiento del consumo de alimentos hacia horarios tardíos, que ocurren bien entrada la noche [121]; los puestos de trabajo nocturnos traen consigo moverse en la fase de descanso, junto con un aumento de picoteo [122]. Además, el uso reiterado de luz brillante durante la noche biológica retrasa fisiológicamente la liberación de melatonina, conocida como la hormona de la noche, lo que conlleva un retraso del inicio del sueño, y por tanto una reducción de los periodos de sueño nocturno [123]. La continua repetición de estas actividades, actúan sobre el individuo induciendo una pérdida de los ritmos externos e internos [124]. La entrada desajustada de estas señales a nuestros relojes internos da lugar a la cronodisrupción.

Un aspecto reciente que ha significado un hito en la historia de la salud pública en general, y que ha tenido un impacto agudo y potente sobre la obesidad, ha sido la llegada de la Covid-19 en el 2020. La obesidad ocupaba el segundo puesto como marcador predictivo en cuanto a mortalidad para la Covid-19, precedido de la edad del individuo, lo que ha llevado a la población actual a tomar conciencia sobre la importancia de la obesidad en la salud humana [125]. Por otro lado, las cuarentenas domiciliarias fueron un detonante que alteraron los patrones de sueño, la calidad y horario de las comidas y la actividad física,

viéndose esta última reducida al sedentarismo absoluto. La combinación explosiva ha supuesto uno de los principales motivos del aumento de peso de la población adulta e infantil tras el confinamiento [126]. Por todo ello, La pandemia ha resultado ser una oportunidad para valorar la importancia del sistema circadiano y su sincronización, y su impacto sobre la obesidad, en vista de que un estudio sobre el impacto de 12 semanas de confinamiento en 521 estudiantes universitarios, reflejaron un aumento del sedentarismo junto con una reducción de las horas de sueño nocturno, y que se asoció a un aumento del peso corporal, de la misma manera, el retraso de los horarios de la comidas y la reducción a la exposición solar formaron parte del conjunto de sincronizadores externos que contribuyeron al empeoramiento de la salud de los estudiantes en forma de aumento del peso corporal generalizado [127].

Ahora veremos, de manera independiente, hábitos de vida con capacidad de producir desajustes que pueden derivar al desarrollo de problemas metabólicos, concretamente a la obesidad.

5.1. Horario de la comida

Tal y como hemos comentado, existen diferentes factores externos capaces de actuar sobre nosotros a modo de sincronizadores.

En muchas especies, el acceso periódico de los alimentos ha sido un factor capaz de sincronizar muchas funciones fisiológicas [128], por lo que no sería de extrañar que la presencia o ausencia de comida fuese un estímulo importante en la actividad de muchos mecanismos fisiológicos. Conocer y anticipar la hora de la comida permite a nuestro organismo tener un margen de preparación para una captación y utilización de los recursos de manera óptima.

Así mismo, también se ha observado la capacidad de los alimentos dietéticos en influir la expresión genética, en especial las dietas altas en grasa [129], demostrando que una dieta alta en grasa es capaz de retrasar la acrofase de la adiponectina [130], pero también la capacidad de otros nutrientes, como el resveratrol de revertir cambios en la expresión de Rev-Erba producida por una alimentación rica en grasa [131].

Hoy en día sabemos que el horario de la comida es uno de los sincronizadores más potentes para los tejidos periféricos [132, 133]. En modelos animales, se ha mostrado como el cambio de la hora de las ingestas, pasando de comer por las noches (fase activa) a comer por las mañanas (fase inactiva, ya que recordemos que estos roedores son nocturnos), da lugar a una alteración de las fases o horas máximas de expresión de varios relojes periféricos [134, 135]. Otros estudios en animales corroboran el efecto que ejerce la hora de la ingesta en la sincronización de los relojes periféricos [135, 136].

Teniendo en cuenta que los tejidos periféricos tienen una actividad principalmente metabólica, hace de estos órganos más susceptibles a los cambios de los periodos de ayuno/ingesta. Cuando se produce un desajuste entre los genes reloj y la entrada de la señal ambiental (comida) durante la fase de reposo, se puede ver alterado el equilibrio homeostático y, como consecuencia, el desarrollo de enfermedades metabólicas. Se ha podido observar una alteración del metabolismo de la glucosa tras la eliminación del gen *Bmal1* y *Clock* en ratones [137]. Otro tipo de alteraciones metabólicas se dio en el caso de los ratones obesos con deficiencia de leptina, viéndose alterada las fases de los genes *Bmal1*, *Cry1*, *Per1*, *Per2* en comparación con ratones no obesos [138-140], quedando patente que la perturbación de los ciclos de comida este ligado a la alteración de los ritmos periféricos [141].

La actividad frenética de la sociedad actual nos permite tener servicios en cualquier momento del día y disponer de comida durante las 24 horas del día, lo que nos perjudica si no sabemos adecuarnos a nuestros patrones internos y llevar un horario acorde a nuestros ritmos biológicos.

En humanos se ha podido observar que la alteración circadiana es capaz de modificar el metabolismo de la glucosa, conduciendo a posibles estados diabetogénicos [141]. El hecho de comer cuando fisiológicamente tendríamos que estar en estado de reposo se ha asociado a una disminución de la sensibilidad a la insulina y, a la larga, a un deterioro de las proteínas relacionadas al buen funcionamiento de la homeostasis de la glucosa [118, 142]. Estos resultados quedan patentes en numerosos estudios epidemiológicos sobre trabajadores nocturnos [143, 144].

Nuestro grupo de investigación con el objetivo de ir más allá del tópico de “lo que se come”, empezó a darle relevancia al “cuándo se come”. En un estudio llevado a cabo a 420 sujetos, se les modificó el horario de ingesta, comiendo antes o después de las 15:00 h. Al cabo de 20 semanas se observó que aquellos que comían después de las 15:00 h perdieron menos peso que las que comían antes de las 15:00 h [145]. Partiendo de este descubrimiento, se reparó en que un horario de comida tardía, después de las 16:00 h, era capaz de disminuir la tolerancia a la glucosa, atenuar los valores en suero de cortisol, alterar los ritmos periféricos de temperatura e incluso alterar el ritmo diario de la diversidad microbiana salival, en comparación con aquellas personas que comían temprano (13:00 h) [146, 147]. Así mismo, se observó una alteración en el ritmo de temperatura y actimetría (cuantificación de movimientos realizados por el sujeto mediante medidas de la aceleración resultante de dichos movimientos), hacia un mayor aplanamiento y fragmentación en aquellos individuos que perdieron menos peso, en comparación con la menor fragmentación y una actividad robusta del ritmo en aquellos que perdieron más peso [148].

Uno de los primeros autores en observar el efecto directo del cambio del horario de la comida sobre la expresión de genes reloj en humanos fue Jhonathan D Jhonston *et al.* [132], mostrando que el retraso del horario de las 3 de comidas principales (desayuno-comida-cena) era el causante de retrasar, en el tejido adiposo, los ritmos circadianos moleculares de *PER2* y de alterar el ritmo de la glucosa plasmática. Con este estudio se demostró que la ingesta y su horario era un sincronizador externo del reloj periférico del TA en humanos.

El hecho de que se le esté dando tanta importancia al momento de la comida, ha hecho que surjan nuevas estrategias dietéticas. Estos son los llamados ayunos intermitentes o alimentación restringida en el tiempo, TRF (“Time restricted feeding”, por sus siglas en inglés) si nos referimos a animales y comidas restringidas en el tiempo, TRE (“Time restricted eating”, por sus siglas en inglés) cuando nos referimos a humanos.

5.1.1. Ayuno intermitente

Hasta ahora, el planteamiento para el control del balance energético se basaba en comer regularmente 6 comidas al día o en restricciones calóricas, que

consiste en régimen de alimentación bajo en calorías reduciendo entre un 20-40% de la ingesta en base al consumo *ab libitum* [149].

Dentro de las estrategias más conocidas nos encontramos con: el ayuno alterno, ADF (“alternate day fasting”, por sus siglas en inglés) que comprende días de alimentación *ad libitum* y días que consiste en consumir solo un 25% de energía el día de ayuno; la comida restringida en el tiempo TRE (“Time restricted eating por sus siglas en inglés), que consiste es una modificación del ayuno intermitente en donde la ingesta se limita a una ventana de tiempo de entre 4-12 horas dentro de un horario de 24 horas sin cambios en la ingesta de calorías; y el ayuno intermitente, IF (“intermittent fasting.”, por sus siglas en inglés), conocido como “5:2”, que consiste en 2 días no consecutivos de ayuno con restricción calóricas de entre el 60-100% y 5 días de dieta *ad libitum*. Dentro de esta última categoría pueden surgir modificaciones como el “4:3” [150] (**Figura 8**).

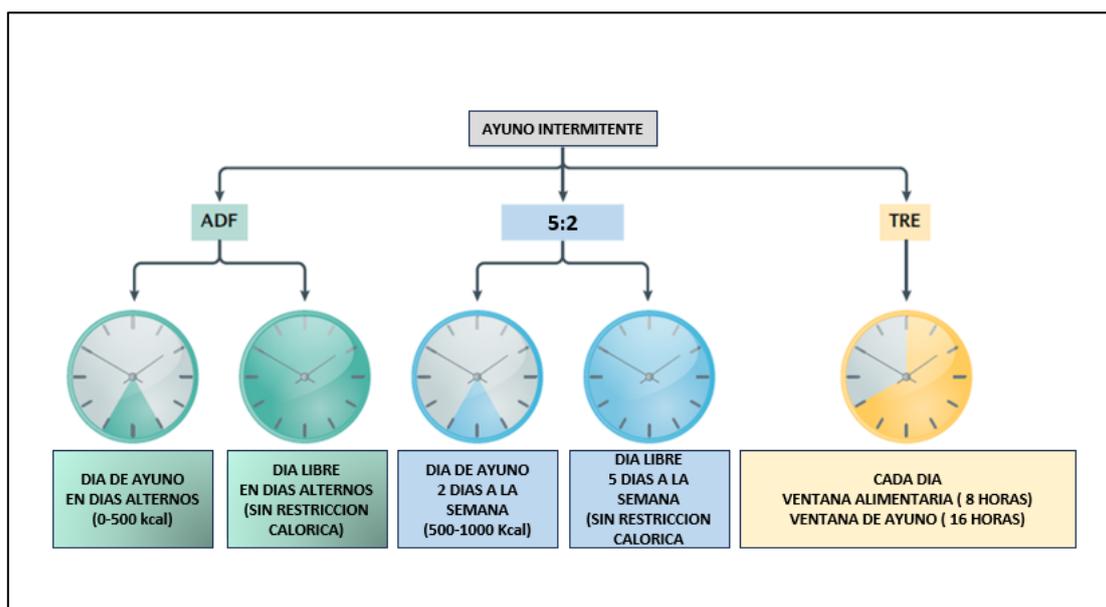


Figura 8. Distintas estrategias dietéticas de ayuno intermitente. ADF (“Alternative day fasting”), 5:2 y TRE (“Time restricted eating”). Figura traducida del siguiente artículo [151].

Los primeros estudios en examinar los efectos de la TRF en los relojes circadianos provienen de animales. Varios de estos estudios sostienen que un patrón apropiado de ciclo ayuno/ingesta ajustado a sus fases de actividad podría reforzar el ritmo circadiano dando lugar a ritmos robustos y, como resultado, mejoras en el metabolismo celular [152-154]. Sí se diera al contrario, se

produciría un desacoplamiento entre los relojes periféricos y el central [134], dado que el momento de la comida actúa como una poderosa señal para la determinación de fase y ritmicidad en los órganos periféricos [154, 155].

Hoy en día están aumentando los estudios sobre la TRE con el fin de esclarecer los verdaderos beneficios. De los principales objetivos en los que se basa la TRE es la pérdida de peso. No obstante, los resultados siguen siendo contradictorios: mientras que algunos estudios de cohortes han observado una reducción de peso corporal [156, 157], en muchos otros no se ha observado que se produzca [158, 159]. Por otro lado, se han reportado beneficios derivados de la TRE sobre el metabolismo, especialmente en el control glucémico [117, 160]. Varios estudios coinciden en que la TRE produce un aumento de la sensibilidad a la insulina, una reducción de la presión arterial y una disminución del apetito [161-163].

La disparidad de diseños de estudio como consecuencia del amplio espectro de las estrategias de la TRE (duración de ayuno/ingesta, momento del día de la comida, ingesta energética), hace que los efectos dietéticos sean difícilmente comparables.

5.2. Cenas tardías o trabajadores por turno (melatonina e insulina)

Otro hábito común en relación con las horas de la comida en el mundo actual, es la ingesta nocturna. España es un país en el que se tiende a comer tarde por la noche. La hora media de ingesta de la cena en España y, en particular en la región de Murcia [164], es a las 21:45 de la noche. En otros países anglosajones no es así, y aunque las cenas son más tempranas, tienden a comer alimentos, muchas veces industriales (helado, aperitivos, etc.), en horas cercanas a la hora del sueño.

Estos hábitos se han asociado con el aumento de la obesidad y, además, con alteraciones del metabolismo de la glucosa. De igual manera, los trabajadores por turnos, y en especial los trabajadores nocturnos, presentan alteraciones metabólicas importantes relacionadas con el metabolismo de la glucosa y la obesidad [165]. Aunque hay distintos mecanismos que pueden estar implicados en estos resultados, nuestro equipo ha simulado con individuos en un

laboratorio, un trabajo por turnos y nocturno, y los ha comparado con los mismos individuos en condiciones de trabajo diurnas; demostrando que se produce una alteración de la tolerancia a la glucosa, siendo esta significativamente menor en aquellos que están en la situación simulada de trabajo nocturno [166] (**Figura 9**). Pero lo más interesante de este trabajo es que, cuando se compara la subida de azúcar en sangre en la simulación nocturna, pero sin que se coma por la noche, el efecto negativo propio del trabajo nocturno desaparece. Por lo que se muestra que un trabajador nocturno que coma durante el día, es decir, a la hora que su organismo esta alineado con su reloj interno, no produce los efectos negativos del trabajo nocturno.

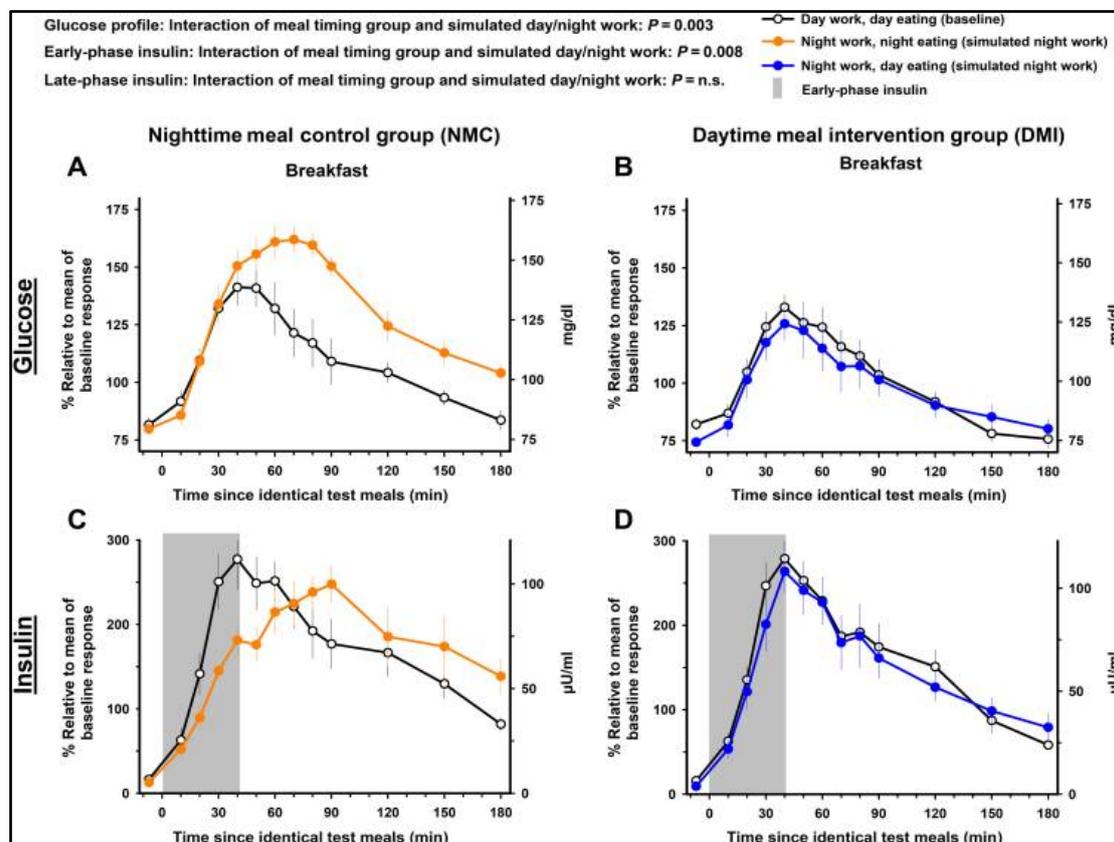


Figura 9. Efectos de la intervención en el horario de las comidas sobre la tolerancia a la glucosa después de la comida. La intervención sobre el horario de las comidas modificó significativamente el impacto del trabajo nocturno. Imagen del artículo [166].

Aunque hay muchas teorías sobre por qué el trabajador nocturno, si come por la noche, tiene o desarrolla intolerancia a la glucosa, nuestro equipo de investigación ha planteado una hipótesis cuya base es que la melatonina en presencia de insulina, como sucedería por la noche cuando se ingiere comida o

cuando se administra melatonina farmacológica cerca de la cena, puede dar lugar a una inhibición de insulina por el páncreas y o podría ser que se produzca una resistencia a la acción de la insulina.

La N-Acetil-5-metoxitriptamina, más conocida como melatonina, es una hormona que se encuentra presente en todas las especies del reino animal [167].

Esta neurohormona es producida por la glándula pineal gracias a la participación de las siguientes enzimas: triptófano hidrolasa (THD), L-aminoácido aromático descarboxilasa (AADA), arilalquilamina-N-acetiltransferasa (AANAT) y hidroxiindol-O- metiltransferasa (HIOMT) que actúan sobre el aminoácido triptófano para transformarlo en melatonina [168] (**Figura 10**).

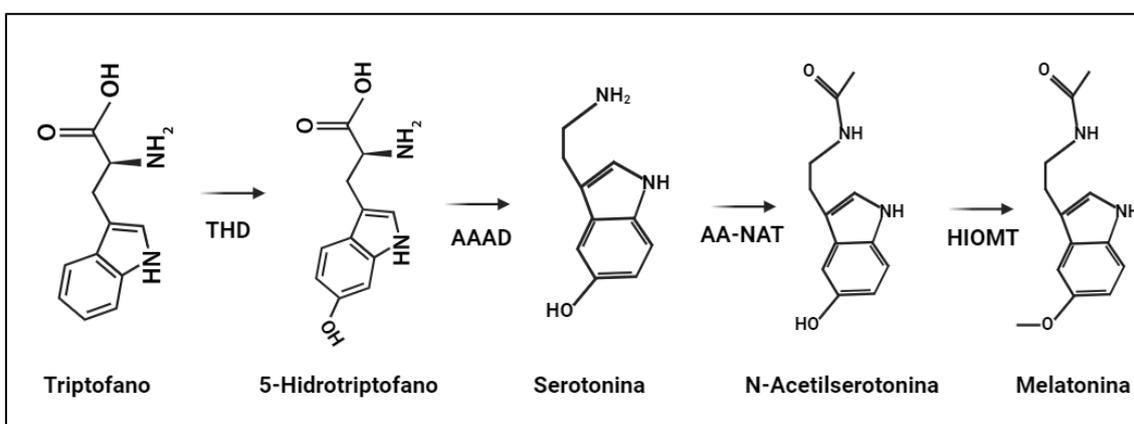


Figura 10. Síntesis de Melatonina. Imagen basada en [168].

La liberación de la melatonina está restringida estrictamente a la noche y por ello se la relaciona con el sueño nocturno. Esta hormona no es sedante en sí, sino que es la señal que nos prepara para el sueño nocturno, ya que es la oscuridad la que activa la inervación simpática de la glándula pineal a través del SCN, que será el encargado de cronometrar la producción diaria de melatonina en sincronía con los ciclos de luz/oscuridad. Por ello, la melatonina proporciona información sobre la duración del día para la organización de la fisiología estacional [169]. La herramienta que se usa para medir la fase circadiana se denomina DLMO (“Dim Light Melatonin Onset” de sus siglas en inglés), esto quiere decir que mide 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 [170].

La melatonina ejerce funciones diversas por su facilidad de atravesar las membranas celulares sin necesidad de receptores, gracias a su características lipofílica/anfipática y, además, por la amplia distribución de sus receptores específicos [171]. En mamíferos abundan los receptores MT1 (MTNR1A) y MT2 (MTNR1B), son receptores heterotriméricos acoplados a proteínas G y su activación tiene un papel importante para la transducción de señales extracelulares [172], encontrándose ampliamente distribuidos en células y tejidos periféricos como pulmón, corazón, próstata, adipocitos, etc. [173, 174]

La liberación de melatonina puede verse afectada por el consumo de bebidas estimulantes [175], fármacos [176], edad [177] y, sobre todo, por estímulos ambientales como la luz [108]. En la sociedad moderna, el insomnio y los trastornos del sueño son muy frecuentes, así como el aumento del uso de los aparatos electrónicos antes de irse a dormir. Estos aparatos emiten una luz de longitud de onda azul (superior de 480 nm), siendo capaces de inhibir la síntesis AANAT, reduciendo así la producción de melatonina [178]. Los trabajos por turnos o viajes a través de la zona horaria son otros de los ejemplos capaces de interponerse en la producción circadiana “natural” de la melatonina.

En Estados Unidos el consumo de melatonina exógena ha aumentado más del doble que en la década anterior [179] y, aunque no existen datos oficiales, tras el confinamiento se estima que en España ha habido un repunte de casi un 130% [180] con la finalidad de restaurar los ritmos circadianos naturales y mejorar el sueño. Por otra parte, la melatonina también desempeña un papel importante en otros ámbitos, actúa como antioxidante, participa en la mejora inmunológica, en la homeostasis y control de la glucosa y en el gasto energético, regulando la masa corporal [181-183].

5.2.1. Melatonina y obesidad

De todas las patologías que se asocian con la obesidad, sabemos que la diabetes tipo II es una de las más frecuentes. Esta enfermedad se caracteriza por altos valores de glucosa en sangre, este efecto conocido como hiperglucemia se puede producir bien por una disminución de la liberación de insulina o por la resistencia de las propias células a la acción de la insulina circulante, algo que suele ser muy común en personas con un alto porcentaje de grasa corporal [184].

La consecuencia directa de la melatonina sobre el tejido adiposo humano en relación con la sensibilidad a la insulina apenas ha sido estudiada. A pesar de la presencia de receptores de melatonina MT2 en el tejido adiposo, y de que en un estudio el tratamiento con melatonina haya sido capaz de reducir la expresión del GLUT4 y, por tanto, la captación de glucosa en la línea celular adiposa humana [185].

Los estudios parecen conducir a un posible deterioro de la homeostasis de la glucosa, como consecuencia de encontrarse simultáneamente la melatonina y la insulina por la noche. Sin embargo, poco se sabe sobre la actuación de la melatonina en explantes del tejido adiposo en relación con la sensibilidad a la insulina.

Los niveles fisiológicos circulantes de melatonina plasmática durante la noche varían entre 80-120 pg/mL [186], mientras que la dosis farmacológica oral típica de 5 mg de melatonina suele rondar entre los 500 y 10.000 pg/mL de concentración séricos circulantes de melatonina [187]. Teniendo en cuenta que el consumo de melatonina exógena se ha visto incrementados en estos últimos años, es fundamental el estudio sobre su repercusión en el metabolismo de la glucosa, teniendo en cuenta los antecedentes científicos que se han arrojado estos últimos años.

5.3. Hábitos de sueño y siesta

Múltiples estudios han demostrado que las alteraciones de sueño tanto en duración (acortamiento del sueño) como retraso del mismo, dan lugar a alteraciones metabólicas en el individuo. Las explicaciones metabólicas pueden ser varias, nuestro grupo de investigación mostró que una duración de sueño insuficiente en adolescentes da lugar a un aumento de ingesta de alimentos pocos saludables (ricos en carbohidratos, energía y alimentos procesados) y además a una reducción de la actividad física [188]. Además, los estudios de Van Cauter y su equipo mostraron que la reducción de la duración del sueño nocturno se asoció con una alteración de las concentraciones de las hormonas fundamentales para la regulación del apetito, como la leptina y la ghrelina [189].

Además del sueño nocturno existe otra modalidad que es el sueño diurno, más conocida como siesta. La siesta se caracteriza por tener una duración muy inferior a la del sueño nocturno y se realiza habitualmente después de la comida. Forma parte de la cultura de los países del mediterráneos, aunque hoy en día es practicada a lo largo del mundo, desde Asia a América [190], en España un 33 % de la población duermen la siesta [191].

Los motivos de la siesta se deben, en parte, a la consecuencia de la vida ajetreada de la sociedad moderna, con la finalidad de mejorar el rendimiento y mitigar la privación del sueño nocturno [192, 193].

La mayoría de los estudios relacionados con la siesta están vinculados a campos neuropsicológicos, reparando en las consecuencias positivas de echarse la siesta, ya que se observa una mejora el rendimiento cognitivo [194]. Por otra parte, también se le ha atribuido un carácter beneficioso y a su vez perjudicial en muchas de las características del síndrome metabólico. A pesar de esta contrariedad, la siesta sigue siendo algo habitual en muchos de los países del mediterráneo [193].

Son muchos los mecanismos que se han propuesto como origen de la asociación entre la siesta y la obesidad abdominal; la mayoría de ellos relacionados con la disrupción circadiana, que actúan de manera bidireccional. Un desajuste del sueño nocturno desencadena un aumento del sueño diurno y, a su vez, esta es una causa de una mala calidad del sueño nocturno [195, 196], provocando una disrupción circadiana [197, 198], la cual está muy ligada a un aumento del riesgo de padecer obesidad [107, 197]. Por otra parte, los niveles de cortisol aparecen aumentados después de las siestas largas [199], esta hormona está muy relacionada con el aumento de los depósitos de grasa [200, 201] y se ha demostrado que las alteraciones en el ritmo del cortisol inducen una interrupción circadiana que conduce a la resistencia a la insulina, la obesidad central y desarrollo de síndrome metabólico [202].

II. OBJETIVOS

1. ESTADO ACTUAL Y OBJETIVOS

El consumo excesivo de alimentos de alta densidad energética y su amplia disponibilidad a lo largo del día, han sido los detonantes de una epidemia de obesidad en la sociedad. El tejido adiposo, además de ser el principal tejido del organismo para la acumulación de energía, tiene un papel activo en diversos procesos fisiológicos asociados con la obesidad, desde la producción de hormonas adipoquinas y citoquinas hasta la regulación de la temperatura corporal [203]; por lo que un exceso de tejido adiposo puede dar lugar a alteraciones en estos procesos.

La relación entre el exceso de tejido adiposo y el desarrollo de enfermedades metabólicas no es algo nuevo, desde hace mucho tiempo grandes pensadores relacionaban la obesidad con el desarrollo de enfermedades; por ejemplo, Hipócrates escribía “*La muerte súbita es más común en aquellos que son naturalmente gordos que en los delgados*” [204].

El hallazgo de la presencia de ritmos circadianos endógenos en el tejido adiposo *ex vivo* ha subrayado la importancia de los ritmos internos en la obesidad [95], estableciendo así la relación entre ritmos circadianos, obesidad y síndrome metabólico [72].

Los hábitos de vida del individuo son cruciales para el mantenimiento de unos ritmos circadianos saludables y para la prevención de las alteraciones metabólicas en el tejido adiposo. Con el fin de prevenir la obesidad es aconsejable que en el tejido adiposo prevalezca la lipólisis, o movilización de grasa, sobre la lipogénesis, o acumulación de grasa. La prevalencia de uno u otro se consideraría como protector de la obesidad (mayor lipólisis) o como un factor obesogénico (mayor lipogénesis). La enzima mayoritaria en la movilización de grasa del tejido adiposo es la Lipasa Sensible a Hormonas o LSH. Una de las hipótesis de esta tesis doctoral, es que si los horarios de comida no están en consonancia con nuestro ritmo circadiano se puede dar lugar a alteraciones en la actividad de la LSH. De igual manera, un hábito de sueño nocturno inadecuado, o el hábito de siesta larga, podrían dar lugar a alteraciones en la actividad de esta enzima, en sus ritmos circadianos y por tanto podrían alterar la capacidad de movilización de grasa del tejido adiposo.

Por otro lado, proponemos aquellas situaciones en la que concurren en el organismo valores elevados de melatonina (propios de la noche) con valores elevados de insulina (como consecuencia de la ingesta de alimentos), podrían dar lugar a alteraciones en la sensibilidad a la insulina, aumentando las probabilidades de desarrollar obesidad. Esta situación se produce habitualmente en nuestras vidas cuando se cena tarde, o en trabajadores nocturnos (se come durante la noche, cuando la melatonina está elevada), ambas situaciones se asocian con un aumento de obesidad o con alteraciones metabólicas.

En la presente tesis doctoral, también proponemos el estudio de simulación de ayuno intermitente en cultivos de tejido adiposo, para determinar si el ayuno intermitente presenta un efecto mayor en la movilización de grasa por el tejido adiposo que un patrón dietético habitual de comer durante el día (4 veces) y hacer ayuno por la noche; y si esta acción difiere al realizar un ayuno intermitente en el que la ventana de alimentación se realiza por la mañana o por la noche.

Para obtener una visión más aproximada de los ritmos circadianos de las variables de estudio, estos estudios se realizarán en cultivos de explantes del tejido adiposo humano cada 4 horas a lo largo de 24 horas del día, con una frecuencia de determinación de 6 a 7 puntos. Las muestras de tejido adiposo abdominal se obtendrán de pacientes con obesidad tipo 2 y 3, sometidos a cirugía bariátrica para el tratamiento de su obesidad.

1.1. Objetivo general.

Determinar si el tejido adiposo humano, y sus ritmos circadianos, se ven afectados por los hábitos de vida del individuo, en especial con aquellos hábitos que se sabe actúan como sincronizadores del reloj interno del individuo, como son los horarios de comida, de sueño nocturno y diurno (la siesta), y la duración del ayuno.

1.2. Objetivos específicos

Objetivo 1: Con respecto a la lipólisis del tejido adiposo, evaluar si existe un ritmo circadiano endógeno en la actividad de la lipasa sensible a hormona (LSH) y en la del gen *LIPE* que codifica a este enzima. **1A)** Estudiar si la hora de las comidas y la duración del ayuno nocturno, influyen en los ritmos circadianos de

actividad de la LSH y de expresión de *LIPE*. **1B)** Determinar si el hábito de siesta (larga) se asocia con una alteración de los ritmos circadianos de la LSH y de *LIPE*, lo que explicaría en parte por qué la siesta larga se asocia con obesidad abdominal.

Objetivo 2: Evaluar si la presencia de melatonina junto con insulina en el tejido adiposo abdominal influye en la sensibilidad a la insulina; y si este efecto difiere entre las distintas localizaciones adiposas es decir entre el depósito subcutáneo y el visceral.

Objetivo 3: Analizar el efecto del ayuno intermitente en la movilización de grasa de tejido adiposo humano subcutáneo, y determinar si existen diferencias en su efecto dependiendo de la hora a la que se realiza la ventana de alimentación (mañana/temprana o tarde/tardía).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL Y MÉTODOS COMÚN PARA TODOS LOS OBJETIVOS

1.1 Población de estudio

Los pacientes estudiados para el objetivo 1 procedían del servicio de Cirugía General del Hospital Universitario “Virgen de la Arrixaca” mientras que los sujetos a estudio para los objetivos 2 y 3 procedían del Servicio de Cirugía del Hospital Quirón Salud Murcia.

Las poblaciones de los tres objetivos fueron sometidas a una operación de bypass gástrico por laparoscopia debido a su obesidad severa ($IMC \geq 40 \text{ kg/m}^2$) (**Tabla 4**). Todos ellos fueron informados de los métodos y objetivos del proyecto, dando su consentimiento informado tanto para la participación en el estudio, así como para la utilización de los resultados obtenidos, de acuerdo con los principios recogidos en la declaración de Helsinki, y siguiendo las normas del Comité Ético de la Universidad de Murcia. Así mismo, se garantizó la total confidencialidad de todos los datos e informaciones relativas a los participantes, tal y como se observa en la Ley Orgánica para la Regulación del tratamiento Automatizado de Datos de Carácter Personal (Ley Orgánica 5/1992).

Tabla 4. Tamaño de muestra, sexo y edad media de los pacientes estudiados para cada objetivo.

Objetivos	Tamaño de Muestra	Sexo		Edad media (años)
		Hombres	Mujeres	
Objetivo 1A	18	9	9	46
Objetivo 1B	17	9	8	45
Objetivo 2	19	8	11	42
Objetivo 3	21	10	11	39

La recogida de datos de los pacientes del objetivo 1 se realizaron la tarde en el que el paciente ingresaba (12 horas antes de la intervención). Mientras que la recogida de información para la población de los objetivos 2 y 3 se llevó a cabo el mismo día del ingreso del paciente (entre 4-5 horas previas a la intervención).

1.2. Mediciones antropométricas y composición corporal

Las entrevistas personales a cada sujeto se basaron en un estudio antropométrico personalizado y completado con cuestionarios sobre el estilo y hábitos de vida. El estudio antropométrico consistió en la recopilación de medidas del estado corporal y determinaciones sanguíneas.

A continuación, se detallarán los parámetros a analizar:

1.2.1. Altura

La altura de la población del objetivo 1 se midió con un estadiómetro tipo Harpender (rango 0,70-2,05 m) (Holtain Ltd, Bryberian, Crymmich, Pembrokeshire, UK), mientras que para los del objetivo 2 y 3 se utilizó una báscula electrónica con tallímetro incorporado de marca ASIMED (rango 0,70-2,00 m) (Vizcaya, España). En ambas poblaciones los sujetos debían permanecer descalzos, erguidos, y con la cabeza alineada según el plano de Frankfurt (siguiendo la línea trago-comisural).

1.2.2. Peso y cálculo del porcentaje de grasa corporal

El peso y el porcentaje de grasa corporal para los objetivos 1 y 2 se evaluó mediante bioimpedancia, con un bioimpedanciómetro marca TANITA (TANITA Corporación Americana, Inc, Arlington Heights, IL, USA) modelo TBF-300 (**Figura 11**).



Figura 11. Bioimpedancia marca Tanita modelo SC-330.

Mientras que para el objetivo 3 se utilizó el analizador de la composición corporal por bioimpedancia MC-580 que incorpora la última tecnología de reactancia 8C de doble frecuencia y 10 mediciones segmentadas (**Figura 12**).



Figura 12. Bioimpedancia modelo Tanita modelo MC-580.

Ambas bioimpedancias se basan en la técnica de análisis de impedancia Bioeléctrica (BIA) que se fundamentan en el principio del comportamiento de los diferentes materiales a un flujo de electricidad determinado. Los tejidos magros al poseer un alto contenido en agua y electrolitos funcionan muy bien como conductores eléctricos mientras que la materia grasa al tener un bajo contenido de agua corporal no funciona como conductor de señales eléctricas. Esto hace posible medir la resistencia al flujo de la corriente eléctrica induciendo una señal eléctrica de baja energía y de alta frecuencia. El flujo eléctrico pasa a través de los electrodos situados en la parte anterior de la plataforma y tiene en cuenta los parámetros físicos de la persona como son la altura, peso, sexo, edad, tipología física y los parámetros bioeléctricos que son: la resistencia eléctrica, la reactancia inductiva (XL) y la reactancia capacitiva, Xc (en ohm) [205]. Todas las mediciones que nos proporciona son estimadas indirectamente mediante ecuaciones matemáticas de cálculo, es por ello por lo que a la BIA se la conoce como una técnica de medición indirecta.

Las mediciones se realizaron con todos los individuos descalzos y cumpliendo las siguientes condiciones para asegurar una mayor fiabilidad de los datos:

- No haber realizado ejercicio intenso 12 horas antes de la bioimpedancia
- No haber comido ni bebido 4 horas antes de la bioimpedancia
- Haber orinado 30 minutos antes de la bioimpedancia

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

El uso de la Tanita MC-580 nos proporcionó una mayor visión de la composición corporal debido al uso de sus 8 electrodos (pies y manos) permitiéndonos visualizar el contenido para cada una de las partes, obteniendo un registro más exhaustivo del contenido de tejido graso, muscular y agua de cada individuo.

1.2.3. Medición de pliegues cutáneos

Para la valoración del porcentaje de grasa corporal, además del estudio de bioimpedancia, también se realizaron medidas de varios pliegues cutáneos. Estas medidas se hicieron con el sujeto de pie, pinzando el pliegue cutáneo de grasa corporal con los dedos pulgar e índice, situándonos a 1 cm de la posición de los dedos.



Figura 13. Plicómetro o compás de pliegues cutáneos tipo Harpenden.

Se obtuvieron los pliegues con un plicómetro tipo Harpenden (Holtain Ltd, Bryberian, Crymmich, Pembrokeshire, UK) (**Figura 13**). Y se midieron para el cálculo del porcentaje de grasa total siendo los siguientes:

- Pliegue del bíceps: El pliegue se pinzó en la parte anterior del brazo, verticalmente y a la distancia media entre el acromion y el olécranon.

- Pliegue del tríceps: Se determinó en la cara posterior del brazo, estando este caído y relajado, en el punto medio entre el acromion y el olécranon.
- Pliegue suprailíaco: Este pliegue se midió oblicuamente, a una distancia de 5-7 cm por encima de la espina ilíaca anterosuperior, a nivel de la línea media-axilar.
- Pliegue subescapular: Se tomó en el ángulo inferior de la escápula, en su parte interna y en dirección oblicua, formando un ángulo de 45° con la horizontal que pasa por el borde inferior de la escápula.

Todas estas medidas se realizaron por triplicado y por el mismo ejecutante.

A continuación, se procedió a la determinación de las características del síndrome metabólico, tomándose los siguientes perímetros:

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

Todas las medidas se realizaron con una cinta métrica flexible y extensible.

A partir de estas medidas se calcularon los índices de distribución:

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

Según el perímetro de la cintura es posible clasificar a la población conforme su distribución topográfica de grasa corporal de la parte superior o inferior del cuerpo, dividiéndose en dos tipos: en obesidad androide (Circunferencia de cintura > 94 cm en hombres y 80 cm en mujeres), u obesidad ginoide (ICC < 94 en hombres y < 80 en mujeres) (**Figura 14**).

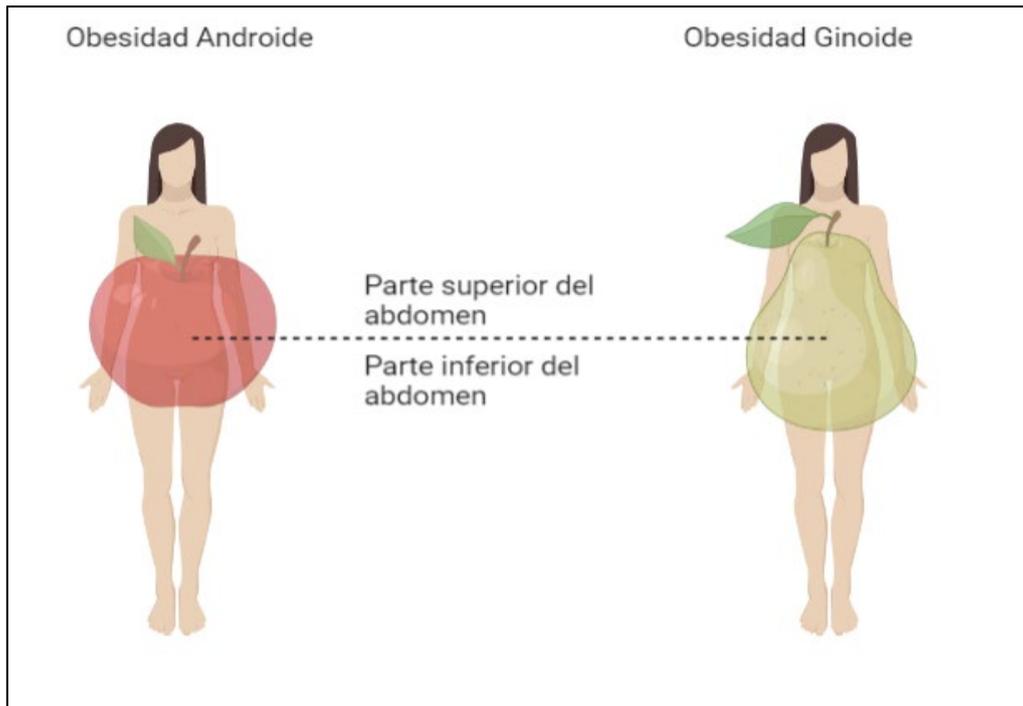


Figura 14. Diferentes tipos de obesidad según la distribución de la grasa corporal. Creación propia, Biorender.

Ambos tipos se presentan en ambos sexos y el tipo de distribución se asocia con riesgo de enfermedad cardiovascular, hipertensión, hiperinsulinemia, diabetes, colelitiasis y accidentes cerebrovasculares en el caso de la obesidad androide mientras que, en la obesidad ginoide está más asociado al riesgo de várices y complicaciones articulares en miembros inferiores [206].

Además, también se midieron los diámetros sagital y coronal a nivel de la cresta ilíaca (L4-5) usando un sagitómetro abdominal tipo Holtain Kahn [207] (**Figura 15**).



Figura 15. Sagitómetro abdominal tipo Holtain Kahn.

1.2.4. Presión arterial

El mismo día de la intervención se midió a los pacientes tanto la presión arterial sistólica como la diastólica mediante un esfigmomanómetro de mercurio (**Figura 16**).

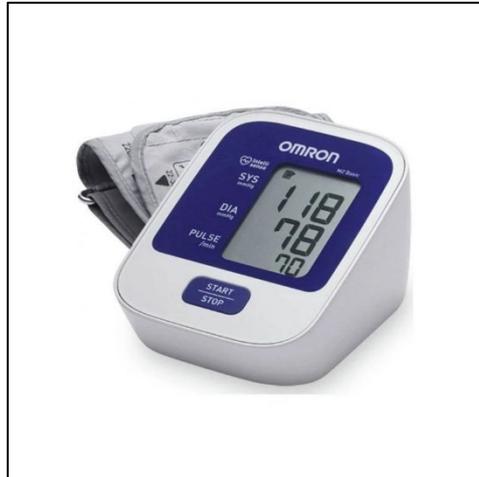


Figura 16. Omron M2 basic, Monitor de presión arterial digital de brazo.

1.2.5. Determinaciones sanguíneas

Para el objetivo 1, la misma mañana antes de la cirugía, con el paciente en ayunas, se recogieron muestras de sangre venosa en dos tubos, uno con EDTA (anticoagulante) y el otro sin él. A partir del suero se analizaron los valores de glucosa, mientras que del plasma se llevaron a cabo otras determinaciones. Para los objetivos 2 y 3 se consultó una analítica previa a la cirugía del paciente, facilitada por el cuerpo de enfermería. La analítica contiene los siguientes parámetros: Glucosa sérica, Triglicéridos, colesterol total, HDL-colesterol y LDL-colesterol, urea, creatinina y enzimas como glutámico-oxalacética transaminasa (Got) y glutámico-pirúvico transaminasa (Gpt).

Además, se les recogió antes de cada intervención quirúrgica dos muestras de sangre extraídas por el enfermero encargado del quirófano, una muestra para bioquímica y otra para un hemograma. A partir de estas muestras, mediante centrifugación a 3500 rpm durante 5 minutos se obtuvieron suero, plasma y sangre del individuo, estas muestras se conservaron en tubos eppendorfs de 1,5 ml y se almacenaron en congeladores a -80° C.

Los parámetros incluidos en este estudio y que son comunes en los cuatros objetivos fueron los siguientes:

- Glucosa sérica
- Triglicéridos, colesterol total, HDL y LDL-colesterol plasmáticos

1.3. Cuestionarios

Se llevó a cabo la recopilación de información clínica con respecto a la obesidad y a los aspectos cronobiológicos de cada individuo mediante cuestionarios.

Se consideraron datos básicos de valoración y clasificación de la obesidad valorados por la sociedad española de obesidad, los cuales fueron incluidos en la historia clínica del paciente [208]. Los cuestionarios realizados por los pacientes respondieron a preguntas que evaluaron las siguientes características:

- Datos básicos generales (fecha de nacimiento, género, etc.)
- Hábitos de tabaquismo y bebidas
- Antecedentes de peso del individuo (al nacer, mayor peso alcanzado, etc.)
- Antecedentes familiares de peso corporal (abuelos, padres, hermanos, hijos e incluso pareja)
- Hábitos de actividad física diaria
- Antecedentes familiares de enfermedades relacionadas con la obesidad
- Evaluación del estado depresivo del paciente
- Salud y enfermedad (Diabetes Sí o No, y tratamiento)
- Medicación crónica

Por otro lado, se recogió información sobre los horarios habituales del sueño y se realizó un cuestionario para evaluar el "tipo de ritmo circadiano" del individuo, el cuestionario de Matutinidad y Vespertinidad de Horne-Östberg (MEQ), el cual consta de 19 preguntas sobre los hábitos diarios de sueño y vigilia y las horas del día en las que se prefieren realizar ciertas actividades. Todo esto fue evaluado por el mismo entrevistador, con cuestiones que incluían: horario habitual de ir a dormir, números de despertares, calidad del sueño, hábitos de siesta, así como su frecuencia y duración entre otros.

Todos los cuestionarios usados para las evaluaciones de los pacientes se encuentran al final de esta memoria de tesis doctoral (**Anexo**).

Por otro lado, también se ahondó en el comportamiento alimentario; se le preguntó al paciente por la hora de inicio y fin de cada una de las comidas que

realizaban al día, (desayuno, almuerzo, comida, merienda y cena), así como la duración de estas.

1.4. Obtención y preparación de muestras biológicas.

Para ejecutar los tres objetivos se utilizó tejido adiposo obtenido durante la operación de cirugía bariátrica para obesidad severa. Las muestras fueron tratadas con un procedimiento común previo al procedimiento específico de cada objetivo.

1.4.1. Preparación de muestras

Las muestras de tejido adiposo de los individuos se obtuvieron aproximadamente 2 horas después de iniciar el procedimiento quirúrgico, procedentes de las regiones abdominales periumbilical (tejido subcutáneo), y omental (tejido intraabdominal o visceral).

Una vez recogidas se transportaron en duquesitas como el de la **Figura 17** con medio DMEM de cultivo (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) de 4,5 g/L de glucosa, 10% de Suero bovino Fetal, (FBS, por sus siglas en inglés, "fetal bovine serum") y una mezcla de antibióticos penicilina-estreptomicina-glutamina (PSG). Manteniendo el frío transportándolo dentro de un contenedor de corcho con hielo.



Figura 17. Contenedor de laboratorio estéril con capacidad de 150 ml.

En primer lugar, las muestras de tejidos adiposo se colocaron en placas Petri de 150 cm de diámetro y con un tampón fosfato salino, PBS ("Phosphate Buffered Saline", por sus siglas en inglés), para proceder a la separación de vasos sanguíneos y otros tejidos (tejido conjuntivo especialmente) del tejido adiposo. A continuación, se procedió a cortar el tejido adiposo en fragmentos de

entre 300 a 500 mg (según las necesidades del objetivo) con la ayuda de unas pinzas y unas tijeras de disección estériles. Cada fragmento de tejido adiposo se pesó en una báscula digital (Figura 18), para proporcionar uniformidad a cada fragmento en el momento de pesarlos y dividirlos en sus respectivas placas.



Figura 18. Báscula digital profesional mini (TL-series).

A partir de aquí utilizaremos el termino explante para referirnos a secciones de tejido adiposo de entre 2-3 mm³ que en su momento formaron parte del conjunto total vivo de un organismo y que se transfieren a un medio artificial para su posterior cultivo *in vitro*.

Finalmente, los explantes de tejido adiposo se cultivaron en DMEM (con el contenido en glucosa según cada objetivo) suplementado con una mezcla de antibióticos PSG de GIBCO #10378-016), y al que se le añade suero bovino fetal (10%) según cada objetivo. Las muestras pasan a incubar a 37 °C bajo una atmósfera humidificada de aire-CO₂ constante (7,5%), a todo esto, se le consideró el periodo de pre-tratamiento.

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

1.4.2. Medición de tamaño de adipocitos

Los fragmentos de TA restantes que no se utilizaron para el procedimiento de cultivo de las muestras, se envolvieron cuidadosamente en papel de aluminio y

se conservaron en congeladores a -80°C para posteriormente realizar las mediciones del tamaño de los adipocitos.

Las mediciones del diámetro de los adipocitos se realizaron siguiendo el siguiente protocolo:

Día 1: la muestra se sumergió durante 7 minutos en paraformaldehído (PFA) al 4%, y seguidamente se procedió a un lavado con PBS durante 1 minuto.

Se pegó al alrededor de una base, cinta adhesiva transparente para crear un molde cilíndrico (**Figura 19A**), sobre la base se vertió unas gotas de pegamento OCT (Compound containing 125 mL), seguido de un fragmento de la muestra, que se cubrió con varias gotas de OCT formando una especie de “sándwich”, es decir, el fragmento de TA se rodea tanto por encima como por debajo de OCT. Este cilindro permaneció en congelación durante 24 horas. 24 horas después quedó listo para su uso en el criostato, tal y como se aprecia en la **Figura 19B**.

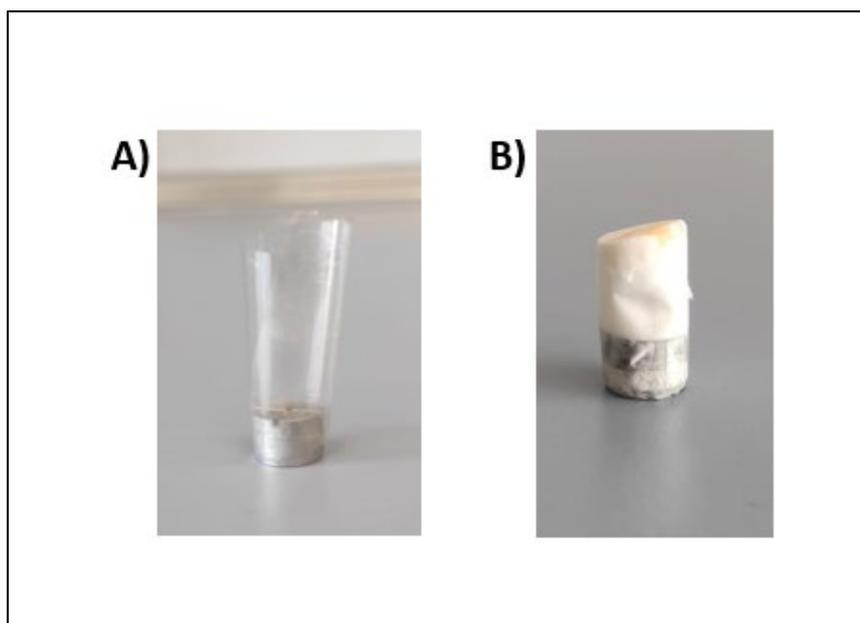


Figura 19. Preparación de muestra para procesamiento en criostato. (A) molde, (B) sándwich.de TA.

Día 2: una vez, bien congelada la muestra, se procedió al corte en un criostato (LEICA Biosystem CM3050 S), para ello, se retiró la cinta de celo transparente y se realizó los primeros cortes a $30\ \mu\text{m}$ para quitar las capas superficiales de OCT hasta el avistamiento de la muestra. Es entonces cuando se cambió el tamaño del corte a $300\ \mu\text{m}$ para la obtención de la muestra, que

posteriormente tras su corte se colocó en el centro de los cilindros de metacrilato del portaobjetos (**Figura 20**), que previamente se habrá preparado de la siguiente manera: Se pega en el portaobjetos tres cilindros de metacrilato con una pasta de silicona de Bayer® y dentro de cada cilindro una gota de PBS.

Las mediciones del tamaño de adipocitos se realizaron repetidamente y en los diferentes cortes sobre la misma muestra de TA, para examinar la variabilidad de las mediciones (Figura 20).

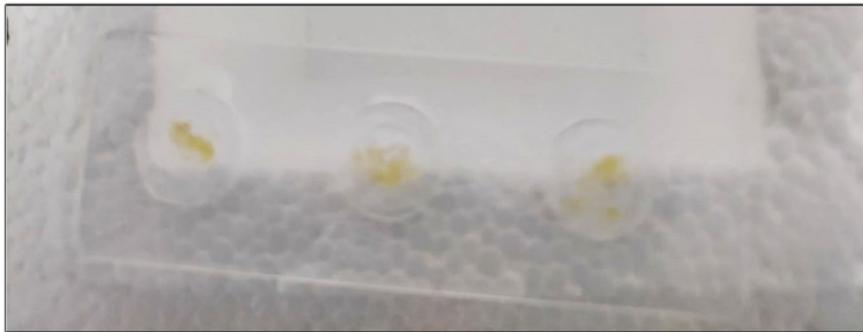


Figura 20. Cortes de TA en cilindros de metacrilato listos para medir tamaño de adipocitos.

Para determinar la fiabilidad técnica y del operador de estas evaluaciones, se examinó la variabilidad (factores de correlación) a partir de medidas duplicadas en varios participantes; en el mismo corte ($r=0,99$), en dos cortes diferentes de la misma muestra de TA ($r=0,99$) y en cortes observados por diferentes operadores ($r=0,94$).

Las mediciones se realizan en el microscopio de fluorescencia (LEICA microsystems CMS GmbH model DMI8) usando el programa que acompaña al microscopio, Leica Application Suite X (LAS X).

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

2. PROTOCOLO DEL OBJETIVO 1A Y 1B

2.1. Procedimiento común entre el objetivo 1A y 1B

El propósito del objetivo 1 es determinar la existencia de ritmos circadianos del gen *LIPe* y de la actividad de la enzima LSH; evaluar si los hábitos de vida como

la hora de la comida y el ayuno nocturno (1A) así como el hábito de siesta (1B) son capaces de influir en el ritmo del gen *LIPE* y la actividad de la enzima LSH.

2.1.1. Recogida y transporte de muestras

La toma de muestras para la población de los objetivos 1 A y B fue siempre a la misma hora, entre las 11:00 y la 13:00 h, y el transporte de las muestras se realizó con medio DMEM 4,5 g/L de glucosa hasta el laboratorio.

2.1.2. Procesamiento y análisis de las muestras

Se utilizaron las muestras conservadas a -80 °C, procedentes de la tesis doctoral de la Dra. María Paz Carrasco Benzo, y se prepararon meticulosamente para su posterior extracción de ARN (Ácido ribonucleico) y para su análisis de expresión genética.

2.1.3. Extracción de ARN

Para la extracción de ARN, primero se prepararon las muestras, para ello se cortaron de cada explante, no más de 100 mg de tejido de manera cuidadosa sobre una estructura firme apoyada en hielo seco para mantener la base fría y que al corte del explante se mantenga intacta sin perder su constitución. Una vez cortadas las muestras, fueron lisadas utilizando el dispositivo Tissuelyser IT (QIAGEN, Hilden, Germany Cat. No. / ID: 85600) a 50 RPM durante 5 minutos mediante la técnica de extracción de ARN con QIAzol® (QIAGEN, Hilden, Germany). El ARN total fue extraído de acuerdo con las instrucciones del Kit del fabricante (RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit), a su vez se usó del kit RNase-free DNase Set (QIAGEN, Hilden, Germany Cat. No. / ID: 79254) para asegurarnos que el ARN total extraído se mantuviese lo más puro posible. Posteriormente se procedió a la cuantificación del ARN total presente en cada muestra. El ARN se cuantificó con una medida de absorbancia de 260 nm, mediante el espectrofotómetro Nanodrop ND1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

También, se comprobó la pureza del ARN mediante el cálculo de la relación entre la absorbancia a 260 y a 280 nm (A_{260}/A_{280}), siendo los valores estándar entre 1,7-2,1, para asegurarnos de la calidad de las muestras [209].

2.1.4. Retrotranscripción y PCR cuantitativa a tiempo real

La retrotranscripción o transcripción inversa implicó la síntesis de ADN (ácido desoxirribonucleico) a partir de ARN de las muestras. Se llevó a cabo a partir de 50ng de ARN total y se usó el ADNc iScript™ (QIAGEN, Hilden, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Todos los cebadores de hexámeros aleatorios y el gen *LIPE*, la enzima LSH, así como el housekeeping, gen control (S18) se obtuvieron de la casa comercial (Invitrogen, Carlsbad, CA). La PCR cuantitativa a tiempo real se realizó usando SYBR green Master kit (Invitrogen, Paisley, UK) para el gen *LIPE*. Todas las muestras se hicieron por duplicado y el ARN mensajero (ARNm) de los genes reloj y el ARN ribosómico del control (ARNr) se amplificó en pocillos. Una vez finalizada la RT-qPCR, se calculó la cantidad relativa de los transcritos usando la fórmula $2^{\Delta\Delta Ct}$ [210].

Ct se define como los valores del umbral del ciclo del proceso de PCR, al cual la fluorescencia es significativamente superior a la fluorescencia basal. El ΔCt es la diferencia entre el Ct de cada uno de los genes reloj estudiados y el Ct del gen control (S18).

2.1.5. Análisis de ritmos circadianos

Tras calcular los ΔCt de los genes correspondientes, los ritmos circadianos de la expresión genética se determinaron en base a la expresión de cada uno de los seis tiempos circadianos, CT ("Circadian Time", por sus siglas en inglés). Para ello, se realizó la normalización de los datos que consistía en:

- a) Aplicar $2^{-(\Delta Ct)}$ para la obtención de la expresión relativa de cada CT. A partir de la expresión relativa, obtener la mediana de los 6 CTs para cada sujeto y dividir cada CT por la mediana. Con estos datos normalizados por la mediana, se saca la media de todos los puntos dentro de cada individuo (o el mesor, según interese, aunque da prácticamente el mismo resultado) y se divide cada punto por la media. Estos datos son los que se usarán para el análisis del ritmo circadiano, en el programa RITME.

Este enfoque es un método viable para analizar los perfiles de expresión genética y, anteriormente, se ha demostrado que supera a otros métodos, como

la globalización total del ARN, la centralización y la normalización de percentiles [211].

$$\Delta CT = Ct \text{ del gen diana} - Ct \text{ del gen control (18S) de cada muestra}$$

2.1.6. Análisis de proteínas mediante la técnica de Western Blot

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

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

Immunotransferencia: Cuando ya tuvimos toda la proteína en la membrana de nitrocelulosa, se realizó la inmunotransferencia a una dilución 1:1000 del anticuerpo monoclonal de conejo anti-pHSL ((Phospho-HSL, S660) #4126D, Cell Signaling Technology, Danver, MA), cuyo fin es el de medir la Ser650 en humanos, uno de los dos principales determinantes de la activación de la LSH mediada por la proteína quinasa A frente a sustratos lipídicos [212]. Después de lavar las membranas, se incubaron con el anticuerpo anti-conejo de cabra conjugado con peróxido de rábano picante (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EE. UU.) en TBS-T.

La unión de anticuerpos se visualizó utilizando el sistema de detección de transferencia Western quimio-luminiscente Pierce (PerkinElmer, Madrid, España). Las membranas se volvieron a bloquear y se lavaron con TBS-T.

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

2.2. Exclusivo del objetivo 1B

2.2.1. Características de la siesta

Se formularon varias preguntas sobre la siesta, si se duerme habitualmente la siesta (sí/no); si la respuesta era afirmativa, cuál era el momento (inicio y fin de la siesta), la frecuencia (veces por semana) y la duración (minutos de siesta). Los sujetos que respondieron que no dormían la siesta se consideraron “Non-nappers”, de la traducción al inglés de siesta, mientras que los que dormían la siesta al menos una vez a la semana se clasificaron como “Nappers”. Del total de la muestra, 8 participantes dormían de manera habitual la siesta y 9 sujetos no la dormían.

2.2.2. Análisis de ritmo circadianos

Para el análisis de expresión del ritmo del gen *LIPE* y de la proteína LSH se cogieron los datos de expresión del objetivo 1A, debido a que son la misma población, con la diferencia de que esos mismos datos se dividieron según las características de siesta de la población, segmentando así la población en dos subpoblaciones, Nappers y Non-Nappers.

3. PROTOCOLO DEL OBJETIVO 2

La finalidad del objetivo 2 es determinar el efecto de la melatonina sobre la sensibilidad a la insulina del tejido adiposo humano subcutáneo y visceral.

3.1. Recogida y transporte de muestras.

La obtención de las muestras para el objetivo 2 fueron siempre entre las 18:00 y 20:00 horas para todos los participantes, y el transporte de la muestra se realizó con medio DMEM de 4,5 g/L de glucosa+ PSG+ FBS.

3.2 Cultivos de explantes de tejido adiposo

El propósito de este objetivo fue el de determinar la influencia de la melatonina (MLT) sobre la sensibilidad a la insulina del tejido adiposo, en explantes de tejido adiposo de sujetos sometidos a cirugía de bypass gástrico. Simulando lo que

sucedería durante una cena tardía donde coincide la insulina (producida por la entrada de comida) con la melatonina, (hormona de noche).

Para alcanzar este objetivo, una vez procesado el tejido como se ha descrito en el apartado 1.4.1, se llevó a cabo el cultivo de los explantes de tejido adiposo subcutáneo y visceral en placas de 12 pocillos; distribuyendo las muestras en placas tratadas por la mañana (8 AM) y placas tratadas por la noche (20 PM)

A continuación, se muestra la tabla de distribución de la población.

Tabla 5. Distribución de población entre mañana y noche

Melatonina	Hora	Pacientes
5000 pg/mL	8:00 AM	P1-P22 (n=22)
	20:00 PM	P11-P22 (n=11)

3.3 Cultivo y tratamiento de las muestras

Tras finalizar el procesamiento del tejido adiposo, se colocó en cada pocillo explantes hasta llegar a los 2 g de explantes de TA subcutáneo o visceral (según pocillo), con 2 ml de DMEM 4,5 g/L de glucosa suplementado con una mezcla de antibióticos PSG y un 10% de FBS. A continuación, se realizó la incubación de las placas hasta el día siguiente a una temperatura de 37 °C, en una estufa con atmósfera humidificada de aire y CO² al 7% de manera constante durante toda la noche.

Después, la mañana siguiente, se aplicaron cuatro tratamientos diferentes en condición de mañana (AM) y de noche (PM). Las muestras fueron: Control (C), medio DMEM 1 g/L de glucosa, mezcla de antibióticos PSG; insulina sola (I), medio DMEM 1 g/L de glucosa, PSG, más 10 nM de insulina; melatonina sola (M), medio DMEM 1 g/L de glucosa, PSG, más 5000 pg/mL; e insulina más melatonina (I+M), una mezcla de medio DMEM 1 g/L de glucosa, PSG, con insulina y melatonina (las mismas concentraciones que antes).

Debido a la baja cantidad de tejido adiposo, sólo se dispuso de muestras de 12 pacientes para la condición PM.

Las placas se pretrataron durante 1 hora, a las 8 AM y a las 8 PM con medio control y medio melatonina a los pocillos correspondientes. Tras esa hora, se quitó el contenido y se lavó con PBS. A las 9 AM y 9 PM las placas recibieron un tratamiento agudo adicional con insulina ((I), 10 nM), melatonina ((M), 5000 pg/mL), e insulina más melatonina (I+M, mismas concentraciones). El Control no recibió ningún tratamiento, aunque recibió los mismos cambios de medio a la vez que el resto de las muestras para permitir comparaciones (**Figura 21**). Tras una incubación de 10 minutos, se recogieron los explantes de tejido adiposo subcutáneo y visceral, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron en congeladores a -80 °C. Posteriormente se realizó la extracción de ARN y se analizó la relación de AKT fosforilada (pAKT) / AKT tota (tAKT) mediante Western Blot.

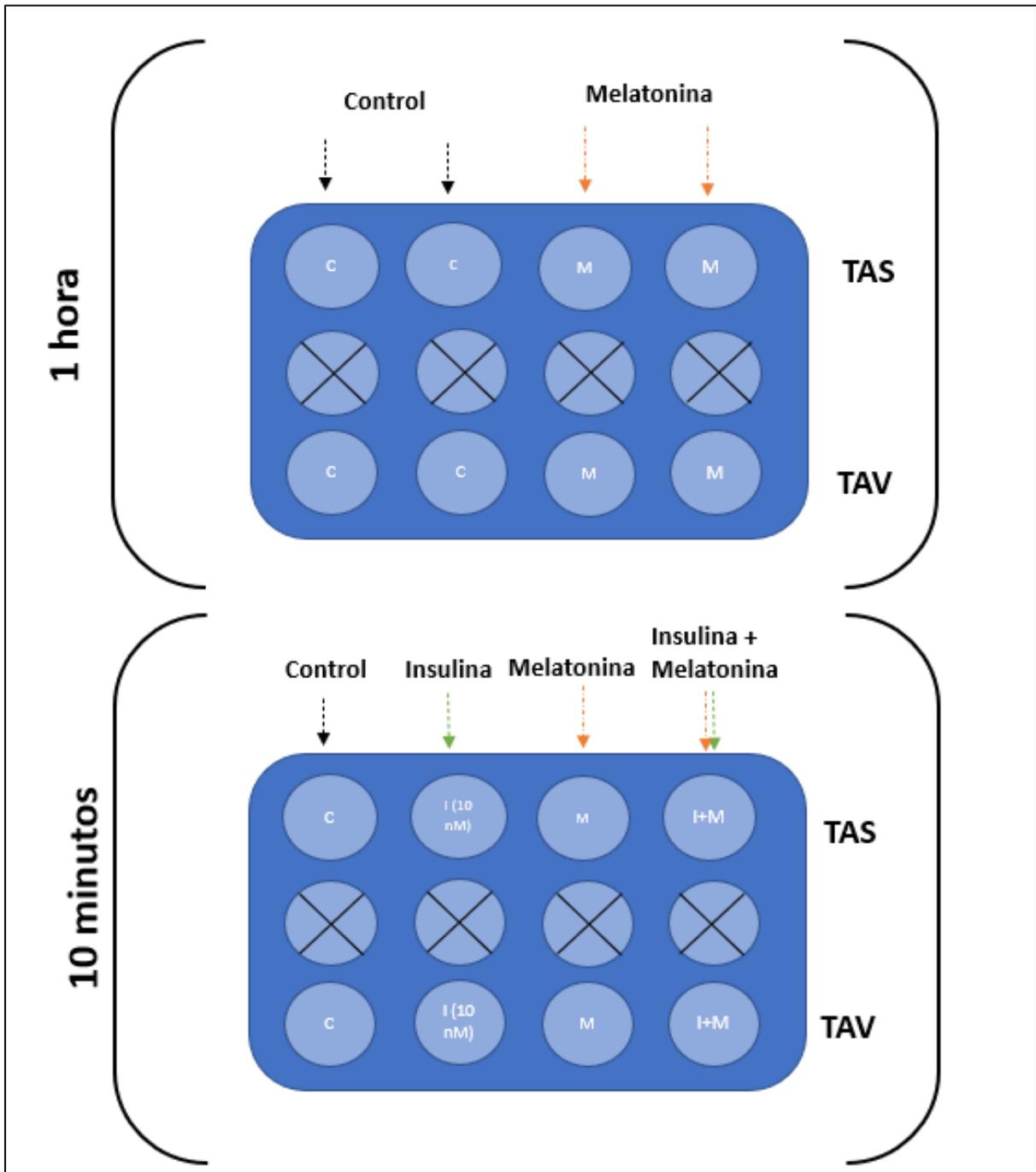


Figura 21. Diseño de placa. C= medio control; I= tratamiento con insulina 10 nM; M= tratamiento con melatonina (5000 pg/mL); I+M= Tratamiento simultáneo de insulina (10nM) y melatonina (5000 pg/mL). TAS = Tejido adiposo subcutáneo; TAV= tejido adiposo visceral. El diseño de la placa fue la misma tanto para el tratamiento AM como para el tratamiento PM. Creación propia.

3.4. Análisis de proteínas mediante la técnica de Western Blot

Los explantes de tejidos subcutáneos y viscerales se homogeneizaron en tampón de lisis RIPA (0,1% p/v SDS, 0,1% p/v desoxicolato sódico, 1% v/v Triton X-100 en PBS) con cóctel inhibidor de fosfatasa 1:100 (v/v) (SC-45045, Santa

Cruz, Heidelberg, Alemania) y cóctel inhibidor de proteasas 1:200 (v/v) (Sigma, P9599). Los homogeneizados tisulares se sometieron a sonicación y se centrifugaron a 10.000x g durante 10 minutos a 4 °C. Se recuperaron los sobrenadantes y se centrifugó la muestra. Con los sobrenadantes se realizó un ensayo con ácido bicinonínico para determinar la concentración de proteínas. Se añadió tampón Laemmli (Biorad, EE.UU.) y las muestras se calentaron a 95 °C durante 5 minutos. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, que se bloquearon con leche descremada al 5% (p/v) en TBST (10 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,5% Tween 20) durante 60 min. A continuación, las membranas se incubaron con una dilución 1:1.000 de anticuerpos anti fosfo-AKT de conejo Ser473 (#9271, CellSignaling, MA, EE.UU.) y una dilución 1:1.000 de anticuerpos anti AKT de conejo (#9272, CellSignaling, MA, EE.UU.). Tras lavar las membranas con TBST, se incubaron en IgG-HRP anti-conejo en tampón de bloqueo durante 1 h. Los complejos antígeno-anticuerpo se visualizaron mediante quimioluminiscencia mejorada con Novex™ ECL (Thermo Fisher Scientific, MA, EE.UU.) en el sistema de imágenes western blot Amersham ImageQuant™ 800 (Cytiva, EE.UU.).

3.5 Análisis de la sensibilidad del tejido adiposo a la acción de la insulina

La sensibilidad del TA a la acción de la insulina se determinó analizando el grado de fosforilación que presentaba la proteína AKT en los explantes cuando se estimulaban con insulina. El grado de fosforilación se calculó dividiendo el valor de pAKT entre el valor de tAKT. Los valores de pAKT y tAKT se obtuvieron en primer lugar por WB, como se detalla en el apartado anterior.

Un marcador aceptado en la determinación de la sensibilidad a la insulina es la relación de AKT fosforilada respecto a la total (pAKT/tAKT).

En nuestro estudio pretendemos estudiar el cambio de la sensibilidad a la insulina del tejido adiposo humano en presencia de melatonina. Nuestra hipótesis es que la sensibilidad a la insulina disminuye cuando el tejido adiposo se expone a melatonina. Es por ello que esperamos que se produzca una disminución en la relación o ratio pAKT/tAKT en aquellos tratados con melatonina e insulina al comparar solo con insulina.

3.6 Preparación de la biblioteca y secuenciación del ARN

El ARN mensajero se purificó a partir del ARN total utilizando perlas magnéticas unidas a oligo poli-T. Tras la fragmentación, se sintetizó la primera cadena de ADNc utilizando cebadores hexámeros aleatorios, seguida de la síntesis de la segunda cadena de ADNc. La biblioteca quedó lista después de la reparación del extremo, la cola A, la ligadura del adaptador, la selección del tamaño, la amplificación y la purificación. El kit utilizado para la preparación de la biblioteca fue NEB Next® Ultra™ RNA Library Prep Kit.

La biblioteca se verificó con Qubit y PCR en tiempo real para la cuantificación, y con un bioanalizador para la detección de la distribución de tamaños. Las bibliotecas cuantificadas se agruparon y secuenciaron en plataformas Illumina según la concentración efectiva de la biblioteca y la cantidad de datos. Los índices codificados se agruparon según las instrucciones del fabricante. Tras la generación de clústeres, las preparaciones de bibliotecas se secuenciaron en una plataforma Illumina Novaseq6000 y se generaron lecturas paired-end (estrategia PE150), que fueron realizadas por Novogene Co., LTD (Pekín, China). El número medio de lecturas fue de $44.770.062 \pm 9.393.514$ (media \pm DE).

4. PROTOCOLO DEL OBJETIVO 3

El propósito del objetivo 3 fue el de determinar la influencia del ayuno intermitente en la movilización de grasa de los explantes de tejido adiposo subcutáneo, comparándolo con un patrón de alimentación regular; y las diferencias entre un ayuno intermitente temprano de uno tardío.

4.1. Recogida y transporte de muestras.

La recogida de muestras de cada uno de los participantes se ejecutó siempre entre las 18:00 y 20:00 horas, y el transporte de las muestras se realizó en medio DMEM 4,5 g/L de glucosa con sus suplementos PSG y 10 % de FBS.

Para llevar a cabo el ensayo se fijaron 4 condiciones, que consistieron en:

- Control: Simula el periodo de ingesta actual de 16 horas. De 8:00 a 00:00 h (16/8)

- eTRE: Simula una ingesta temprana (periodo de ingesta 8:00-12:00 h) (4/20)
- dTRE: Simula una ingesta tardía (periodo de ingesta 16:00-20:00 h) (4/20)
- Fasting: Simula un periodo de ayuno continuo 24 h (Sin periodo de ingesta)

4.2 Cronología del diseño experimental

Una de las características del objetivo 3 fue el tiempo invertido en la parte experimental, el tiempo trabajado en el laboratorio constó de 3 días: El día 0 abarcaba el día de encuentro con el paciente, donde se llevó a cabo la entrevista y la recogida de muestra; el día 1 consistió en la aplicación de los distintos tratamientos; y el día 2, además de seguir aplicando los tratamientos, se recogieron los medios de cultivo y los explantes cada 4 horas tal y como se aprecia en la **Figura 22**.

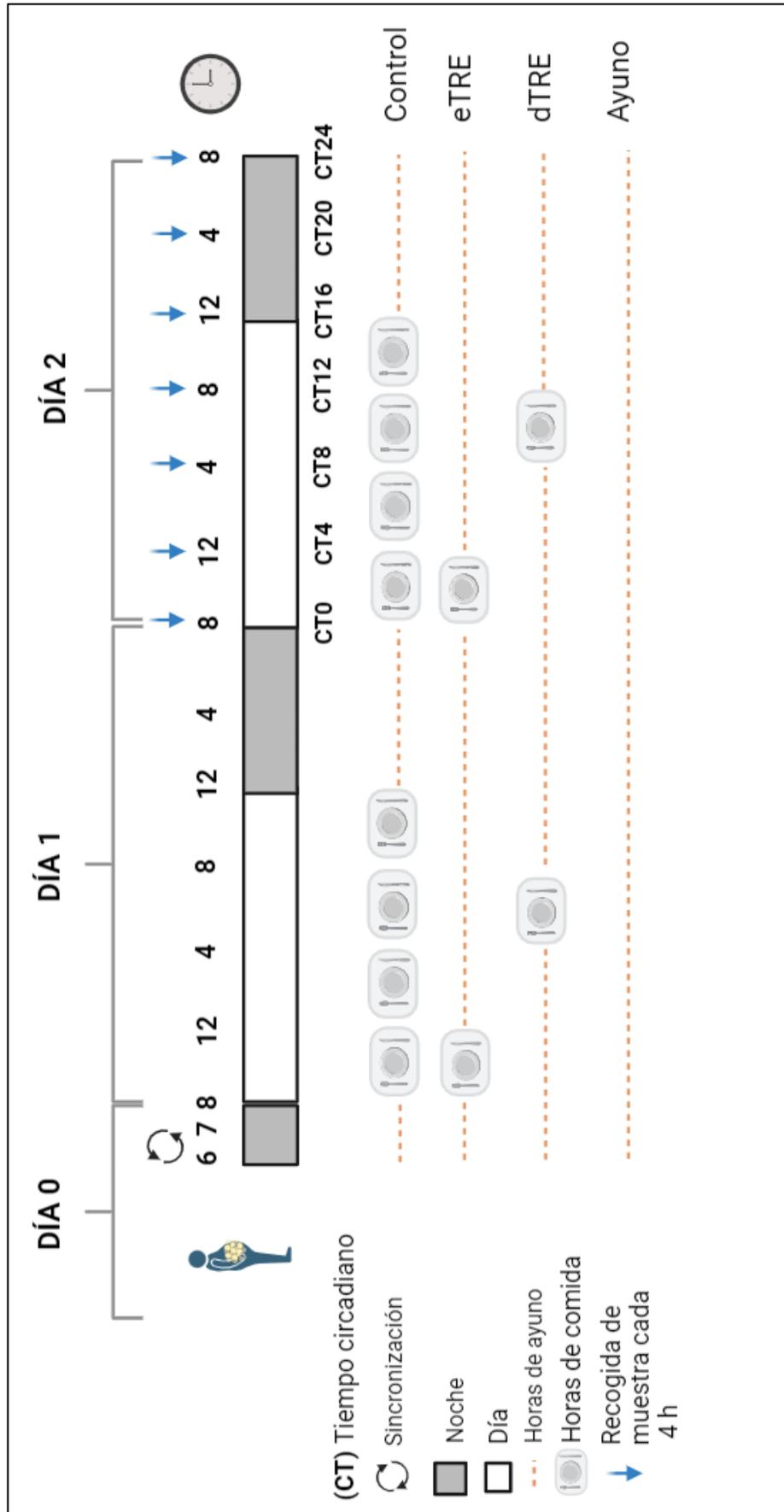


Figura 22. Organigrama del experimento del objetivo 2. Creación propia, diseñada con Biorender.

4.3 Diseño y tratamiento de la placa

Los medios usados para el tratamiento fueron los siguientes: medio DMEM, que se suplementó con un 10% de SBF y alta concentración de glucosa (4,5 g/L) para simular las condiciones de comida (**Medio-comida**), y DMEM sin glucosa, y sin SBF, para simular las condiciones de ayuno (**Medio-ayuno**). Todos los medios se suplementaron con una mezcla de penicilina-estreptomicina-glutamina (PSG).

Los pasos del protocolo se detallan a continuación.

Día 0: Recogida y procesado de muestra.

Se procedió a la recopilación de los datos de los sujetos como ya se detalla en el punto 1 de material y método. Tras finalizar el procedimiento quirúrgico de bypass gástrico se obtuvieron las muestras de tejido adiposo, se transportó y se trataron en las instalaciones del área técnica de cultivo celular (SACE), tal y como se detalla en el apartado 1.4 de material y método.

Se prepararon 7 placas de cultivo, de 6 pocillos cada placa (**Figura 23**), en el que se distribuyeron explantes subcutáneos de TA (400 mg), una placa por cada punto temporal del ciclo circadiano (es decir, Tiempo circadiano cero (CT0 [hh: mm] [08: 00]) CT4 [mediodía 12: 00], CT8 [16: 00], CT12 [20: 00], CT16 [medianoche 00: 00], CT20 [04: 00] y CT24 [08: 00]). Una vez rellenas todas las placas, se incubaron cada explante con 400µl del medio correspondiente. En todos los casos los explantes se incubaron con Medio-Comida hasta medianoche. A medianoche, los explantes se lavaron con PBS y el medio de cultivo se cambió a Medio-ayunas para simular el ayuno nocturno.

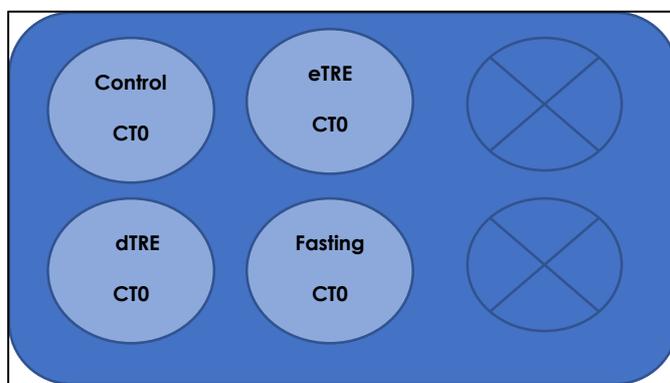


Figura 23. Ejemplo de la placa del primer punto (CT0) usada en el experimento. C= control, eTRE= alimentación temprana, dTRE= alimentación tardía, F= fasting (ayunas). Tiempo circadiano CT "Circadian Time, por sus siglas en ingles. Fuente: elaboración propia.

Día 1: Sincronización de los cultivos y periodos de ingesta/ayuno.

a) Sincronización de los cultivos

A las 06:00 de la mañana del día 1, el medio de ayuno fue reemplazado con medio de ayuno suplementado con dexametasona (DEX), (DMEM + PSG, suplementado con 1 μ M DEX (0.4 mM en etanol) (Brunschwig AG®, Basel, Switzerland) para la sincronización de los tejidos, transcurrida una hora, a las 07:00 h, se lavaron los explantes con PBS, y de 7-8 a.m. se volvieron a incubar con medio de ayuno, para continuar con la simulación de ayuno nocturno.

b) Periodos de ingesta y ayuno

A las 8:00 h, se inició la condición de alimentación para los grupos Control y eTRE. El grupo Control fue incubado durante 16 h, refrescándolo cada 4 horas hasta la medianoche, con medio de comida para simular un patrón dietético regular con cuatro comidas diarias (cada 4 horas), y durante la noche el tejido adiposo se mantuvo con el medio de ayuno (desde medianoche hasta las 8 a.m. del día siguiente), para simular el ayuno nocturno. Por otro lado, eTRE se incubó sólo durante 4 horas con medio-comida hasta las 12 del mediodía, permaneciendo el resto del día y la noche en condiciones de ayuno. Por otro parte, dTRE de 16 a 20 h se incubó durante 4 horas con medio-comida, y las horas anteriores y posteriores se mantuvo con medio de ayuno. Finalmente, el grupo ayuno fue incubado continuamente durante las 24 h con medio-ayuno.

Día 2: ayuno/ingesta y recogida de explantes y medio de cultivo

Durante este segundo día se mantuvo el mismo patrón de alimentación/ayuno que se seguía durante el día 1, mientras se iban recogiendo los explantes y el medio de cultivo cada 4 horas, como se muestra en la **Figura 22**. Todos los medios recogidos se conservaron en eppendorf de 1.5 mL y los explantes de TA en criotubos de congelación para seguidamente ser congelados en nitrógeno líquido y almacenarse en congeladores a -80 °C para los análisis posteriores.

4.3.1 Medición de glicerol en el medio de cultivo.

Para analizar la movilización de grasa del tejido adiposo subcutáneo, se procedió a la medición de la liberación de glicerol en el medio de cultivo. El glicerol se determinó usando un reactivo llamado glicerol libre “Free-glycerol” (Sigma

F6428) (Sigma- catNO#F6428, Saint Louis, Missouri, U.S.A.) y se determinó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se preparó una curva estándar usando una solución estándar de glicerol (Sigma G7793) en una placa negra estéril de 96 pocillos, se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, pasado ese tiempo se detectó la absorbancia a 540 nm con lectores de placas CLARIOstar® (Isogen Life Science B.V. Utrecht, Países Bajos) para medir el glicerol liberado que se representó en cantidad de moles por hora y por gramo de tejido (mol/h/g).

5. MÉTODO ESTADÍSTICO

5.1. Estadística del objetivo 1A

Las características de los participantes se expresaron como media y desviación estándar.

Los datos brutos de expresión de genes y cuantificación de proteína se normalizaron usando la hoja de cálculo de Microsoft Excel®. Los parámetros del ritmo como: mesor, amplitud y acrofase de los individuos se calcularon realizando un "análisis Cosinor" para ajustar los datos de cada sujeto con formas de onda de 24 h mediante el software de análisis de coseno según las pautas del programa RITME® versión 4 (desarrollado por A. Diez-Noguera, Universidad de Barcelona, 2012).

Esos mismos datos de expresión se ingresaron en CirWave® (versión 14.0, desarrollado por R.A. Hut; disponible en <https://www.euclock.org>) para el análisis del ritmo cosinor poblacional.

Por otro lado, se realizaron análisis de correlación de Pearson para evaluar las asociaciones entre las características de la actividad de la LSH con la duración del ayuno nocturno y el momento de la ingesta de alimentos. También, se utilizó un análisis de medidas repetidas (ANOVA) para determinar las diferencias significativas en las características de los ritmos de actividad de LSH, como la amplitud, la acrofase y el porcentaje de ritmicidad, entre la duración del ayuno largo y corto, la cena temprana o tardía y el almuerzo temprano o tardío. Ajustando por la grasa corporal, el diámetro de los adipocitos, la duración del sueño, el horario del desayuno y la cena.

Para los análisis estadísticos de Pearson y ANOVA, se utilizó IBM SPSS Statistics® para Windows (versión 20.0; Armonk, NY, EE. UU.) El nivel de significación para todas las pruebas estadísticas e hipótesis se fijó en $P < 0,050$.

5.2. Estadística del objetivo 1B

Las características entre la población que duerme siesta y no la duerme se expresaron como media y desviación estándar. Las diferencias entre las características se evaluaron mediante la prueba T de Student.

Las variables cualitativas (como el sexo) se presentaron como frecuencia y porcentajes, y la diferencia se evaluó mediante la prueba chi-cuadrado.

Para el análisis cosinor se utilizó un programa informático (RITME®, versión 4, desarrollado por A. Diez-Noguera, Univ. Barcelona, 2012). Para determinar las diferentes características de ritmos circadianos de 24 h de la expresión de *LIFE*: mesor, amplitud acrofase, y porcentaje de ritmo. El porcentaje de ritmo se calculó como el porcentaje de la varianza explicada por el modelo coseno ajustado, que corresponde al coeficiente de determinación de determinación R^2 en el análisis de regresión [213].

El valor P calculado para evaluar si un ritmo era significativo o no, se obtuvo dividiendo la varianza de los datos explicada por el modelo coseno por la varianza residual (o no explicada), lo que nos dio el coeficiente F Snedecor.

Para los análisis globales de la población, se consideró que había ritmicidad en los que duermen siesta y los que no duermen siesta cuando el valor $P < 0,05$, mientras que para cada individuo se consideró que había ritmicidad cuando el porcentaje de ritmo era $>60\%$ [93, 113].

Se realizó un análisis ANCOVA para determinar las diferencias en estas características entre los que duermen siesta y los que no duermen siesta, utilizando el sexo y la edad como covariables. Otros análisis de sensibilidad incluyeron la duración del sueño nocturno como covariable. Se realizaron los mismos análisis para el estudio de la actividad de lipasa sensible a hormona.

Los análisis descriptivos y de ANCOVA se realizaron mediante IBM SPSS Statistics® for Windows (versión 28.0; Armonk, NY, EE. UU.). Por otro lado, se

utilizó el programa CirWave® (versión 14.0, desarrollado por R.A. Hut; disponible en <https://www.euclock.org>) como extensión de los análisis cosinor para definir la curva cosinor. La curva se dibujó con el programa GraphPad® (versión 8.0.2, GraphPad Prism® disponible en <http://www.graphpad.com>). El nivel de significación para todas las pruebas estadísticas e hipótesis se estableció con un valor P de dos colas $<0,05$.

5.3. Estadística del objetivo 2

Los datos cuantitativos de los pacientes se expresaron como media y desviación estándar. Los datos del ratio pAKT/tAKT no siguieron una distribución normal, por lo que se transformó en logaritmo. Usando para los análisis estadísticos el logaritmo de la ratio pAKT/tAKT (sensibilidad a la insulina).

Se utilizó un modelo mixto lineal para determinar las posibles diferencias entre tratamientos para la sensibilidad a la insulina (log ratio pAKT/tAKT) considerando como factores fijos: tratamiento (C, I, M, I+M); horario (AM y PM); y tipo de TA (subcutánea y visceral). La variable paciente se consideró como efecto aleatorio para tener en cuenta las correlaciones entre los datos de un mismo paciente.

El modelo consideró las interacciones entre el tratamiento y el momento del día, y entre el tratamiento y el tipo de tejido adiposo. Se realizaron análisis exploratorios adicionales en ambos tipos de tejido (subcutáneo y visceral) por separado.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con IBM SPSS® Statistics para Windows (versión 21.0, Armonk NY, EE. UU.). El nivel de significación para todas las pruebas estadísticas e hipótesis se fijó en $P < 0,05$. El error estándar de la media del (ratio pAKT/tAKT) se calculó mediante Bootstra Stata (StataCorp. 2015. Software estadístico Stata: Release 14. College Station. TX: StataCorp LP.). Y para diseñar las figuras se utilizó el software GraphPad Prism® 8.0.

Los datos de los análisis de secuenciación del ARN se realizaron a nivel de transcrito. Se filtró los transcritos manteniendo aquellos con al menos 10 recuentos en al menos 6 muestras (de 177456 transcritos a 62558 transcritos) utilizando el paquete SARTools (incluyendo DESeq2). Expresión diferencial con

DESeq2 y test de Wald. p -val-cutoff = 0.05. Los análisis de enriquecimiento de rutas (Pathway Enrichment Analyses, PEA) se realizó con el paquete clusterprofiler consultando la base de datos kegg (función enrichkegg). No se obtuvo un FDR significativo, sin embargo, representamos aquellos que alcanzan significación sin ajuste dividiéndolos en genes regulados al alza o a la baja en las muestras tratadas con (I+M) en comparación con I solo.

5.4. Estadística del objetivo 3

Las características de los participantes se expresaron como media y desviación estándar. La liberación de glicerol se expresó en mol/h/g por tejido. Los datos de mol/h/g de glicerol no seguían una distribución normal, de manera que se transformaron logarítmicamente, usando para los análisis estadísticos el logaritmo de mol/h/g de glicerol.

Se utilizó un modelo mixto lineal para determinar las diferencias potenciales en la liberación de glicerol entre las distintas condiciones de tratamiento, considerando como factores fijos: el tratamiento (C, eTRE, dTRE, 24h-F); el momento (cada punto del ciclo circadiano). El individuo se consideró el efecto aleatorio para analizar las correlaciones entre los datos del mismo paciente. La variable de respuesta fue el logaritmo de la liberación de glicerol (mol/h/g).

Se desarrolló un modelo secundario mixto para analizar las diferencias entre eTRE y dTRE en la liberación media de glicerol en 24 horas después de emparejar por duración del ayuno tanto eTRE como dTRE. Considerando como factores fijos: el tratamiento y la duración del ayuno, y como factor aleatorio, el paciente. Se consideraron las interacciones entre el tratamiento y la duración del ayuno.

Todos los análisis se ajustaron por distintas covariables; edad, sexo, tratamiento farmacológico y cronotipo individual (Cuestionario de matutinidad- vespertinidad de Horne- Östberg (MEQ)).

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando IBM SPSS Statistics para Windows (versión 28.0; Armonk, NY, EE.UU.). Todas las pruebas estadísticas y el nivel de significación de las hipótesis fueron $P < 0,05$. El error estándar y la

liberación total de glicerol durante 24 horas se calculó mediante IBM SPSS Statistics. El Software GraphPad® (versión 8.0.2, de <http://www.graphpad.com>) se utilizó para realizar las figuras.

6. ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO

Se realizó una revisión sistemática sobre el tema objeto de estudio para el desarrollo de este trabajo utilizando las reglas del método científico.

Para la búsqueda bibliográfica se utilizó la base de datos PubMed (EE. UU.). S. National Library of Medicine), base de datos informática a la que se puede acceder a través de Internet en la URL [www. Ncbi.nlm.nih.gov/PubMed](http://www.Ncbi.nlm.nih.gov/PubMed), que tiene acceso a revistas con alto factor de impacto en el campo en el que se enmarca esta tesis, como obesidad, melatonina, sensibilidad a la insulina, *LIPE*, siesta, glicerol, ayuno intermitente, etc.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN DEL OBJETIVO 1A.
ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE RITMOS
CIRCADIANOS EN LIPASA SENSIBLE A HORMONA Y
EL GEN *LIPE* EN EXPLANTES DE TEJIDO ADIPOSEO
HUMANOS: HORARIO DE COMIDA Y AYUNO**

Existencia de ritmo circadiano

El mejor método para el estudio de la fisiología del tejido adiposo humano es hacerlo en el propio tejido. Sin embargo, es un procedimiento muy complicado de llevar a cabo, ya que el método de obtención es invasivo para el sujeto y además, para su análisis en cronobiología es necesaria una cantidad importante de tejido adiposo, ya que se necesitan entre 40-50 gramos de tejido para realizar un análisis de 24 horas. Los diseños experimentales en cronobiología se fundamentan en que todas las variables biológicas exhiben ritmo. Para las variables de tiempo, el efecto del intervalo de muestreo es muy importante, ya que a medida que se aumenta la frecuencia de muestreo nos acercamos cada vez más a una realidad representativa del ritmo biológico, por ello es esencial una recogida mínima de 6 puntos durante las 24 h del día [214].

Existencia de ritmo circadiano robusto en LSH y LIPE

Nuestros resultados demuestran la existencia de un ritmo circadiano robusto en la actividad de la LSH ($P= 0,023$), alcanzando su punto de máxima expresión a la media noche. Asimismo, se observa un patrón similar en la expresión del gen que codifica para la LSH, el *LIPE*, que también muestra un ritmo circadiano muy marcado ($P= 0,0002$) con una acrofase también muy cercana a la media noche (**Figura 24**).

La característica de la población estudiada se detalla en la siguiente tabla (**Tabla 6**).

Tabla 6. Características generales de la población estudiada para el objetivo 1A.

Población total (n=18)		
CARACTERISTICAS	Media	DS
Edad (años)	46	11
IMC (kg/m ²)	42	6
Grasa corporal total (impedancia; %)	41,06	8,87
Rasgos de síndrome metabólico		
Circunferencia de cintura (cm)	126,57	15,32
*Triglicéridos (mmol/L)	1,51	0,82
*Glucosa (mmol/L)	6,43	1,87
*HDL-c (mmol/L)	1,26	0,46
*Presión arterial diastólica (mmHg)	82,78	6,18
*Presión arterial sistólica (mmHg)	138,22	15,16
Puntuación de Síndrome Metabólico	3,18	1,38
HABITOS DE VIDA		
Horarios de comida		
Inicio de desayuno (hh:mm)	8:51	1:03
Inicio de comida (hh:mm)	14:40	0:36
Inicio de cena (hh:mm)	21:43	0:49
Inicio del sueño (hh:mm)	0:29	1:05
Duración del sueño (h)	7,15	1,44
Duración del ayuno nocturno (h)	10,78	1,44
TEJIDO ADIPOSO		
Tamaño total de los adipocitos (diámetro; µm)	97,62	8,72
µm: micrometro; *Condiciones de ayuno.		

Como podemos observar en la tabla 6, la población estudiada, está constituida por individuos que pertenecen al grupo de obesidad de grado 3, por su IMC >42 (kg/m²), y que presentan concentraciones de glucosa en ayunas elevadas, mientras que el resto de valores se encuentran dentro de la normalidad de acuerdo con la Federación internacional de diabetes (IDF, “International Diabetes Federation” , por sus siglas en inglés) [215]. El horario habitual de las comidas de los sujetos estudiados coincide con los horarios típicos en España, siendo la duración de sueño nocturno inferior a 7 horas. Los adipocitos se consideran grandes, ya que presenta un tamaño o diámetro mayor a 90 µm [216], lo que era de esperar por ser individuos con obesidad clase 3.

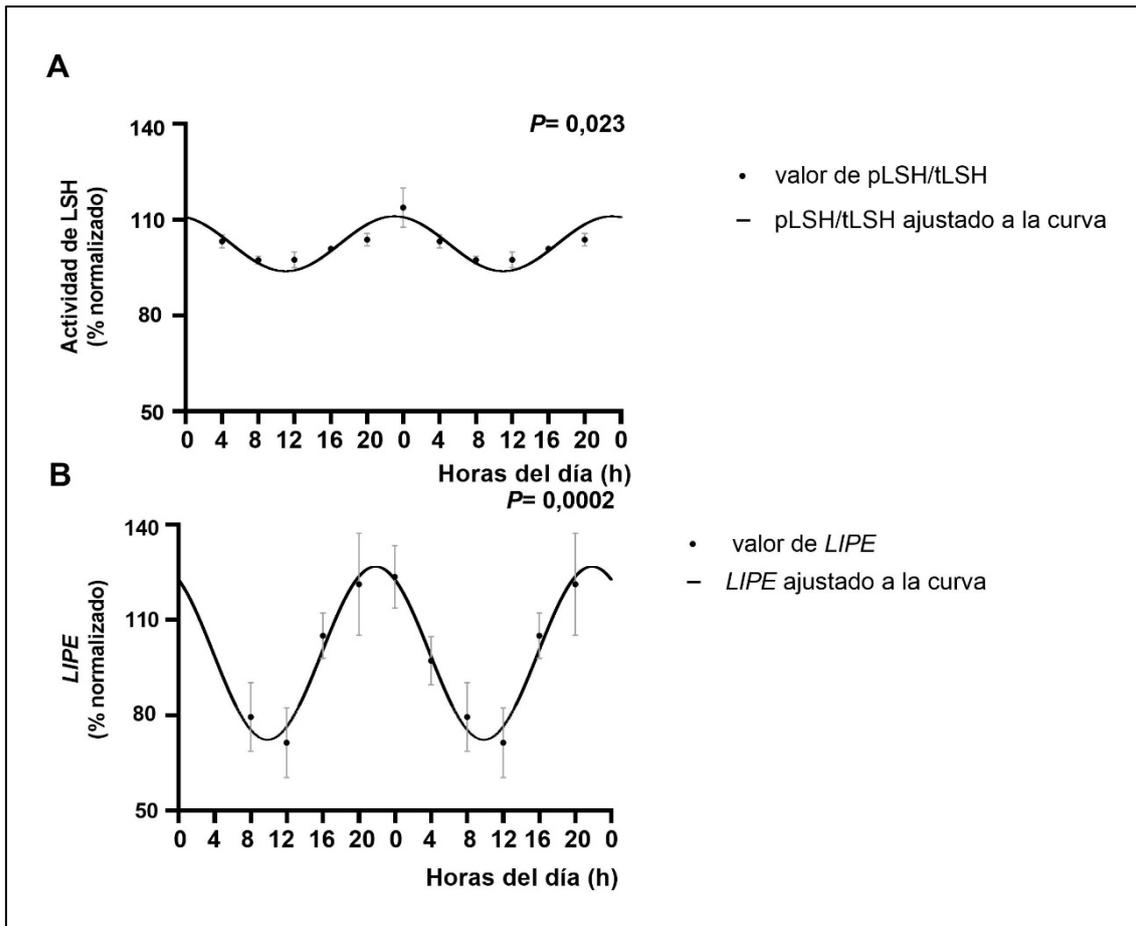


Figura 24. Actividad LSH y expresión de *LIPE* en tejido adiposo subcutáneo, ritmos circadianos. LSH (A) y *LIPE* (B), a lo largo del día, y su ajuste a una curva de coseno. Se recogieron muestras de explantes de TA humanos cada 4 h durante 24 h (las horas de muestreo fueron: 8 h (T0), 12 h (T4), 16 h (T8), 20 h (T12), 24 h (T16), 4 h (T20) horas del día).

Tal y como se menciona en la introducción, las enzimas que actúan en la cascada lipolítica son tres: ATLG, LSH y MGL. Y aunque pueda parecer que todas las lipasas cooperan a la par en el proceso de lipólisis, sabemos que, mucho antes de la activación de la PLIN1, las vías mediadas por PKA y PKG son capaces de activar la LSH, siendo esta la primera enzima de la cascada de lipólisis en actuar. A pesar de que la principal función de la LSH es la hidrólisis del DAG [55, 56], también se conoce que actúa de manera coordinada con ATGL para la hidrólisis del TG, así como la de otros lípidos, por ejemplo: MAG, esteres de colesterol, esteres carboxílicos de cadena corta; siendo la LSH, de entre todas las enzimas, la más versátil y de mayor relevancia en la degradación de lípidos en el tejido adiposo [217]. La LSH fue de las primeras enzimas en ser descubiertas y es desde entonces la que más se vincula al proceso de la lipólisis,

a pesar de que años después salieran a la luz el resto de las enzimas [57]. Además, hoy en día sabemos que es la proteína más importante en el proceso de lipólisis del TA [55, 56]. Previamente se ha demostrado que la fosforilación *ex vivo* de la LSH por la PKA recombinante puede aumentar la actividad de la enzima en un 100%. Por ese motivo, en este trabajo para determinar la actividad lipolítica del TA, se emplea la relación fosforilada/ total, pLSH-tLSH [218].

La acrofase de LIPE y LSH

Cuando analizamos los diferentes parámetros del ritmo, observamos que, aunque las características del ritmo son bastante similares entre la enzima LSH y su gen *LIPE*, la acrofase de *LIPE* se sitúa en la noche, pero ligeramente antes que la acrofase de la actividad de LSH (alrededor de las 22:00 h para *LIPE* vs. 23:30 h para la actividad de LSH). Es decir, que la expresión máxima del gen se produce 1 h y 30 minutos antes que la actividad de la LSH, entendemos que esta diferencia se debe al tiempo necesario para expresar el gen y realizar la traducción y activación de la proteína mediante fosforilación [244] (**Figura 25**).

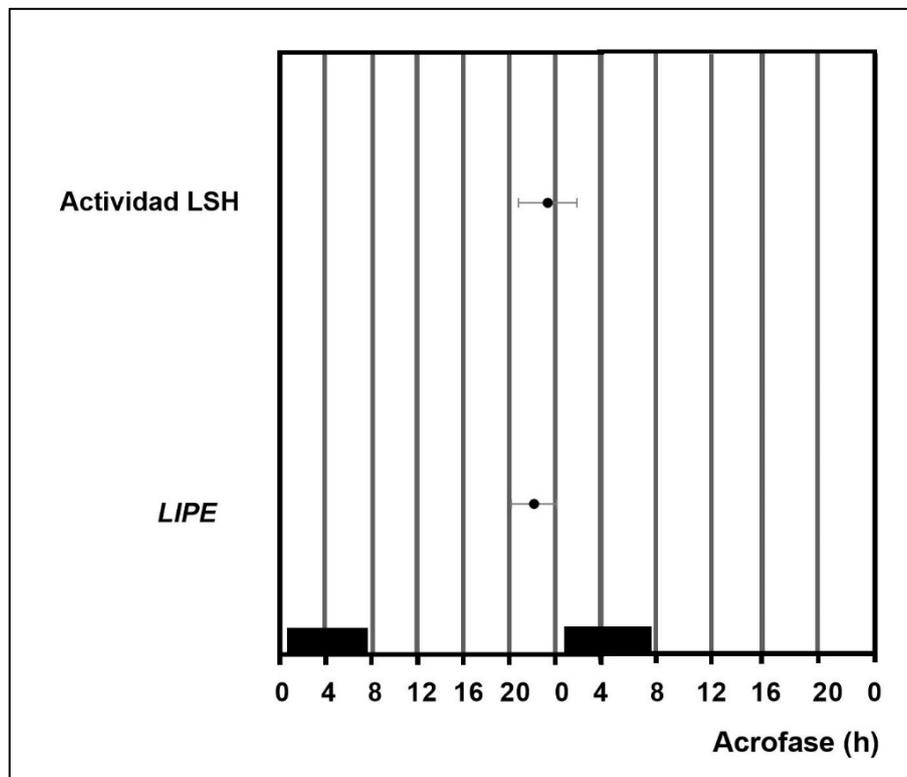


Figura 25. Mapa de fases obtenido a partir de análisis cosinor de la actividad de la LSH y la expresión del gen *LIPE* para la población total. Los valores se muestran como valores medios en puntos, y los límites superior e inferior (95% de confianza) en líneas continuas.

El hecho de que la máxima actividad de la LSH tenga lugar a medianoche sugiere que el reloj circadiano es capaz de predecir que, durante las horas siguientes, el individuo suele estar durmiendo, y que no es esperable la entrada de energía por alimentos. El aumento de la actividad de la LSH es necesario para proporcionar suficiente energía para resistir toda la noche. Estos resultados, obtenidos en cultivo de explantes de tejido adiposo humano, concuerdan con los obtenidos de un estudio previo realizado en participantes sometidos a microdiálisis en condiciones de vida libre y con comidas estandarizadas, en el que el aumento de la actividad lipolítica del TA también se produjo por la noche [219].

Las características del ritmo de la actividad circadiana de la LSH y de la expresión del gen que codifica esta enzima (i.e., el *LIPE*) tras el análisis cosinor se representan en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Parámetros del análisis cosinor.

	Mesor (AU)	Amplitud (cambio relativo)	Acrofase (hh:mm)	Porcentaje de ritmo (%)
LSH	1,19	0,16	23:32	28,88
<i>LIPE</i>	1,04	0,43	22:12	44,54

Mesor el valor medio del ritmo, Amplitud relativa es el porcentaje de los valores del mesor (Amplitud Relativa = (Amplitud/Mesor) x 100)), Acrofase es el momento de mayor expresión durante el ciclo diario y el Porcentaje de ritmicidad es el porcentaje de variabilidad. AU: Área bajo la curva.

Relación entre la lipasa sensible a hormona, gen LIPE con el horario de la comida y el ayuno

Durante el día existen varios factores que influyen en las concentraciones de ácidos grasos no esterificados (NEFA) circulantes, siendo uno de estos factores el horario de la comida. Mientras que por la noche el ayuno nocturno es el factor principal para modular la salida de los ácidos grasos del tejido adiposo a la circulación mediante la lipólisis del TA [219].

El ayuno hace referencia a cualquier periodo de abstención de alimentos, y suele aplicarse a un intervalo de tiempo superior a las 8 h normales de sueño

nocturno [220]. El ayuno nocturno de los participantes de este estudio varió entre aproximadamente 8 y 13 horas.

Relación del ayuno con la actividad de la LSH

Nuestros resultados en relación con el ayuno muestran una correlación positiva entre la actividad del ritmo de LSH y la duración del ayuno ($r= 0,57$; $P= 0,013$) (**Figura 26A**). Se observa que aquellos individuos que tienen una duración de ayuno nocturno superior a la media (11,20 horas) (media \pm EEM $11,95 \pm 0,73$), la amplitud del ritmo de actividad de la LSH era de aproximadamente del doble, que en aquellos que tienen un ayuno nocturno más corto, es decir inferior a la mediana (media \pm EEM $9,6 \pm 0,91$) horas ($P= 0,027$), de hecho, la actividad rítmica de la LSH en los individuos de ayuno largo fue un 91% mayor que en los de ayuno nocturno (**Figura 26B**).

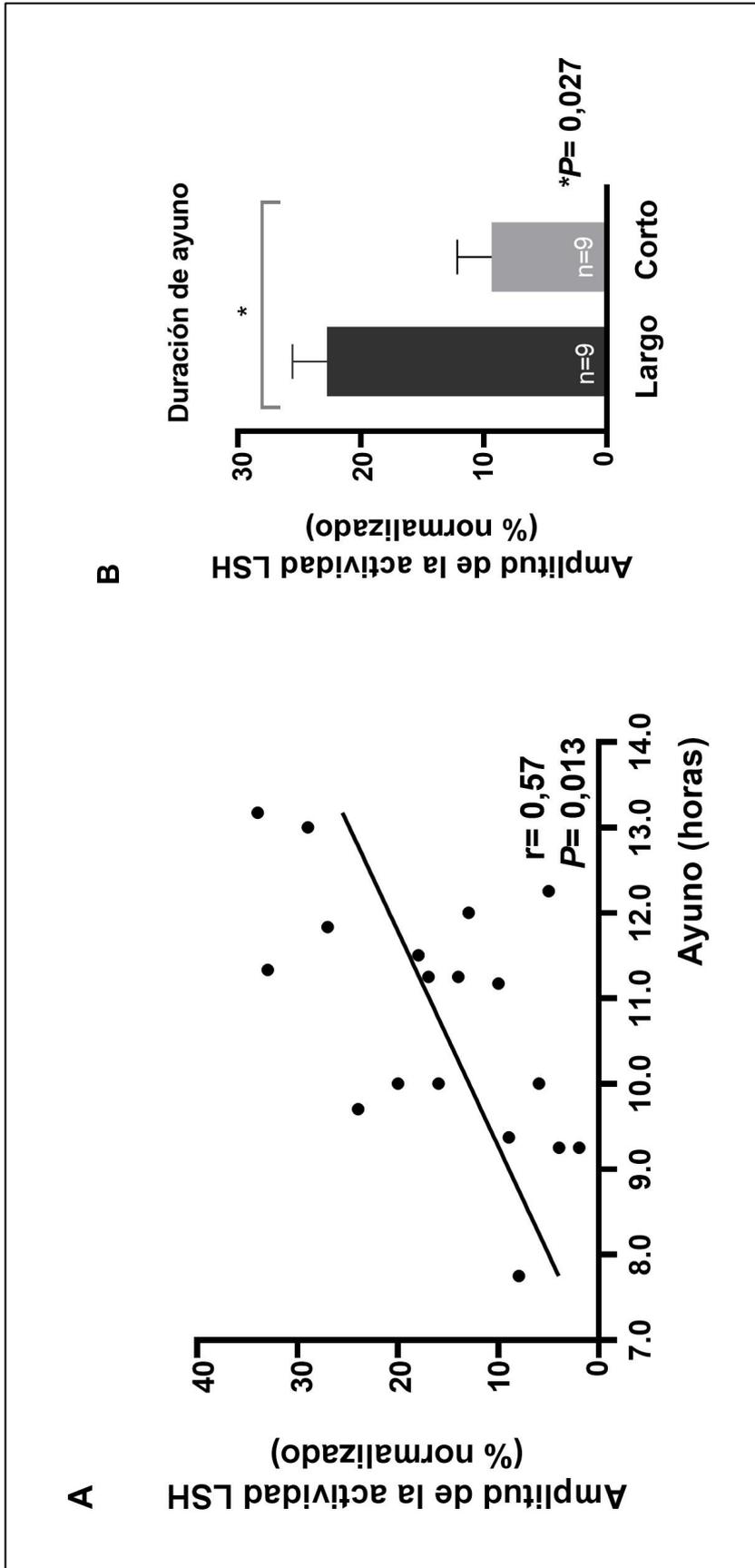


Figura 26 A-B. La figura 26A, muestra la correlación entre la duración del ayuno nocturno de todos los individuos y la amplitud de la actividad de LSH (n=18), y la figura 26B representa la relación entre la duración del ayuno nocturno y la amplitud de LSH, aconteciendo que a mayor duración de ayuno mayor amplitud en la actividad de LSH y por tanto menor en aquellos que ayunan menos horas. * $P < 0.05$ (n=9).

Estos resultados apuntan a que una prolongación del ayuno nocturno aumentaría la amplitud de la actividad de la LSH, lo que sugiere una mayor movilización de grasas del TA [221], tal y como lo corroboran estudios anteriores realizados en modelos animales, en los que la actividad de la LSH aumenta en respuesta al ayuno a través de la actividad de varias hormonas lipolíticas propias del ayuno, como las catecolaminas, el glucagón y la ACTH [222, 223].

En humanos, Wilkinson *et al* [224], observaron reducciones significativas del peso corporal cuando los voluntarios tenían una duración de ayuno nocturno de 14 horas. Mientras que nuestros resultados muestran que los participantes con una media de duración de ayuno de aproximadamente 12 horas (ayuno largo), tuvieron el doble de amplitud en la actividad de la LSH en TA, en comparación con aquellos que tienen una media de duración de ayuno de aproximadamente 9 horas (ayuno corto). En parte esto podría explicar el motivo de la movilización de grasa corporal según las horas de ayuno nocturno.

Relación de la cena con la amplitud y porcentaje de ritmo de la LSH

Estudios previos en modelos animales sugieren que el reloj circadiano dentro del adipocito puede desempeñar un papel importante en la movilización y acumulación de grasa corporal [246]. Como era de esperar, nuestros resultados, después de ajustar por tamaño de adipocitos y masa grasa corporal del individuo, muestran que la hora de la cena se correlaciona negativamente con la amplitud de LSH, es decir, a mayor retraso en la hora de la cena, menor amplitud en la actividad de LSH ($r = -0,760$; $P = 0,047$) (**Figura 26C**). Además, al clasificar la población según la mediana (21:52 h) en cenadores tempranos (aquellos que cenaban antes de las 21:52 h) y cenadores tardíos (aquellos que cenaban después de las 21:52 h), se observa que los que cenan temprano, poseen un 60% más de amplitud que aquellos que se consideran cenadores tardíos ($0,24 \pm 0,02$ vs. $0,15 \pm 0,02$ ($P = 0,035$)) (**Figura 26D**).

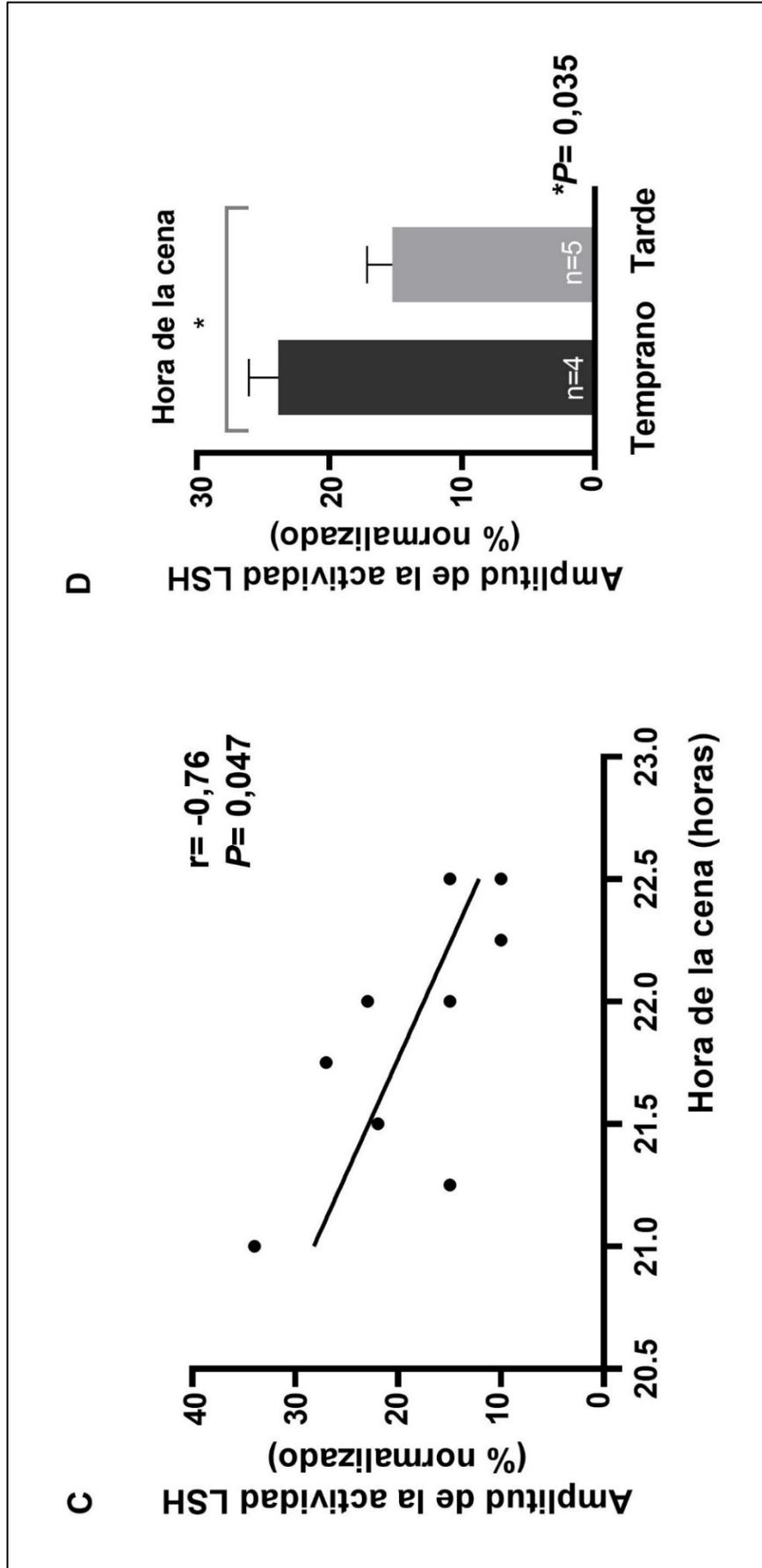


Figura 26 C-D. La figura 26C, muestra la correlación entre la hora de la cena y la amplitud de la actividad de LSH (n=9) después de haber sido ajustado por tamaño de adipocito y porcentaje de grasa corporal. La figura 26D representa cómo los cenadores tardíos tienen menor amplitud de LSH, que aquellos que tienen un horario de cena más temprana. * $P < 0.05$ (n=9).

En definitiva, el hecho de que los participantes con un ayuno nocturno prolongado muestren un aumento de casi el doble de amplitud (1,9 veces) respecto a los que tienen una duración de ayuno más corto; mientras que los que cenan temprano tienen una amplitud 1,6 veces mayor que los que cenan tarde, esto nos da a entender que las horas de ayuno juegan un papel importante sobre la actividad de la LSH para la movilización de grasa. El momento de mayor actividad de la LSH, se produce cuando la sensibilidad a la acción de la insulina es menor, tal y como se demostró en un experimento anterior realizado por nuestro equipo [115], lo que era predecible teniendo en cuenta que la función metabólica LSH, es opuesta a la de la insulina, ya que la función de la LSH es movilizar la grasa corporal, mientras que una de las acciones de la insulina es acumular grasa [51].

En cuanto al **porcentaje de ritmicidad** de la actividad de LSH, definido como el porcentaje de la varianza de los datos originales que es explicado por el modelo coseno, se asoció de forma negativa con el momento de la cena ($r = -0,72$; $P = 0,028$) (**Figura 26E**), es decir, a medida que se retrasa la cena, menor porcentaje de ritmicidad de la LSH. Por otro lado, vemos una tendencia positiva entre la duración del ayuno nocturno y el porcentaje de ritmicidad ($r = 0,66$; $P = 0,051$) (**Figura 26F**), es decir, con el aumento de la duración del ayuno nocturno la ritmicidad de la actividad de LSH es mayor. Por otra parte, no encontramos asociaciones significativas entre la acrofase del ritmo de la LSH ni la duración de ayuno nocturno o con la hora de las comidas.

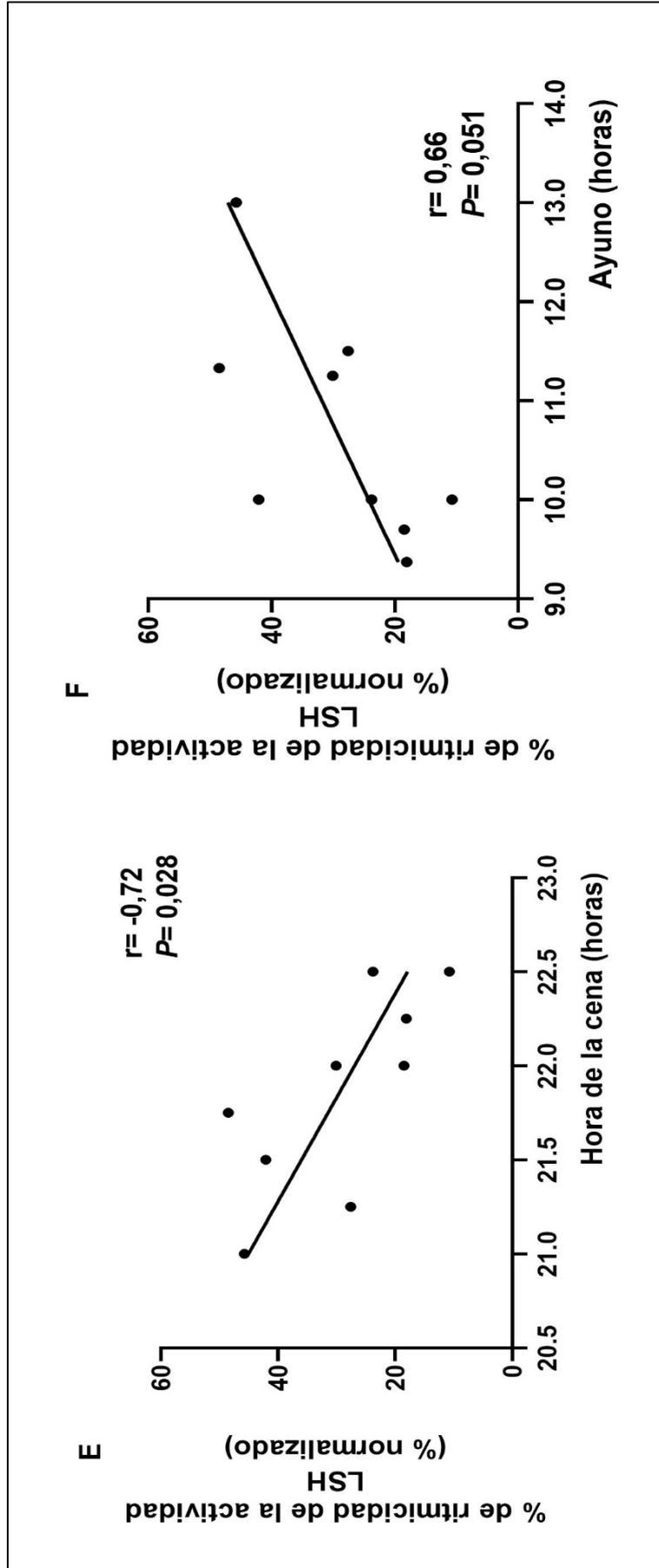


Figura 26 E-F: Correlación entre el porcentaje de ritmicidad de la actividad de la LSH con el horario de la cena y la duración del ayuno (horas) $P < 0,05$ ($n=9$).

Relación entre el tamaño de adipocitos y la actividad de LSH

Por otra parte, en nuestro estudio se observa que el tamaño de adipocitos se asocia positivamente con las concentraciones totales de LSH ($r= 0,75$; $P= 0,034$), así como con la amplitud de dicha proteína ($r= 0,76$; $P= 0,030$). Es decir, a mayor tamaño de la célula adiposa más amplitud y actividad de la LSH (**Figura 26 G-H**).

Estos resultados vendrían respaldados por datos anteriores en humanos, en los cuales se mostraba una mayor actividad lipolítica en los adipocitos grandes, probablemente debido al enriquecimiento de la LSH, y otras enzimas lipolíticas [39]. También se ve apoyado por estudios anteriores en ratones, donde se asocia el tamaño de los adipocitos con una mayor movilización de lípidos [220, 221].

Por otra parte, estudios previos han asociado la ingesta de alimentos tardía en la noche con un mayor riesgo de obesidad [225], dislipemia [226, 227], hiperglucemia [228, 229] y síndrome metabólico [230, 231].

Como se ha podido observar en varios estudios, la anomalía en el proceso de lipólisis puede resultar en múltiples patologías como son: la obesidad, el hígado graso y la diabetes, entre otros [232]. Por ese motivo una adecuada expresión del gen *LIPE* es fundamental, puesto que este gen es el encargado de codificar la enzima clave que lleva el proceso de movilización de grasas [52, 217].

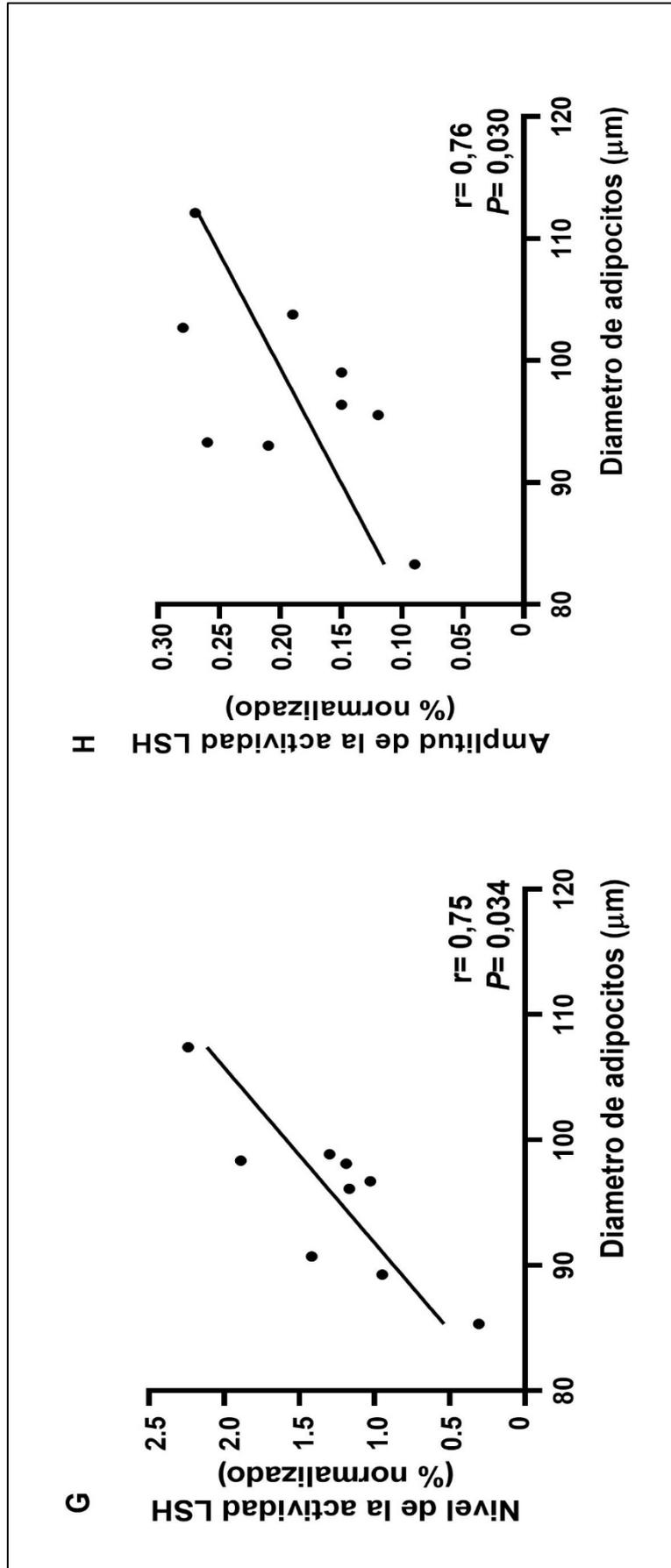


Figura 26 G-H: La figura 26 G-H, muestran la correlación entre el tamaño de adipocito (μm) con el nivel total de la actividad de LSH (24 horas) y con la amplitud de la actividad de la LSH, después de haber sido ajustado por porcentaje de grasa corporal. $P < 0.05$ ($n=9$).

Relación entre la amplitud de LIPE y la hora de la comida

Por otro lado, con respecto al gen *LIPE*, vemos que la amplitud de su ritmo de expresión se relaciona negativamente con el momento de la comida del medio día ($r = -0,83$; $P = 0,020$) (**Figura 26I**), es decir, cuanto más tarde es la hora de la comida, menor amplitud hay en la expresión del gen. Consideramos comedores tardíos a aquellos que presentaban la comida principal del mediodía a partir de las 14:40 h, y se observa en la **Figura 26J**, que aquellos que comían más tarde presentaron una tendencia a menor amplitud de *LIPE* en comparación con lo que comían más temprano ($P = 0,072$).

El hecho de que en nuestros resultados se observe que retrasar la comida disminuye la amplitud del gen *LIPE* pondría dar explicación a muchos estudios anteriores. Concretamente, en estudios de casos y controles, los participantes que comen más tarde (después de las 15:00 h) tienen más dificultades para perder peso que los que comen más temprano (antes de las 15:00) [145] o con la cirugía bariátrica [233]. Esto podría deberse a esa disminución de la expresión del gen *LIPE*, producida por la hora de la comida que reflejan los resultados. Y esto a su vez podría afectar directamente a la producción y actividad de la LSH [221].

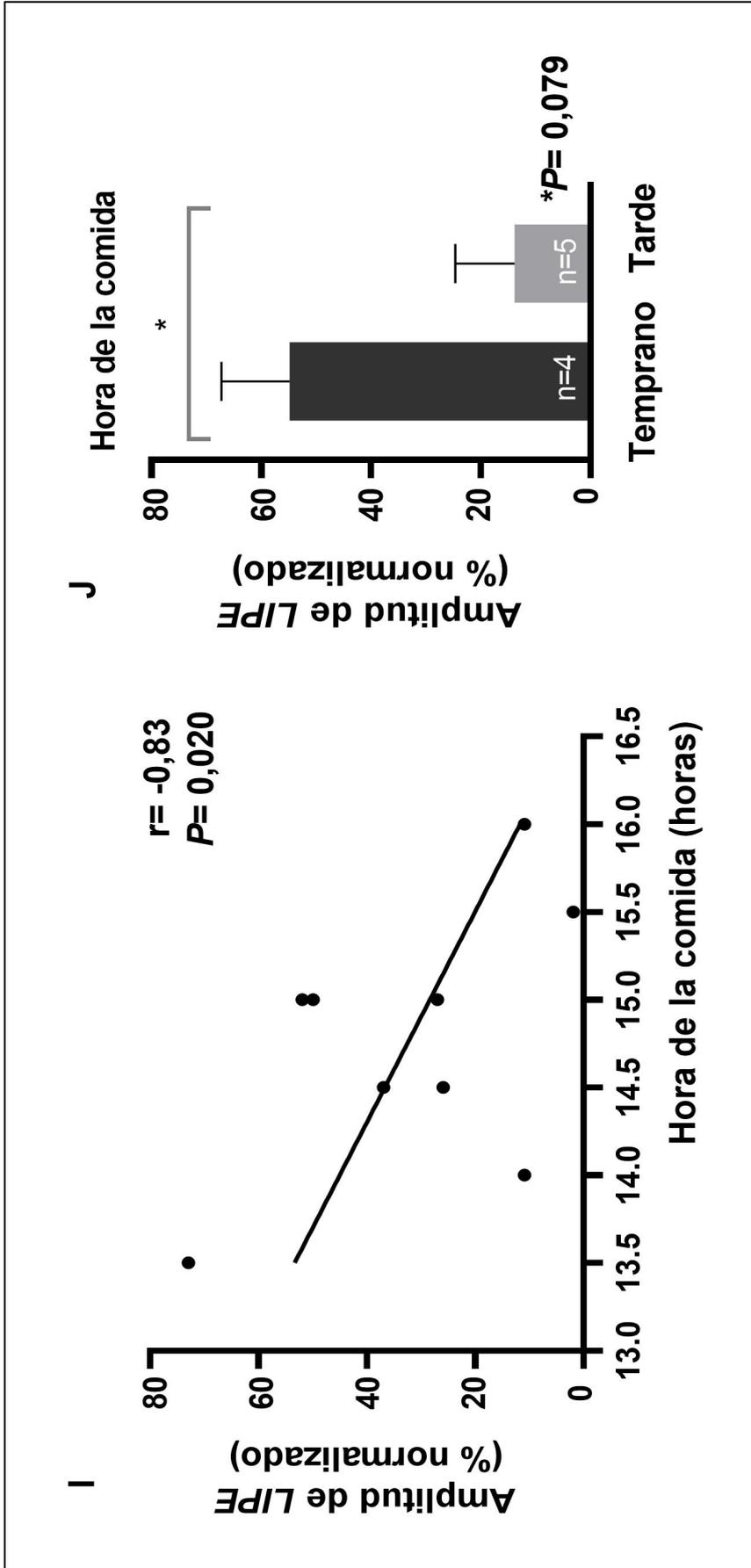


Figura 26 I-J: La figura 26I, muestra la correlación negativa entre la hora de la comida y la amplitud de LIPF ($n=9$) después de haber sido ajustado por tamaño de adipocito y porcentaje de grasa corporal. La figura 26J representa cómo los comedores tardíos tienen menor amplitud de LIPF, que aquellos que tienen un horario de comida más temprana. $*P < 0,05$ ($n=9$).

Resultados y discusión en relación con el objetivo 1A:

Podemos concluir que *LIPE* y la LSH mantienen ritmos circadianos robustos y que estos ritmos son capaces de mantenerse fuera del cuerpo, sin la influencia del reloj central, lo que indica que son ritmos endógenos propios del tejido adiposo, y por tanto se demuestra que dependen del reloj periférico existente en este tejido.

Es importante resaltar que el horario de la cena y la presencia de un ayuno nocturno prolongado está directamente relacionado con la actividad de la enzima LSH y por tanto con la capacidad de movilizar más o menos grasa del tejido adiposo. La hora de la comida está relacionada con la amplitud del ritmo de expresión del gen *LIPE*, y se muestra una menor amplitud del ritmo de expresión del gen cuanto más se retrasa la hora de la comida. Por otro lado, el diámetro de los adipocitos se asocia con la actividad y amplitud de la LSH, hacia una mayor amplitud cuanto mayor es el diámetro del adipocito.

Este trabajo nos ayuda a entender las relaciones entre el momento de la comida, la duración del ayuno y la regulación de la grasa y el peso corporal.

Es necesario continuar investigando en mayor profundidad los mecanismos de genes y proteínas implicados en la acción lipolíticas en mayor número de participantes e individuos sanos, sin obesidad para ver cómo afectan los horarios de las comidas.

Estos resultados apoyan la importancia del horario de comida como herramienta para la regulación de la grasa y peso corporal.

**RESULTADO Y DISCUSIÓN DEL OBJETIVO 1B. LA
SIESTA Y *LIPE*: SIESTA Y RITMOS CIRCADIANOS DEL
TEJIDO ADIPOSO.**

Los seres humanos suelen experimentar el sueño nocturno de forma cíclica una vez al día, debido a un control circadiano estrictamente regulado [234]. Hasta ahora muchos estudios habían analizado los efectos de la duración del sueño nocturno y su incidencia en la obesidad, quedando patente que un sueño nocturno inferior a 5 horas se asocia significativamente con el aumento de peso y la obesidad [235-237]; pero hasta ahora no se había investigado si la siesta se asociaba o no con un aumento de peso corporal.

La siesta es una práctica extendida en todo el mundo y es considerada como un hábito saludable [238], pero está siendo cuestionada poco a poco por la comunidad científica. Nuestros estudios recientes muestran que mientras la siesta corta puede ser beneficiosa frente a la hipertensión, y no afectar a la obesidad, una siesta de duración larga (más de 30 minutos) se asocia con un aumento del grado de obesidad de los sujetos estudiados [239].

Características de la población

Para contestar a esta pregunta hemos realizado un estudio de ritmos circadiano en tejido adiposo de LSH y de su gen *LIPE*, en una población de n=17 sujetos. Los individuos se agruparon en dos grupos, uno que incluía aquellos individuos que habitualmente dormían una siesta larga y los que no dormían siesta nunca. Para mayor seguridad de los resultados, la población fue escogida con unas características similares, en todos aquellos factores que pudieran influir en la actividad lipolítica como eran edad, grado de obesidad y rasgos de síndrome metabólico que fueron similares en los dos grupos (**Tabla 9.1 y 9.2**).

Todos los individuos de este estudio dormían la siesta después de comer, a partir de las 15:00 h (15:37 h de media), la duración de la siesta osciló entre 30 y 120 min (2 h) con una duración media de $1,18 \pm 0,70$ h, (siesta larga, > 30 min). Dentro del grupo que dormía siesta habitualmente. No se observaron diferencias significativas en el momento, la duración y el número de despertares nocturnos del sueño nocturno entre los que dormían la siesta de manera habitual y los que no la dormían. El horario de las comidas también fue similar entre ambos grupos (Tabla 9.2).

Tabla 9.1 Características generales y rasgos metabólicos de los participantes en aquellos que duermen la siesta y los que no la duermen.

	Siesta (n=8)		No-siesta (n=9)		Prueba T de Student
	Media	DS	Media	DS	#p-valor
Género (mujeres %)	50		44,4		0,601
Edad (años)	49,38	11,09	41,33	11,01	0,155
IMC (kg/m ²)	39,12	7,26	43,66	4,30	0,071
Grasa corporal total (%)	39,63	9,89	42,50	8,12	0,536
Rasgos del síndrome metabólico					
Circunferencia de cintura (cm)	120,71	11,54	134,17	14,97	0,058
ICC	0,97	0,11	0,99	0,11	0,780
*Glucosa (nmol/L)	7,16	2,33	5,90	1,28	0,180
*Triglicéridos (nmol/L)	1,63	1,1	1,3	0,44	0,458
*HDL-c (nmol/L)	1,37	0,50	1,23	0,37	0,553
*Presión diastólica (mmHg)	83,6	7,78	82,22	4,26	0,435
*Presión sistólica (mmHg)	137,7	11,19	137,33	18,97	0,958
Puntuación SMet	3,37	1,50	2,87	1,35	0,497
ICC: índice cintura cadera; SMet: síndrome metabólico; *Condiciones de ayuno.					

En la Tabla 9.1, se representan las características generales de la población estudiada en este objetivo, que consta de 17 sujetos que pertenecen al grupo de obesidad grado 2 y 3, ya que presentan un IMC superior a 39 kg/m². La relación cintura-cadera, las concentraciones séricas de glucosa, los valores de triglicéridos y de tensión arterial sistólica se encuentran por encima de los rangos normales según la Federación Internacional de Diabetes (FID) en ambos grupos [215].

Tabla 9.2 Características habituales de sueño y comidas en aquellos que duermen la siesta y los que no la duermen.

	Siesta (n=8)		No-siesta (n=9)		Prueba T de Student
	Media	DS	Media	DS	#p-valor
Características de siesta					
Inicio de siesta (hh:mm)	15:37	0:30	-	-	-
Final de siesta (hh:mm)	16:52	1:07	-	-	-
Frecuencia de siesta (veces por semana)	4.38	2.32	-	-	-
Duración de siesta (h)	1,18	0,70	-	-	-
Características de sueño nocturno					
Inicio de sueño (hh:mm)	0:27	1:24	0:30	0:50	0,878
Final de sueño (hh:mm)	07:35	0:59	7:58	0:58	0,445
Duración de sueño (h)	7,12	1,56	7,41	1,25	0,676
Número de despertares nocturnos/por noche	0,88	1,12	0,11	0,33	0,070
Horarios de comida					
Inicio de desayuno (hh:mm)	8:34	0:39	9:14	1:13	0,198
Inicio de comida (hh:mm)	14:48	0:42	14:34	0:31	0,468
Inicio de cena (hh:mm)	21:42	0:41	21:41	0:59	0,955
Duración de ayuno nocturno (h)	10,46	1,01	11,23	1,71	0,283
hh:mm; horas y minutos; h: horas					

Existencia de ritmo circadiano

En vista de que somos los primeros en demostrar en TA la existencia de ritmos circadianos del gen *LIPE*, y la actividad de la LSH y su relación con los hábitos de ingesta y ayuno, como vimos en el objetivo 1A; este trabajo de tesis doctoral pretende resaltar también la importancia del hábito de siesta, y su implicación en la movilización de lípidos mediante el estudio del *LIPE* y de la LSH.

Existencia de ritmo circadiano robusto en *LIPE*

Nuestros resultados muestran que los explantes de TA procedentes del depósito graso subcutáneo (TAS) obtenidos de pacientes sometidos a cirugía, exhiben ritmos circadianos robustos en el gen *LIPE*, concretamente en la **Figura 27A** se representan los análisis poblacionales globales en ambos subgrupos, para la población de siesta y para la población de no-siesta. De manera general,

encontramos que los explantes de tejido adiposo para la subpoblación que no dormía siesta presenta un ritmo robusto para la expresión de *LIPE* ($P= 0,00009$), mientras que la población que dormía siesta habitualmente no presenta ritmo circadiano significativo, estando el ritmo mucho más aplanado ($P= 0,360$).

Muchos estudios anteriores asocian la siesta a un mayor riesgo cardiovascular [240], aumento de triglicéridos [241], hipertensión [242] o desarrollo de diabetes tipo II [243]. Pero al mismo tiempo también se le ha atribuido un carácter protector contra la obesidad y el desarrollo de SMet [244, 245].

Hasta el momento no existen trabajos que hayan estudiado directamente la lipólisis en explantes *ex vivos* de TA, y mucho menos que lo relacionen con los ritmos circadianos del gen *LIPE* y la enzima LSH. Lo que hace de este estudio algo único, pero también sin bibliografía previa con el cual comparar.

Nuestros resultados muestran que no dormir la siesta produce un ritmo robusto para la expresión de *LIPE*, mientras que el dormir la siesta aplanan el ritmo. Como ya se ha comentado previamente, *LIPE* es el gen encargado de poner en marcha la movilización de grasas mediante activación de varias proteínas, entre ellas la lipasa sensible a hormona [52].

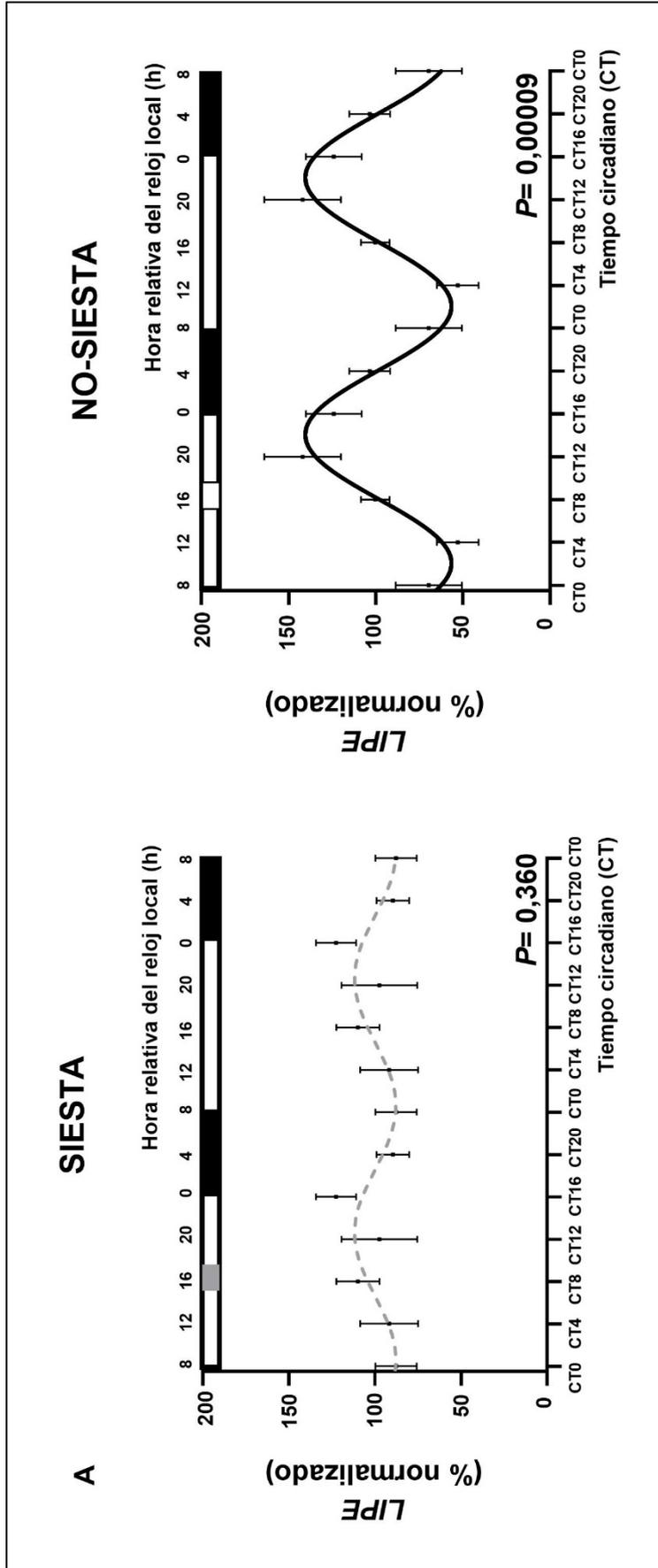


Figura 27A. Representa la expresión de *LIPE* en explantes de tejido adiposo abdominal subcutáneo en participantes con obesidad grave según su hábito de dormir la siesta ($n=8$; $P=0,360$) o no dormir la siesta. ($n=9$; $P=0,00009$). Los análisis globales de la población en ambos subgrupos se representan mediante una curva sinusoidal de forma de onda negra si hay un ritmo coseno significativo (en los que no duermen la siesta) y mediante una línea discontinua gris cuando no es significativo (en los que duermen la siesta). Los datos (%normalizados) se representan mediante puntos negros y el error estándar de las medias como líneas verticales. Los ejes X están representados tanto en tiempo de reloj local relativo (h; ejes X superiores) como en tiempo circadiano (CT; relativo al tiempo medio habitual de vigilia y al cambio de medio *ex vivo*; ejes X inferiores). En el eje X superior, el tiempo de sueño se representa mediante un rectángulo negro y el tiempo de siesta mediante un rectángulo gris en los individuos que duermen la siesta y un cuadrado blanco en los que no duermen la siesta.

Así mismo, podemos apreciar el ritmo de expresión de *LIPE* de manera individual dentro de cada subgrupo (**Figura 27B**). Y observamos, que entre los que no duermen siesta, cinco de nueve individuos muestran un ritmo significativo en la expresión de *LIPE*, mientras que entre los que sí duermen siestas, solo un individuo (de ocho) muestra un ritmo significativo.

En el conjunto de individuos que duermen habitualmente siesta, el aplanamiento de la amplitud del ritmo circadiano de *LIPE* es de un 71% en comparación con los que no la duermen. Curiosamente, se muestra como la disminución de la amplitud en los que duermen la siesta se relaciona con la frecuencia de la siesta, es decir, cuantas más veces dormían la siesta, menor es la amplitud del ritmo de *LIPE* (estos datos se tratan con más detalle más adelante, en el apartado “Relación entre los parámetros de ritmo y los hábitos de vida y las características de la población” de la página 133). El hecho de que la expresión de *LIPE* se relaciona con cantidad de enzima LSH; y que la actividad de este enzima (y su ritmo) se asocia con una mayor movilización de grasa sugiere que la siesta podría inducir la acumulación de grasa abdominal mediante la alteración del ritmo circadiano de la expresión del gen *LIPE* (aplanamiento de su ritmo). Estudios anteriores han demostrado que la alteración de *LIPE* está relacionada con una menor movilización de lípidos en el tejido adiposo [246].

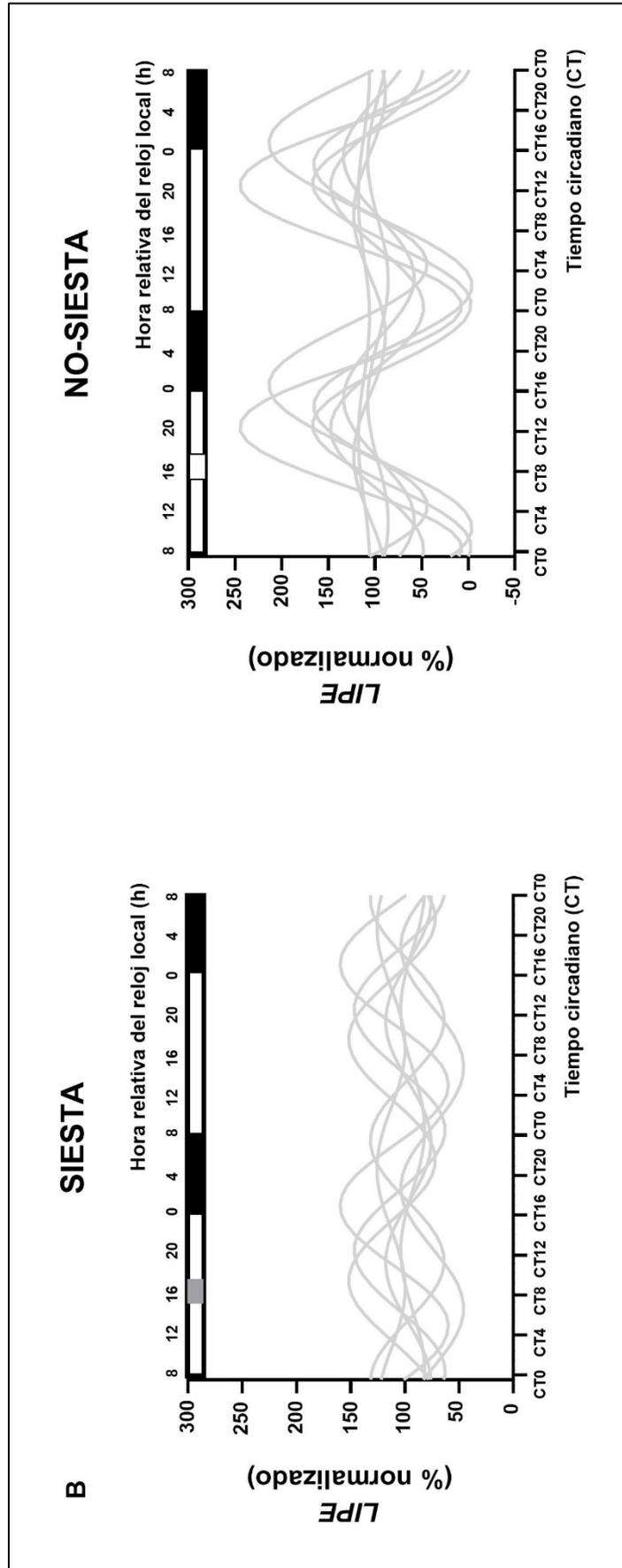


Figura 27B. Representa la expresión de *L/PE* en explantes de tejido adiposo abdominal subcutáneo en participantes con obesidad grave según su hábito de dormir la siesta ($n=8$) o no dormir la siesta. ($n=9$). En estos paneles mostramos la forma de onda de cada individuo. Los ejes X están representados tanto en tiempo de reloj local relativo (h; ejes X superiores) como en tiempo circadiano (CT; relativo al tiempo medio habitual de vigilia y al cambio de medio *ex vivo*; ejes X inferiores). En el eje X superior, el tiempo de sueño se representa mediante un rectángulo negro y el tiempo de siesta mediante un rectángulo gris en los individuos que duermen la siesta y un cuadrado blanco en los que no duermen la siesta.

Características de los parámetros de los ritmos circadianos de 24 h de LIPE

Las características de los ritmos circadianos de la expresión de *LIPE* y el diámetro de adipocitos, y las diferencias existentes en los dos grupos de individuos estudiados (los que duermen siesta y los que no la duermen), se representan en la **Tabla 10**. Nuestros resultados mostraron diferencias significativas en la amplitud, la acrofase y el porcentaje de ritmo entre aquellos que duermen habitualmente siesta y los que no la duermen. Es decir, la amplitud se reduce aproximadamente un 71 % en los que duermen siesta con respecto a los que no duermen la siesta ($P= 0,035$). La acrofase (i.e., la hora de máxima expresión del gen *LIPE*), se retrasa de forma significativa en los que duermen siesta, siendo a las 23:06 h, respecto a los que no duermen la siesta 21:25 h, es decir hay una diferencia de aproximadamente 2 horas entre un grupo y otro ($P= 0,018$) y, además, en aquellos que dormían la siesta de manera habitual, su porcentaje del ritmo disminuyó en un 86% en comparación con los que no dormían la siesta ($P= 0,038$). Por el contrario, la expresión media de 24 h de *LIPE* fue similar entre ambos grupos ($P= 0,616$) (tras ajustar por sexo, edad y duración del sueño nocturno). En cuanto al diámetro de los adipocitos, no se observan diferencias significativas entre los que duermen y los que no duermen la siesta ($P= 0,792$).

Tabla 10. Características de los ritmos circadianos de 24 h de expresión de *LIPE* y tejido adiposo en subgrupo siesta y no siesta.

	Siesta (n=8)		No-Siesta (n=9)		ANCOVA	ANCOVA
	Media	DS	Media	DS	p-valor*	p-valor**
Características del ritmo						
Expresión de <i>LIPE</i>						
Media (Cambio relativo)	13,04	1,52	12,50	1,55	0,691	0,616
Amplitud (% normalizado)	30	14	55	40	0,062	0,035
Acrofase (hh:mm)	23:06	5:12	21:25	2:12	0,053	0,018
Porcentaje de ritmicidad	35,18	20,71	52,86	33,19	0,159	0,038
Tejido Adiposo						
Diámetro de adipocito (µm)	96,43	7,1	98,80	10,77	0,537	0,792
µm, micrómetros; *Ajustado por sexo, edad; **Ajustado por sexo, edad y duración del sueño nocturno.						

Cabe destacar que en la población total se observa que la acrofase del ritmo de *LIPE* se produce sobre las 22:12 horas y la acrofase de la LSH sobre las 23:41 horas. Estos resultados concuerdan con estudios previos en la que la actividad de la lipólisis era mayor durante la noche, que es cuando las personas suelen dormir y ayunar [219].

Cuando hablamos de la acrofase en aquellos que no duermen siesta, la máxima expresión de *LIPE* ocurre sobre las 20:00 horas, coincidiendo con el punto temporal CT12 como podemos observar en la (Figura 27). Por el contrario, los que duermen la siesta, su acrofase se retrasa aproximadamente 2 horas más tarde, estando más cerca del punto temporal CT16. Estos datos dan entender que la siesta es capaz de retrasar el punto de máxima de actividad de lipólisis.

Es posible que la disminución de la expresión de *LIPE* con la siesta se deba a que los individuos se encuentran durmiendo, ya que se asemeja a la disminución de la expresión de *LIPE* que se produce por la noche, cuando el individuo duerme (resultado del anterior objetivo). Y es que una regulación circadiana óptima de la expresión de *LIPE*, con una amplitud elevada y la acrofase al inicio del ayuno nocturno, está asociada con una distribución y

movilización adecuada de grasa del tejido adiposo, teniendo en cuenta que la actividad máxima de la LSH sigue 1,5 horas después de *LIPE* [247].

Existencia de ritmo circadiano robusto en la LSH

Como análisis exploratorio, vemos que la LSH presenta ritmicidad para el subgrupo que no duerme siesta ($P= 0,020$), mientras que en el subgrupo que duerme siesta pierde la ritmicidad ($P= 0,112$) (**Figura 28**). Esta enzima está codificada por el gen *LIPE* [55], y además es clave en la función reguladora de la lipólisis en los adipocitos [52, 217]. Los resultados de este objetivo confirman la presencia de ritmicidad al analizar la LSH, a pesar de que no se conozcan con exactitud los mecanismos biológicos que podrían vincular la siesta con la obesidad abdominal. Aun así, varias son las razones que podrían dar una explicación a la relación entre la siesta, la obesidad abdominal y el síndrome metabólico [248].

Una de las razones que podrían explicar la relación entre la siesta y aumento de obesidad, podría ser la activación del sistema nervioso simpático (SNS) que se ha asociado a la obesidad [249] y también la alteración de los ritmos circadianos [77]. Se sabe que el reloj biológico desempeña un papel fundamental en la regulación del sueño y el peso corporal [197, 250] y precisamente la desregulación de estos ritmos se ha asociado al desarrollo de síndrome metabólico [77]. Es importante recalcar que biológicamente estamos diseñados para dormir por la noche [251], por lo que podríamos considerar que una siesta diurna estaría actuando como disruptor circadiano. Una de las hormonas relacionada con la obesidad abdominal es el cortisol [201], hormona circadiana por excelencia, que se eleva tras el despertar nocturno. Hay estudios previos que han observado que la siesta diurna es capaz de elevar las concentraciones de cortisol, lo que podría explicar en parte la relación entre la siesta, las alteraciones circadianas y la obesidad [199, 202, 252]. Y si bien la obesidad se ha relacionado con la alteración de los ritmos circadianos de los genes involucrados en la lipólisis y lipogénesis [253, 254], no se ha revisado el papel de la siesta sobre el comportamiento de los genes precursores de la lipólisis.

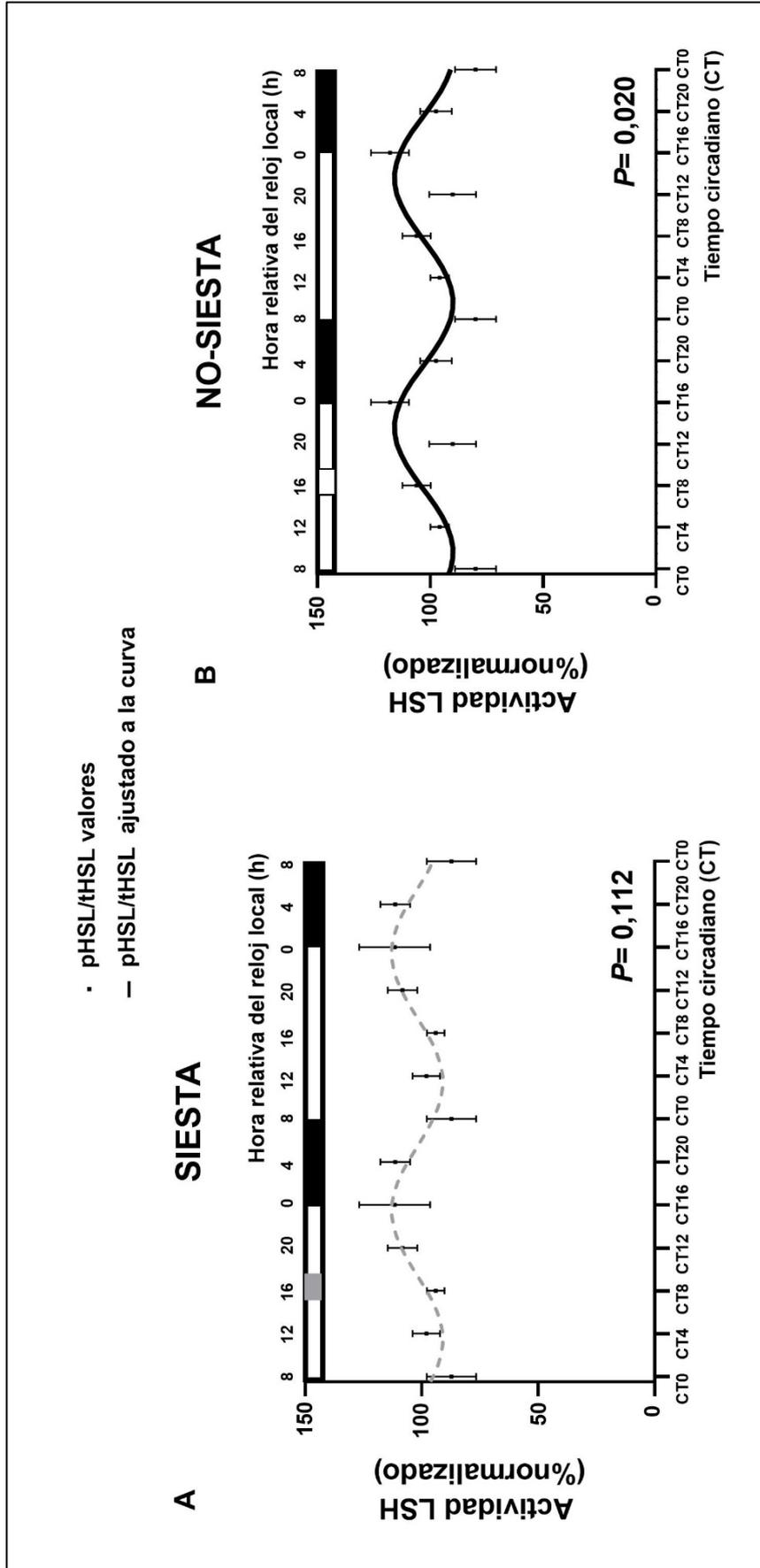


Figura 28 A-B. Ritmo de expresión de la actividad LSH en explantes de tejido adiposo subcutáneo en participantes con obesidad grave según su hábito de dormir la siesta ($n=8$; $P= 0,112$) o no dormir la siesta ($n=9$; $P= 0,020$). Los análisis globales de la población en ambos grupos se representan en los que no duermen la siesta como una curva sinusoidal de forma de onda negra (B) y en los que duermen la siesta como líneas discontinuas grises (A). Los datos (%normalizados) se representan mediante puntos negros y el error estándar de las medias como líneas verticales. Los ejes X se representan tanto en tiempo de reloj local relativo (h; ejes X superiores) como en tiempo circadiano (CT; relativo al tiempo medio habitual de vigilia y al cambio de medio ex vivo; ejes X inferiores). En los ejes X superiores, el tiempo de sueño se representa mediante un rectángulo negro, y el tiempo de siesta mediante un rectángulo gris en los que duermen la siesta y un rectángulo blanco en los que no duermen la siesta.

Características de los parámetros de los ritmos circadianos de LSH

En cuanto a las características del ritmo de la actividad de la LSH, observamos una tendencia hacia un retraso de la acrofase en aquellos que duermen siesta ($P= 0,056$), respecto a los que no la duermen, tras ajustar por sexo, edad y duración del sueño nocturno. En relación con la expresión media de 24 h de LSH, la amplitud y el porcentaje del ritmo de la actividad circadiana de LSH, estas características fueron similares entre ambos grupos (siesta y no siesta) (**Tabla 11**).

Tabla 11. Características de los ritmos circadianos de 24 h de expresión de LSH y tejido adiposo en subgrupo siesta y no siesta.

	Siesta (n=8)		No-Siesta (n=9)		ANCOVA	ANCOVA
	Media	DS	Media	DS	p-valor*	p-valor**
Características del ritmo Expresión de LSH						
Media (Cambio relativo)	0,79	0,55	0,75	0,30	0,895	0,841
Amplitud (% normalizado)	0,16	0,13	0,20	0,10	0,555	0,564
Acrofase (hh:mm)	00:49	5:04	19:41	4:09	0,100	0,056
Porcentaje de ritmicidad	30,26	26,29	46,35	25,68	0,211	0,170
	Significancia		Significancia			
Ritmicidad Circadiana (<i>P</i> valor)	0,112		0,020			
% normalizado, proceso de ajustar los datos para expresar la amplitud de los ritmos de manera estandarizada.						

Tal y como se representa en la Tabla 11, al igual que sucedía en la expresión circadiana del gen *L1PE*, en el ritmo circadiano de la actividad de la LSH, podemos observar un retraso de la acrofase en aquellos que duermen siesta habitualmente (00:49 h) en comparación con los que no la duermen con asiduidad (19:41 h), habiendo una diferencia aproximada de 4 horas. Sin embargo, quizás por falta de potencia estadística, la diferencia no llega a ser significativa. Por otra parte, se aprecia una disminución de la amplitud en un 21%

en los que duermen siesta, en comparación con los que no la duermen, aunque esta diferencia tampoco alcanzó la significación. Este aplanamiento del patrón del ritmo circadiano de la actividad de LSH se traduciría en una mayor dificultad en la movilización de grasa desde los depósitos de tejido adiposo, dato que estaría apoyado por estudios previos de experimentación animal, en los que se ha observado una menor movilización de grasa asociado al aplanamiento del ritmo de la actividad de la LSH [221].

Relación entre los parámetros de ritmo y los hábitos de vida y las características de la población

Al comparar los hábitos de sueño de la población estudiada con las características de los ritmos circadianos de los explantes de tejido adiposo, obtuvimos los siguientes resultados: La amplitud de *LIPE* se correlacionó de forma significativa con la frecuencia de la siesta, es decir, a mayor frecuencia de siesta (número de siesta por semana) menor amplitud del ritmo de expresión de *LIPE* ($r = -0,797$; $P = 0,018$). Además, la amplitud del ritmo se correlacionó con el horario de la comida principal del mediodía (la comida anterior a la siesta), con una amplitud menor si se retrasaba el horario, es decir cuanto más tarde se come hay una tendencia a una menor amplitud ($r = -0,648$; $P = 0,083$). Estos resultados podrían explicar en parte los resultados de nuestros estudios [145] que muestran que los individuos que comían más tarde el mediodía (después de las tres de la tarde) perdían menos peso que los que comían antes de las tres, durante un tratamiento de pérdida de peso. Ya que el aplanamiento del ritmo de *LIPE*, y de la actividad de LSH se ha visto relacionado con una menor movilización de la grasa [246].

El estudio de la siesta es un tema de interés en la ciencia actual. Concretamente en la duración de la siesta. No hay un criterio fijo para diferenciar la siesta corta de la siesta larga, pero de manera general en numerosos estudios se suele asignar la siesta corta con una duración igual o menor de 30 minutos, y la siesta larga a aquella que dura más de 30 minutos [243].

En el presente estudio, debido a la importancia de la duración de la siesta, se decidió dividir dentro del grupo de siesta por duración de siesta corta y larga. Asignándose siesta corta a aquellas inferiores o iguales a 30 min y siesta larga

a las siestas superiores a 30 min, para analizar los efectos de la siesta corta y siesta larga con características metabólicas y del ritmo de gen *LIPE* de la población.

Relación entre las características metabólicas y la duración de siesta

En estos análisis se observa que las personas que duermen siestas de más de 30 minutos (>30 min), tienen un perímetro de cintura-cadera mayor ($P= 0,029$) con respecto a las que las duermen siesta más corta. Así mismo ocurre con la puntuación SMet ($P= 0,030$). A pesar de no observarse diferencia significativa, si se puede reparar en una tendencia a mayor concentración de glucosa sérica (nmol/L) ($P= 0,054$) y mayor presión sistólica (mmHg) ($P= 0,068$) en aquellos individuos que dormían siestas largas que en los que dormían siestas cortas, tal y como se contempla en la **Tabla 12**.

Así mismo, para las características del ritmo de *LIPE*, observamos que tanto la amplitud como la acrofase fue menor en aquellos individuos que presentaron una siesta larga en comparación con lo de la siesta corta, y además la acrofase se adelantó en los de siesta larga al comparar con siesta corta. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas ($P> 0,1$)

La duración parece ser la variable que influye en que la siesta sea beneficiosa o no. Gribble AK *et al.* realizó un estudio de cohortes prospectivo en el cual se encontró una asociación positiva entre la duración de siesta de más de 30 minutos y el desarrollo de SMet dentro de la cohorte mediterránea SUN [255]. Así mismo otros muchos estudios [256] han establecido una asociación entre las siestas diarias de más de 30 o 60 minutos con un mayor riesgo de desarrollar diabetes tipo II [241], enfermedades cardiovasculares [257], aumento de concentraciones de triglicéridos [258] y, en términos generales con el síndrome metabólico [259]. Investigaciones previas han relacionado siestas superiores a 30 minutos con un aumento de la adiposidad abdominal [260, 261], un reciente metaanálisis indica una asociación positiva entre la siesta y el riesgo de obesidad, aumentando significativamente la aparición de obesidad cuando la duración de la siesta superaba los 60 minutos [262]. A pesar de ello, no se ha dilucidado todavía el mecanismo biológico subyacente a este hecho.

Tabla 12. Características del síndrome metabólico y ritmos circadianos de la expresión de *LIPE* de los participantes que duermen habitualmente siesta corta y siesta larga.

	Categorías de siesta diurna (min)				Prueba T Student p-valor
	≤30 min n=3		> 30 min n=5		
	Media	DS	Media	DS	
CARACTERISTICAS					
Rasgos del síndrome metabólico					
ICC	0,87	0,01	1,03	0,09	0,029
*Glucosa (nmol/L)	5,19	0,13	8,34	2,20	0,054
Presión sistólica (mmHg)	128,6	3,51	143,2	10,68	0,068
Presión diastólica (mmHg)	80,3	9,07	85,60	7,19	0,395
SMet	2,00	1,73	4,20	0,44	0,030
Características del ritmo					
Expresión <i>LIPE</i>					
Media (Cambio relativo)	12,62	1,83	13,29	1,46	0,583
Amplitud (% normalizado)	0,31	0,09	0,29	0,17	0,818
Acrofase (hh:mm)	23:52	7:31	23:15	4:21	0,931
Porcentaje de ritmicidad	45,73	20,84	28,85	19,99	0,298
ICC: índice cintura cadera; SMet: síndrome metabólico; *Condiciones de ayuno.					

Tal y como se ha comentado en esta memoria, nuestro grupo de investigación observó en una población mediterránea que la siesta larga (> 30 minutos) se asociaba a mayor IMC y SMet en comparación con los que no dormían la siesta, y en los que muchos factores de estilo de vida y la propia siesta podrían actuar como mediadores para la asociación de siesta larga y obesidad [239].

Por otro parte, observamos que la genética de la siesta puede ser un punto clave. Nuestro grupo demostró que el hábito de siesta es heredable en un 65%, y que puede estar influenciada por la genética, ya que la asociación del hábito de siesta era del doble entre gemelas monocigóticas que entre mellizas dicigóticas [263]. Además, en un estudio en el 2021 de asociación de genoma completo a gran escala (GWAS) de la población de UK Biobank (n=452,633) y

23andMe (n=541,333), nuestro grupo identificó 123 variables genéticas de siesta. Además, mediante randomización mendeliana, mostramos que la siesta podría ser causa de un aumento de presión arterial y una circunferencia de cintura elevada [264].

La relevancia del presente estudio de esta tesis doctoral recae en que es el primero en observar diferencias entre personas que duermen siesta habitualmente y los que no lo hacen en el patrón rítmico de *LIPE* y la LSH, en explantes de tejido adiposo humano de individuos que viven en España, un país donde la siesta es un hábito cultural. Una de las limitaciones es que los datos de siesta eran subjetivos, ya que se obtuvieron por cuestionario. Aun así, creemos que la clasificación en siesta o no es adecuada ya que, un estudio anterior mostró una concordancia buena entre las medidas objetivas y subjetivas (cuestionarios) en aquellos parámetros relacionados con el sueño nocturno y la siesta [265].

Resultados y discusión en relación con el objetivo 1B:

Los resultados obtenidos evidencian que la siesta se asocia con cambios en los patrones rítmicos del gen *LIPE* y de la actividad de la proteína LSH.

Observamos que la expresión de *LIPE* en tejido adiposo humano muestra un ritmo más marcado en aquellos que no duermen la siesta, mientras que en aquellos que duermen siesta se encuentra más aplanado. El aplanamiento de los ritmos circadianos de la expresión del gen *LIPE* puede desencadenar una alteración de la movilización de lípidos, hacia su disminución, contribuyendo al aumento de la obesidad abdominal en aquellas personas que duermen siesta habitualmente. Por otro lado, nuestros datos apoyan estudios previos al vincular la siesta larga con la obesidad abdominal y el síndrome metabólico.

Estos resultados pueden ser un principio para un mayor entendimiento del mecanismo subyacente de la relación entre la siesta y la obesidad abdominal. Pero es necesario investigaciones adicionales para poder extrapolar estos resultados al ámbito clínico.

**RESULTADO Y DISCUSIÓN DEL OBJETIVO 2.
EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A LA INSULINA EN
EL TEJIDO ADIPOSO EXPUESTO A MELATONINA.**

La melatonina y la señalización de insulina

En esta última década ha cobrado especial atención la relación entre la melatonina y el metabolismo de la glucosa [187]. La melatonina se considera la hormona de la noche y está ligada a los ciclos de sueño/vigilia [170]. Se ha detectado que los trastornos del sueño, como puede ser un sueño insuficiente, favorecen el desarrollo de la obesidad [266, 267], teniendo en cuenta la importancia de la melatonina en el sueño, podría ser que la melatonina estuviera relacionada con la obesidad y con las alteraciones asociadas, en especial con aquellas alteraciones asociadas con el metabolismo de la glucosa. De hecho, estudios previos han reparado en la asociación entre la secreción de melatonina durante la noche y la resistencia a la insulina [187, 268-270].

Tal y como se comentó en la introducción, una de las proteínas claves en la ruta de señalización de la insulina es la proteína AKT, también conocida como proteína quinasa B, PKB (“Protein Kinase B” por sus siglas en inglés). Esta enzima se activa y desactiva según la acción de la insulina en el TA, y esta activación está mediada por los receptores específicos de insulina, IR (“insulin receptor, por sus siglas en inglés) [271]. La pAKT (AKT fosforilada/activada) aumenta cuando la insulina interactúa con el adipocito.

Característica de la población de estudio

En la **Tabla 13.1 y 13.2**, se representan las características generales de la población estudiada en este objetivo, que consta de 19 sujetos que pertenecen al grupo de obesidad grado 3, ya que presentan un IMC superior a 42 kg/m². La relación cintura-cadera, las concentraciones séricas de glucosa, los valores de triglicéridos y de tensión arterial se encuentran dentro de los rangos normales según la Federación Internacional de Diabetes (FID) [215]. El horario de las comidas se sitúa entre los horarios habituales de la población española y el diámetro medio de los adipocitos es mayor a 90 µm, por lo que los adipocitos se consideran de gran tamaño, como era de esperar teniendo en cuenta el grado de obesidad de los sujetos estudiados [216].

Tabla 13.1. Características de la población, síndrome metabólico y antropometría.

Población total (n=19)		
	Media	DS
Edad (años)	42,84	12,48
IMC (kg/m ²)	42,14	8,26
Gasa corporal total (impedancia; %)	47,86	8,68
Características del síndrome metabólico		
*Glucosa (mmol/L)	5,70	0,75
*Triglicéridos (mmol/L)	1,29	0,32
*HDL-c (mmol/L)	1,39	0,30
*LDL-c (mmol/L)	2,48	0,75
*Colesterol total (mmol/L)	45,26	10,95
*Presión diastólica (mmHg)	82,94	11,00
*Presión sistólica (mmHg)	120,13	16,76
Antropometría		
Circunferencia de cintura (cm)	126,58	25,64
Circunferencia de cadera (cm)	139,44	22,43
ICC	0,90	0,09
Puntuación SMet	2,15	1,11
ICC: índice cintura-cadera; SMet: síndrome metabólico; *Condiciones de ayuno.		

Tabla 13.2. Características de la población, horario de comida y características del sueño nocturno.

Población total (n=19)		
	Media	DS
Tamaño de adipocitos (μm)		
Subcutáneos	110,50	7,98
Viscerales	108,48	8,01
Horario de comida		
Inicio de desayuno (hh:mm)	8:38	1:27
Inicio de comida (hh:mm)	14:54	0:38
Inicio de cena (hh:mm)	21:28	0:39
Características del sueño nocturno		
Inicio del sueño (hh:mm)	23:20	1:12
Final del sueño (hh:mm)	6:39	1:00
Duración del sueño (h)	7:30	1:16
Número de despertares	1,43	1,16
hh:mm: horas y minutos; h: hora		

Tratamiento simultaneo de melatonina e insulina

Nuestros resultados muestran una interacción significativa entre los diferentes tratamientos (control, insulina, melatonina e insulina más melatonina) y el tiempo (AM y PM) para la sensibilidad del tejido adiposo a la acción de la insulina (i.e., logaritmo del ratio pAKT/tAKT ($P= 0,020$)); mientras que no se observa una interacción significativa entre el tratamiento y el tipo de tejido (subcutáneo o visceral) ($P> 0,05$). Por ello, el resultado principal del modelo mixto se representa en condición de mañana (AM) y condición de noche (PM) de manera separada, pero sin tener en cuenta el tipo de tejido, tal y como se muestra en la **Figura 29**. Los resultados principales muestran diferencias significativas entre el tratamiento con insulina (I) y con insulina más melatonina (I+M), para el ratio pAKT/tAKT solo en la condición de noche (PM) ($P< 0,0001$), dando a entender que se produce una disminución de la sensibilidad a la insulina cuando se añade la melatonina por la noche. Por otra parte, como era de esperar, se observan diferencias

significativas en el ratio pAKT/tAKT entre el control y la insulina ($P < 0,0005$) lo cual nos da garantía de que la insulina está actuando según lo previsto, es decir que se está uniendo a su receptor, y que se ha producido la cascada de respuesta a la insulina. Además, se observan diferencias significativas en el ratio pAKT/tAKT entre la melatonina y la insulina ($P < 0,0001$), todo esto se da en ambas condiciones, mañana y noche. Por el contrario, entre el control y la melatonina no hay diferencias significativas en ninguna de las condiciones ($P > 0,05$) (Figura 29).

En humanos las variaciones posprandiales de la insulina están vinculados al momento del día. Estudios previos muestran que a última hora del día se produce una disminución de la secreción de insulina y una disminución de la sensibilidad de los tejidos a la acción de la insulina lo que contribuye a una peor tolerancia de la glucosa a horas tardías [272]. Carrasco-Benso *et al* [115] fueron los primeros en demostrar que la sensibilidad a la insulina mostraba un ritmo circadiano en tejido adiposo humano, y que la máxima sensibilidad se alcanzaba al medio día, siendo 54% veces mayor por la mañana que por la noche. Estos datos pudieron ayudar a explicar en parte las variaciones de glucemia que se producían en respuesta a las comidas, siendo notablemente más altas por la noche [118, 273]. Son por tanto los factores ambientales o de comportamiento (Horario de la comida) los que podrían estar contribuyendo de manera significativa al desarrollo de la resistencia a la insulina [274]. Aun sin saber los mecanismos subyacentes a ese efecto, es importante señalar que varios estudios han observado que la melatonina se relaciona con el metabolismo de la glucosa [187].

Como hemos comentado anteriormente, nuestros resultados apuntan a una disminución de la sensibilidad a la insulina tras la exposición simultánea de melatonina e insulina en TA. Estos resultados estarían respaldados por estudios previos en humanos, que muestran que cenar tarde, cuando la melatonina endógena está elevada, se asocia con hiperglucemia [228, 268], y que comer durante la noche biológica es capaz de producir diversas alteraciones metabólicas, dentro de las cuales encontramos una elevada glucosa e insulina posprandial [118]. De hecho, se ha podido observar una similitud en la respuesta posprandial de personas sanas durante su noche biológica con la de sujetos

prediabéticos [250]. También se ha demostrado que aquellos portadores del alelo de riesgo para el receptor 2 de melatonina *MTNR1B* poseen una peor tolerancia a la glucosa [275], dando a entender que la melatonina estaría implicada en el empeoramiento de la sensibilidad a la insulina al cenar tarde [276].

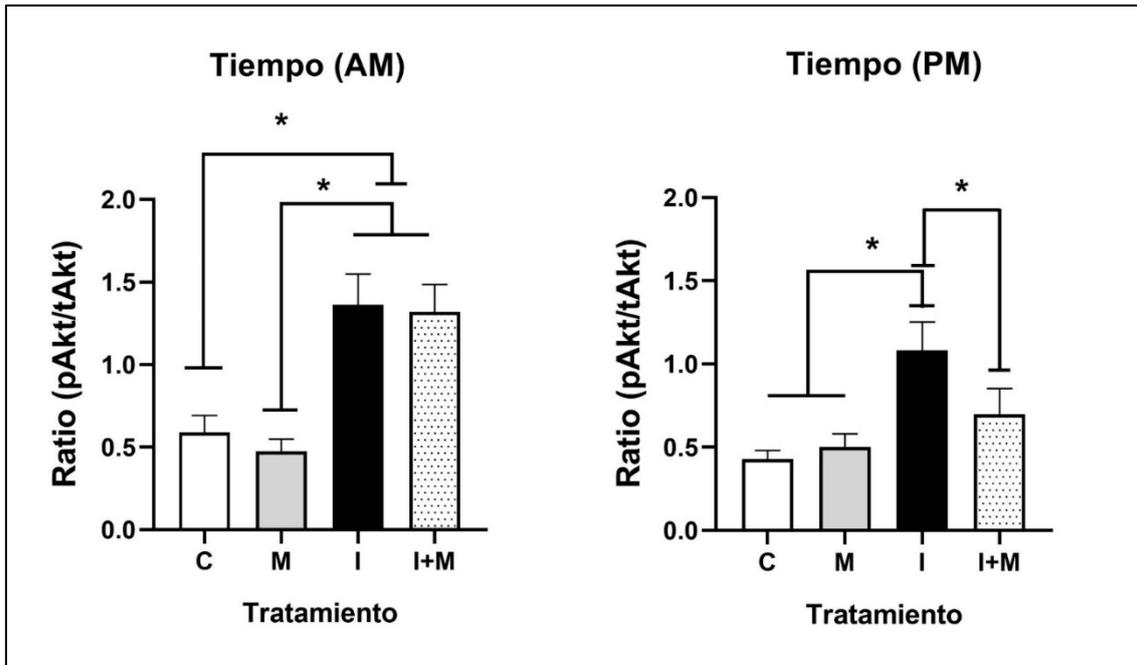


Figura 29. Cambios en la señalización de la insulina (ratio pAKT/tAKT). Efectos de la melatonina en el tejido adiposo en condiciones matutinas (9:00 AM) y vespertinas (9:00 PM) mostrando una sensibilidad a la insulina reducida. Se representan los tratamientos (C= Control. M=melatonina. I= insulina. I+M= insulina más melatonina). Los datos se presentan como media \pm EEM. La AKT fosforilada (pAKT) y la AKT total (tAKT) se midieron mediante Western blot en muestras de tejido adiposo en cultivo. * Indica significación estadística ($P < 0,0001$) entre Insulina (I) e Insulina más Melatonina (I+M) y Control (C) frente a Insulina (I).

La ingesta tardía de alimentos en la cena o el consumo de melatonina farmacológica cerca de las horas posteriores a la cena, son prácticas que si se producen de manera recurrente puede conducir al desarrollo de diabetes tipo II [277].

Hasta el momento, muchos estudios centrados en la alimentación tardía [229, 278] o en el efecto de la administración de la melatonina cercanos a la hora de la cena, tanto en mujeres de avanzada edad [269] como jóvenes [268], consideraron que la melatonina es la implicada en un empeoramiento del metabolismo de la glucosa.

Otro estudio a destacar fue el realizado por mi grupo, al demostrar que los mismos individuos cuando cenaban tarde (en presencia de concentraciones de melatonina endógena) mostraban una peor tolerancia a la glucosa que cuando cenaban temprano. Además, la disminución de la tolerancia a la glucosa fue mayor en aquellas personas portadoras del alelo de riesgo G en *MTNR1B* que en los no portadores [229, 279], siendo aquellos individuos que cenaban más tarde los que mostraban la peor tolerancia a la glucosa.

Sensibilidad nocturna de la insulina a la melatonina

Con el fin de lograr una mejor comprensión de los resultados, a continuación realizamos un análisis exploratorio adicional separando ambos depósitos de TA, basándonos en literatura previa que demuestra que ambos tipos de TA (visceral y subcutáneo) tienen efectos metabólicos diferentes, siendo el VAT el más nocivo [25]. Al observar ambos tejidos por separado, es cuando de manera visual nos dimos cuenta de que la reducción de la sensibilidad a la insulina mediada por la melatonina era más pronunciada por la noche en el tejido visceral que en el subcutáneo (**Figura 30**). Nos abstuvimos a realizar los análisis estadísticos, ya que inicialmente no observamos una interacción significativa de los resultados con el tipo de tejido.

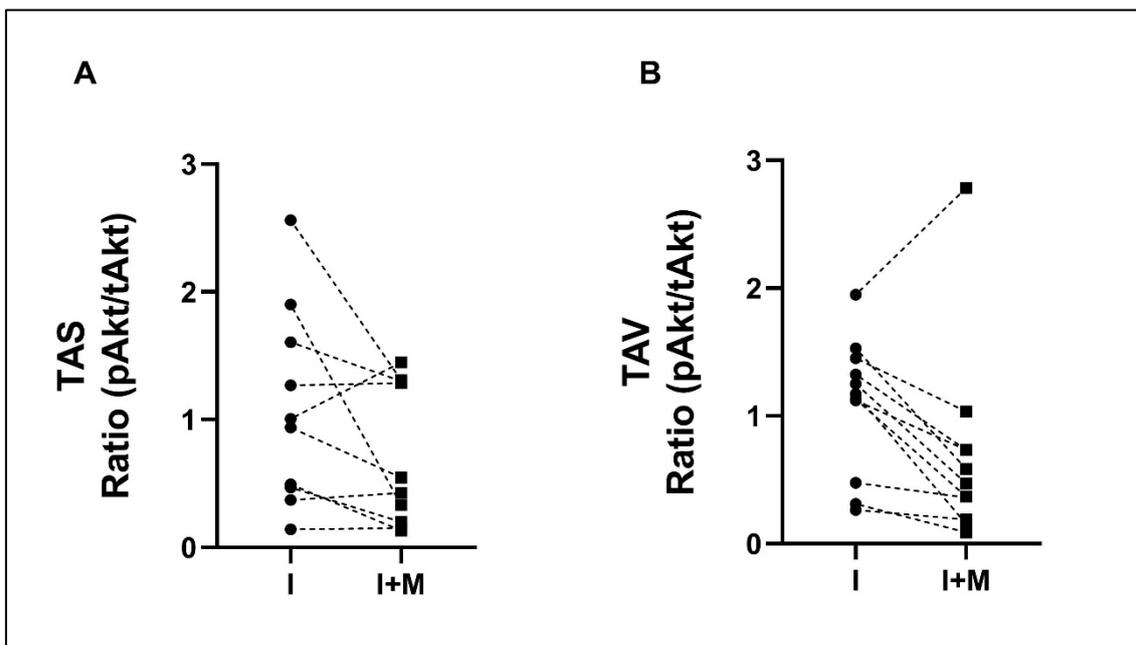


Figura 30. Efecto de la melatonina sobre la sensibilidad a la insulina (ratio pAKT/tAKT), por la noche (PM), en el tejido adiposo subcutáneo (TAS) (A) y en el tejido adiposo visceral (TAV) (B). Se muestran datos individuales. El efecto de la melatonina es más pronunciado en el TAV.

El hecho de que el TA visceral está mucho más vinculado a las alteraciones metabólicas que el TA subcutáneo [280], explicaría que la sensibilidad del tejido adiposo a la insulina fuera menor el TA visceral, y que el efecto de la melatonina sobre la sensibilidad a la insulina fuera también mayor en el tejido visceral que en el subcutáneo como observamos en la Figura 30.

A pesar de que no existen estudios previos en explantes de TA que validen nuestros resultados sobre el efecto de la melatonina sobre la sensibilidad a la insulina, si se ha podido observar, en líneas celulares de adipocitos, el efecto de la melatonina sobre el GLUT4 y la captación de glucosa, siendo este efecto negativo, hacia una inhibición de la GLUT4 [185]. En otros muchos otros estudios se ha demostrado la existencia del receptor de melatonina en adipocitos, lo que hace más verosímil el hecho de que la melatonina pueda actuar de manera directa sobre el TA [281, 282].

En la otra cara de la moneda, nos encontramos con evidencias que respaldan el efecto contrario al sugerido por nuestros resultados, es decir un papel beneficioso de la melatonina sobre la tolerancia a la glucosa. Algunos estudios afirman que una administración prolongada de melatonina es capaz de disminuir la hemoglobina glicosilada (HbA1C) [283] y de aumentar la sensibilidad a la insulina [284] en personas con diabetes de tipo 2. Por todo esto, no es de extrañar la actual controversia sobre el papel de la melatonina en el metabolismo de la glucosa [187].

Los datos poblacionales medios de la sensibilidad a la insulina de los tejidos subcutáneo y visceral en ambos tiempos (mañana y noche) se observan en las **Figuras 31A y 31B**, mientras que en la **Figura 31C** se representan los resultados tras el análisis de Western Blot de un sujeto.

Nuestros resultados muestran que por la noche, cuando coinciden de manera simultánea I+M, disminuye la sensibilidad a la insulina, algo que no se observa de manera tan evidente por la mañana.

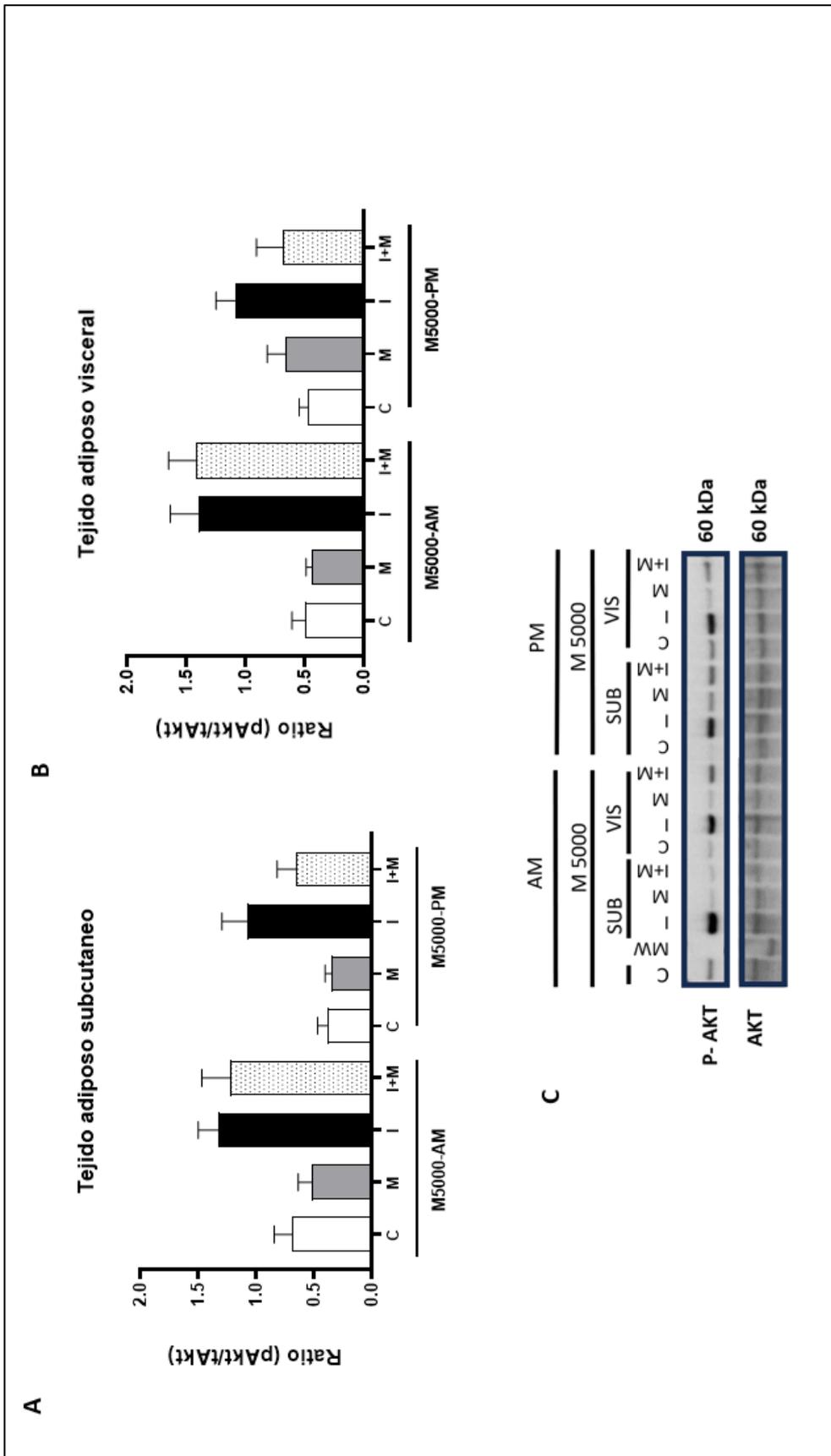


Figura 31. Señalización de la insulina (ratio pAKT/tAKT) en tejido adiposo subcutáneo (panel A) y visceral (panel B). El panel C muestra los niveles de expresión analizados mediante Western blot de un individuo, en explantes de tejido adiposo tratados con melatonina. Se representan los tratamientos (C= Control. M=melatonina. I+M= insulina más melatonina). Los datos se expresan como Media \pm EEM.

Además de lo ya mencionado, cuando analizamos la diferencia entre la Insulina frente a la Insulina + Melatonina (Delta) y comparamos la mañana y la noche (AM, PM; tras la comparación por test T pareado). Nuestros resultados muestran que la diferencia fue mayor durante la condición PM que durante la AM (Delta AM - Delta PM = 0,709, $P= 0,03$) en el tejido visceral. En cambio, no hay diferencias significativas entre Delta AM - Delta PM para la TA subcutáneo ($P < 0,05$). Con este resultado, nuevamente confirmamos que en la condición de noche parece haber un efecto de disminución de la sensibilidad a la insulina causada por la melatonina.

Genes implicados en el tratamiento simultaneo de insulina + melatonina

A pesar de que nuestros principales resultados son reveladores, con el fin de lograr una mejor comprensión, realizamos una secuenciación de la expresión del genoma completo en las muestras de tejido adiposo de Insulina e Insulina + Melatonina del tejido visceral en la condición de noche, ya que fue en este tejido y en esta condición, cuando la adición de melatonina a la insulina mostró resultados más significativos.

Es importante resaltar que nuestro análisis inicial mostró que no existían diferencias significativas a nivel de genes entre ambas condiciones, aunque si encontramos diferencias significativas a nivel de transcritos. Además, el análisis de enriquecimiento funcional de las vías metabólicas no dio lugar a ninguna vía significativo una vez realizado el ajuste para múltiples comparaciones por lo que representamos aquellas vías funcionales que alcanzaron significación sin ajuste (es decir con $P < 0,05$).

Los resultados de secuenciación genética de ARNm muestran que, del total de 62558 transcritos, 235 se expresan diferencialmente en los explantes tratados con melatonina (I+M) en comparación con los expuestos solo a insulina (I). Además, dentro de los 235 que se expresan diferencialmente, 104 están regulados al alza en presencia de melatonina (upregulated) en I+M y 131 están regulados a la baja (downregulated).

En el conjunto de los 131 genes regulados a la baja, los análisis ontológicos posteriores identificaron cuatro vías enriquecidas. Mientras, que las vías representadas de forma significativa en el conjunto de datos de genes regulados al alza son tres.

El diagrama de volcán muestra los genes expresados diferencialmente para el tratamiento (I+M) en comparación con Insulina, que se representan como cambio \log^2 del pliegue de expresión en la **Figura 32**.

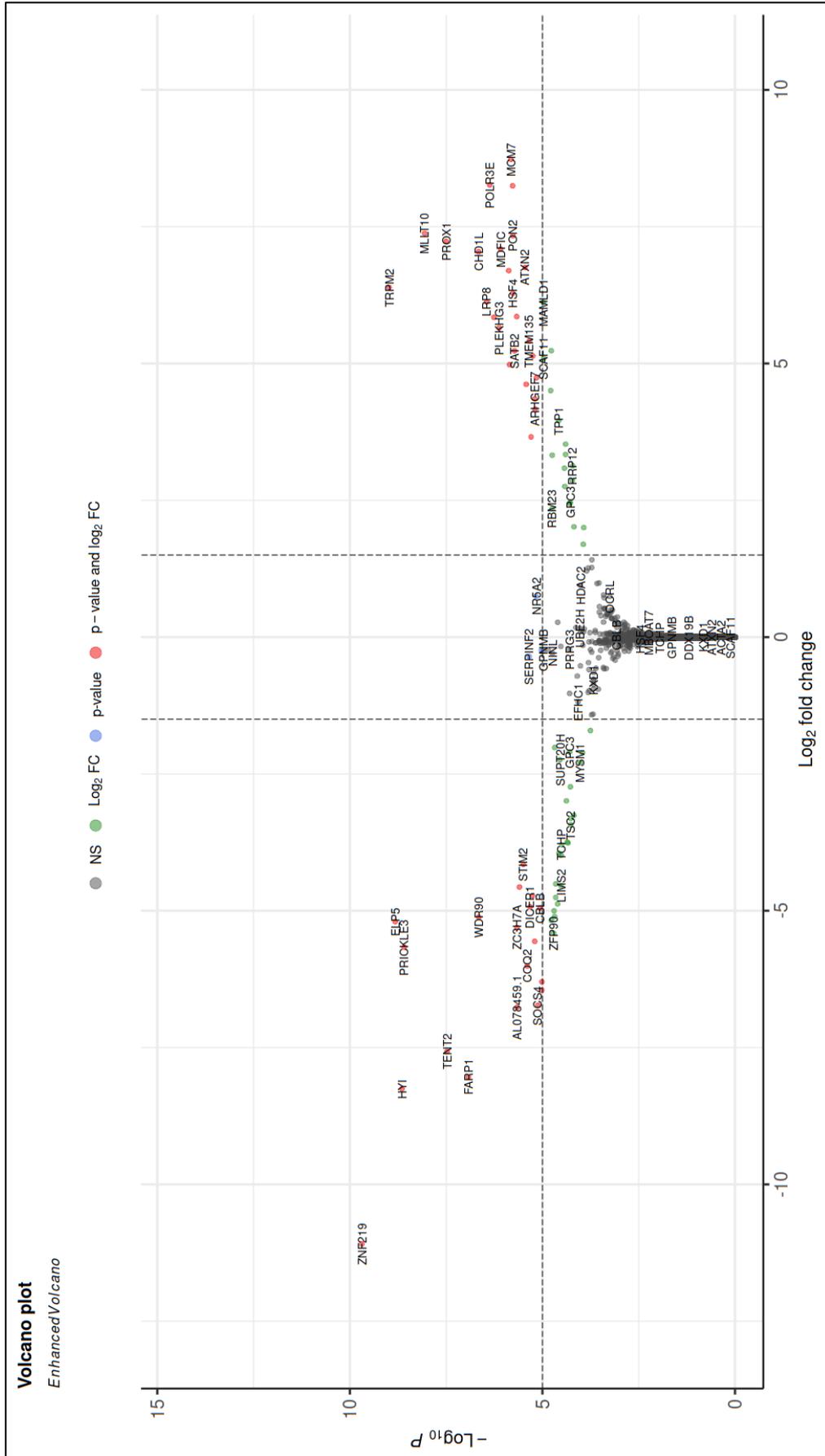


Figura 32. Diagrama de volcán que muestra la diferencia de genes regulados a la baja o al alza en I+M frente a I en el tejido adiposo visceral (n=12). Fc (del inglés, fold change), indica el cambio de expresión génica.

Genes mayoritariamente regulados a la baja con la melatonina

Como se muestra en la Figura 32, ciertos genes son los que están en mayor grado regulados a la baja; entre ellos tenemos: el gen *ZNF219*, también conocido por Zinc Finger Protein 219, por sus siglas en inglés. Este gen forma parte de la familia de genes Kruppel like zinc finger, que interviene en diversos procesos celulares, tales como el crecimiento celular, la diferenciación celular, la embriogénesis y la tumorigénesis [285, 286]. Otro de los genes regulados a la baja por la adición de la melatonina es el gen *ELP5*, gen también conocido como Elongator Acetyltransferase Complex Subunit 5 por sus siglas en inglés, que desempeña un papel importante en la regulación transcripcional de p53 [287, 288]. El *p53* es una proteína que desempeña un papel relevante en el metabolismo energético mediante la activación de la *SIRT1*, gen que participa en la activación de cascadas de señalización celular que mejoran la sensibilidad a la insulina y la homeostasis de la glucosa [289]. Por lo que los efectos regulados a la baja de la melatonina sobre el gen *ELP5* estarían ligados a una disminución de la sensibilidad a la insulina. El gen *HYI* también llamado Hydroxypyruvate Isomerase (Putative), también está regulado a la baja por la adición de melatonina. Este gen cataliza la conversión de hidroxipiruvato en 2-hidroxi-3-oxopropanoato y se cree que puede estar relacionada con el metabolismo y transporte de los carbohidratos [290].

Todos estos cambios transcriptómicos que se producen al adicionar melatonina a la insulina, sugieren que la melatonina es capaz de inhibir la actividad de muchos de estos genes implicados en la acción de la insulina.

Genes mayoritariamente expresados al alza con al adicionar melatonina a la insulina

TRPM2 (del inglés, Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M), es uno de los genes más sobrepresados por la adición de melatonina (ver figura 32). Este gen participa en el sistema inmunológico y en el transporte de canales iónicos. Diversos estudios han demostrado que este gen se expresa en células pancreáticas y puede ser clave en la regulación de la secreción de insulina [291]. Así, Uchida et al. demostraron una alteración de la homeostasis de la glucosa y

una reducción de la concentración de calcio intracelular de los islotes pancreáticos en ratones que carecen del gen *TRPM2* [292].

Vías significativas reguladas a la baja

Tal y como se muestra en la **Figura 33A**, en el análisis de enriquecimiento de rutas se observa la existencia de cuatro vías enriquecidas en los genes regulados a la baja, mientras que solo tres vías estadísticamente significativas en los genes regulados al alza (**Figura 33B**). Dentro de las rutas reguladas a la baja, encontramos que una de las rutas más significativamente enriquecidas es la vía de señalización de la insulina (Figura 34), esta cascada de señalización explica muchos de los efectos fisiológicos de la acción de la insulina a nivel molecular [293]. Dentro de esta ruta significativa, se puede observar que intervienen los siguientes genes: La subunidad del complejo TSC 2 (*TSC2*), el Supresor de la señalización de citocinas 4 (*SOCS4*), y el Cbl Protooncogén B (*CBLB*). Varios estudios han demostrado que el gen *TSC2* posee actividad GAP, es decir actúa como proteína activadora de GTPasa, activando el complejo Rheb-GTP, siendo este complejo proteico, un potente activador de la vía mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1, por sus siglas en inglés) [294]. Esta vía controla un amplio espectro de procesos celulares, incluido el crecimiento, la diferenciación y el metabolismo celular y también la señalización de la insulina, lo que explicaría en parte nuestros resultados [295]. Por ende, el gen *TSC2* es por tanto un regulador crítico de la señalización de la insulina [296]. Por otro parte, el gen *SOCS4*, pertenece a la familia de supresores de la señalización de citocinas. Y, a día de hoy se han identificado varios miembros de la familia SOCS que comparten estructura y función, pero las isoformas más estudiadas e implicadas en la regulación de la sensibilidad a la insulina son *SOCS*, *SOCS3*, *SOCS6* y *SOCS7* [297, 298]. Mientras que de *SOCS4* hay menos información, y la existente lo vincula con la regulación de la señalización del factor de crecimiento epidérmico entre otros [299]. En cuanto al gen *CBLB*, es conocido como supresor de la activación de las células T y B. Estudios previos en ratones apuntan a la capacidad de *cbl-1* de suprimir potentemente la migración y activación de los macrófagos, por lo que se cree que la desactivación del gen *Cbl-b*, sería una buena terapia para mejorar la resistencia a la insulina [300]. Por otro lado, se ha detectado la mutación de *Cbl-b* como factor asociado con

diabetes en modelos de rata [301]. Según nuestros resultados, la combinación de melatonina e insulina podrían estar actuando sobre los genes: *TSC2*, *SOCS4* y *CBLB*, disminuyéndolos su expresión, lo cual repercutiría en la ruta de la señalización de la insulina. Y tal como se observa en nuestros resultados es la ruta más significativamente regulada a la baja.

Otras de las rutas significativas reguladas a la baja mediada por melatonina fueron: la ARN polimerasa, biosíntesis de la ubiquinona y otros terpenoides-quinonas, y la ruta de proteólisis mediada por la ubiquitina (Figura 33). Y entre los genes presentes en estas vías tenemos genes como: *POLR3B* esencial para la maduración, traducción del ARN [302] y *POLR1B* que es fundamental en la transcripción y producción de ARN ribosómico [303], el gen *ANAPC11* participa en la actividad ubiquitina-ubiquitina ligasa [304] y el gen *COQ2* codifica una enzima que funciona en los pasos finales de la biosíntesis de CoQ (ubiquinona) [305] (Figura 34)

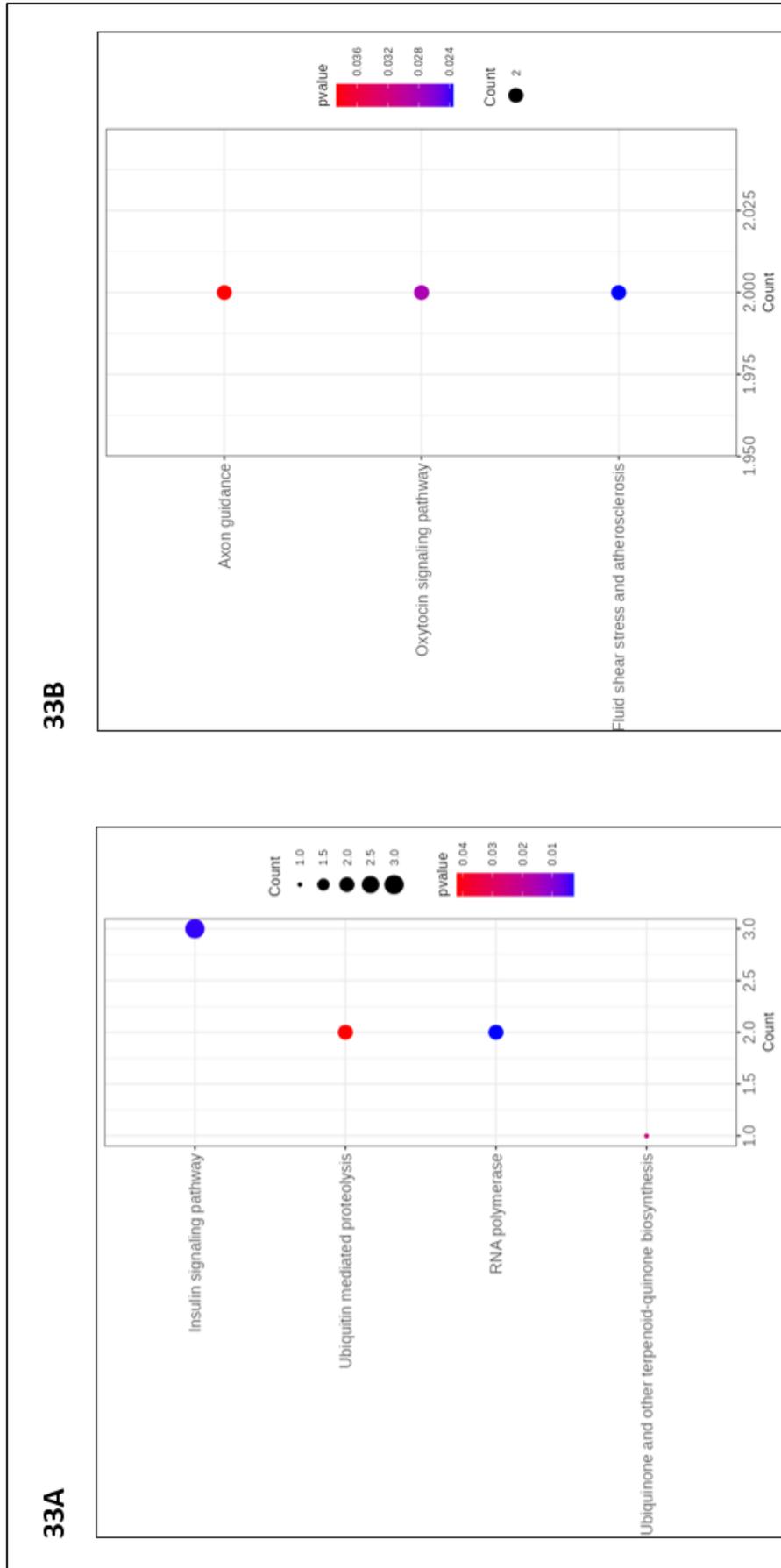


Figura 33. Diagrama de puntos que muestra el enriquecimiento de las vías de genes regulados a la baja (33A) y en genes regulados al alta (33B) para (I+M) en el tejido adiposo visceral (n=12). Count: recuento de genes asociados a una ruta metabólica.

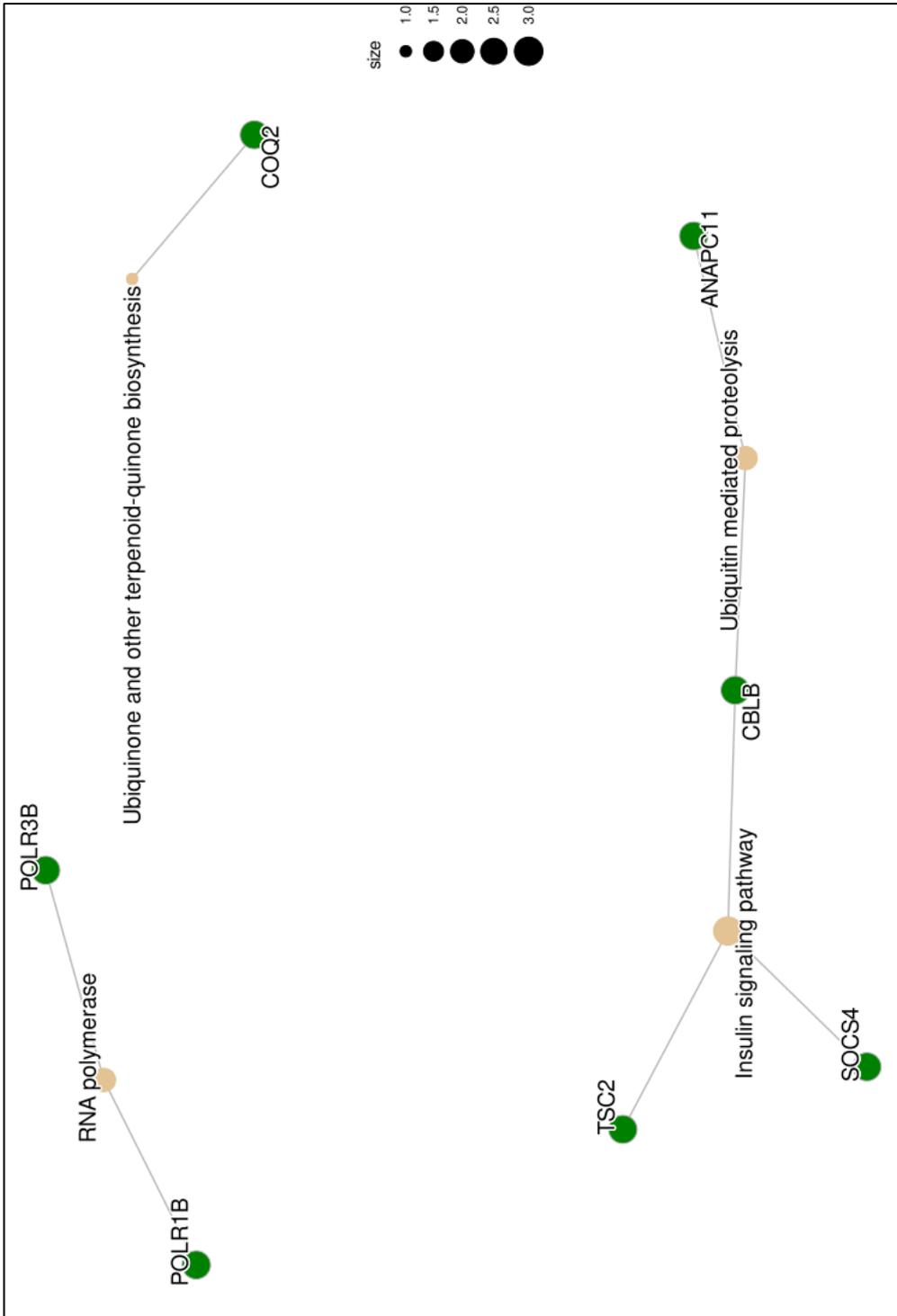


Figura 34. Análisis de vías de genes regulados a la baja en el tejido adiposo visceral para I+M (n=12). Cada círculo verde indica un gen que pertenece a las vías estadísticamente significativas que son los círculos amarillos a los que se conecta con una línea gris. Size: tamaño de nodo de la red.

Vías significativas reguladas al alza

En la Figura 33B encontramos las vías reguladas al alza más significativas, como son: la vía de la tensión de cizallamiento de los fluidos y aterosclerosis, la vía de señalización de la oxitocina y el guiado de axones. Y entre los genes presentes en estas vías encontramos: el gen *SEMA4A*, también conocido como (del inglés, Sema Domain, Immunoglobulin Domain (Ig), Transmembrane), que colabora en la morfogénesis, la carcinogénesis y la inmunomodulación [306]; *MEF2C* (del inglés, Myocyte-Specific Enhancer Factor 2C), gen que participa en el desarrollo y la actividad eléctrica neuronal [307]; el gen *BMPR1B* (del inglés, Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 1B), que participa en la embriogénesis [308]; y por último, el gen *TRPM2* (del inglés, Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M), que participa en el sistema inmunológico innato y en el transporte de canales iónicos [291] (**Figura 35**).

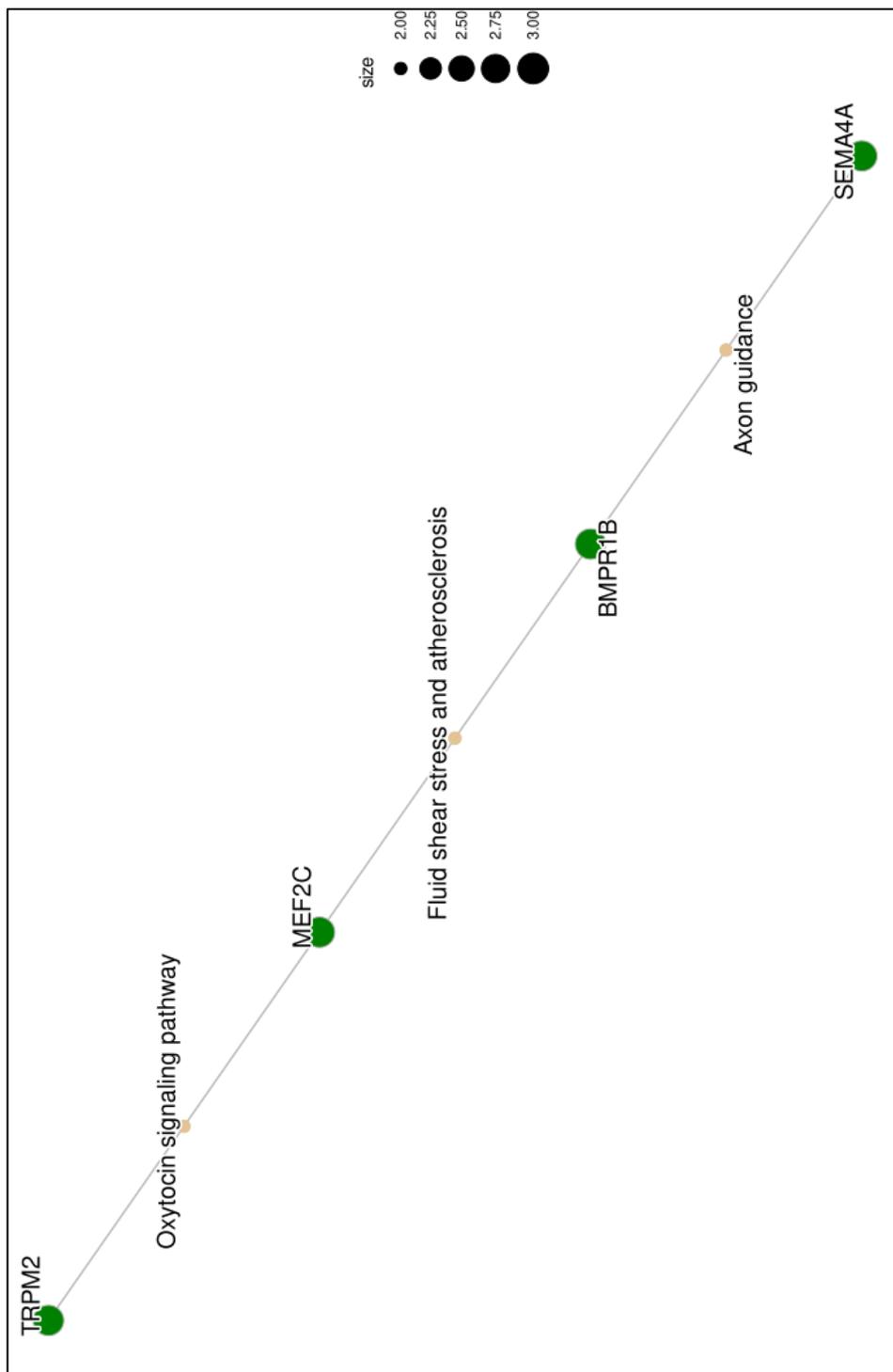


Figura 35. Análisis de vías de genes regulados al alta en el tejido adiposo visceral para I+M (n=12). Cada círculo verde indica un gen que pertenece a las vías estadísticamente significativas que son los círculos amarillos a los que se conecta con una línea gris. Size: tamaño de nodo de la red.

Explicación cronobiológica de nuestros resultados

Una teoría acerca de la reducción de la sensibilidad a la insulina por parte de la melatonina en condición de noche es la "causa cronobiológica". Por ello podemos señalar que el ritmo circadiano de la melatonina parece ser opuesto al de la tolerancia a la glucosa. Así la secreción máxima de la melatonina por la noche (o acrofase) coincide con el nadir o la menor tolerancia a la glucosa [187]. Muchos estudios de casos y controles sugieren que la melatonina disminuye la tolerancia a la glucosa principalmente al disminuir la sensibilidad a la insulina [268, 269]; esto concuerda con nuestros resultados actuales, que muestran que la melatonina disminuye la sensibilidad a la insulina en el TA humano durante la noche. Y, además, se ha observado que la melatonina puede reducir la tolerancia nocturna de la glucosa en personas sanas [268].

A pesar de que nuestro estudio revela una disminución de la sensibilidad a la insulina como consecuencia de añadir melatonina, hay escasa bibliografía sobre el efecto directo en tejido adiposo humano con el que poder cotejar nuestros resultados. Por ello es necesario más estudios de interacción melatonina e insulina sobre el tejido adiposo, puesto que el consumo de melatonina ha aumentado exponencialmente en la sociedad actual, observándose que aproximadamente 3 millones de adultos estadounidenses han utilizado, en el último mes, melatonina sin prescripción médica para abordar problemas de sueño [309].

Resultados y discusión en relación con el objetivo 2:

Podemos confirmar que la exposición simultánea a melatonina e insulina en tejido adiposo humano reduce la respuesta a la acción de la insulina, lo que sugiere un efecto negativo de la melatonina sobre la sensibilidad a la insulina sobre todo por la noche, y de forma más marcada en el tejido visceral.

Nuestros resultados han revelado la regulación a la baja de varios genes relacionados con la señalización de la insulina en presencia de melatonina, lo que refuerza la teoría de su efecto negativo sobre el metabolismo de la glucosa.

El objetivo final de este trabajo es proporcionar una mayor comprensión de la acción de la melatonina sobre el metabolismo de la insulina. Nos insta a tener en cuenta la hora de la cena, así como de evaluar la hora de administración de melatonina, para evitar que coincida con la fase de ingesta nocturna (altos picos de insulina circulante) y prevenir problemas metabólicos.

**RESULTADO Y DISCUSIÓN DEL OBJETIVO 3.
VARIACIÓN DE LA LIPÓLISIS EN EXPLANTES DE
TEJIDO ADIPOSO HUMANOS: AYUNO INTERMITENTE**

Tal y como se menciona en la introducción, a lo largo de estos últimos años han surgido estrategias dietéticas basadas en el ayuno, como resultado de los beneficios potenciales sobre el peso corporal, y otras características del síndrome metabólico tal y como se muestran en este metaanálisis [310]. En la actualidad, el ayuno intermitente se ha popularizado como una estrategia novedosa para perder peso y combatir las enfermedades metabólicas, ya que no requiere métodos tediosos como algunas dietas de restricción calórica [311]. A la hora de expresar el ayuno intermitente se suele utilizar una barra oblicua que separa el número de horas de alimentación de las horas de ayuno. Por ejemplo, una TRE 10/14 nos indica que la franja o ventana de alimentación diaria son 10 horas, mientras que las 14 horas restantes son estado de ayuno.

En el presente estudio designaremos la abreviatura TRE (del inglés Time Restricted Eating) cuando nos refiramos al ayuno intermitente. Nuestra estrategia se basó en simular en cultivos de tejido adiposo, lo que sería un ayuno intermitente en condiciones extremas, con 4 horas diarias de alimentación y 20 horas de ayuno, es decir un TRE 4/20. Se simularon dos tipos de TRE, uno en el que se alimentaba al tejido adiposo durante 4 horas por la mañana (de 8 a.m. a 12 del mediodía) y el resto del día en ayunas (TRE temprano); y otro en el que se alimentaba el tejido adiposo por la tarde/noche (de 4 p.m. a 8 p.m.). Estas dos situaciones de TRE se compararon a) entre ellas; b) con el patrón de alimentación habitual de nuestra sociedad en el que se come durante el día (cada 4 horas) y se ayuna por la noche (de medianoche a 8 de la mañana) es decir 16/8; c) con una situación de ayuno de 24 h, con el fin de alcanzar un mejor conocimiento del efecto del TRE sobre la movilización de grasa en el tejido adiposo humano.

Características de la población

Las características generales de los participantes (n=21) se muestran en la **Tabla 14**. Los individuos pertenecían al grupo de obesidad de grado 2 y 3, por su IMC ≥ 35 (kg/m²), con circunferencia de cintura y concentraciones séricas de triglicéridos elevadas, por encima de los valores considerados normales por la Federación Internacional de Diabetes (FID), mientras que el resto de valores se encuentra dentro de los rangos habituales [215]. El horario habitual de las

comidas de los sujetos estudiados coincide con los horarios típicos en España, y la duración del ayuno nocturno fue de 13,41 horas.

Tabla 14. Características generales de la población estudiadas para la consecución de los objetivos 3.

Población total (n=21)		
	Media	DS
Sexo (% mujer)	52,4	
Edad (años)	39,33	10,38
IMC (kg/m ²)	40,51	5,56
Gasa corporal total (impedancia; %)	44,17	7,5
Características del síndrome metabólico		
Circunferencia de cintura (cm)	121,35	13,97
ICC	0,89	0,067
*Glucosa (nmol/L)	5,54	1,81
*Triglicéridos (nmol/L)	1,87	0,79
*Presión arterial diastólica (mmHg)	79,88	14,48
*Presión arterial sistólica (mmHg)	113,94	12,28
Puntuación de SMet	2,47	1,30
Características del sueño nocturno		
Inicio de sueño (hh: mm)	23:51	1:51
Final del sueño (hh: mm)	7:17	2:55
Duración del sueño (h)	7,92	1,47
Horarios de las comidas		
Inicio de desayuno (hh:mm)	7:58	1:08
Inicio de comida (hh:mm)	14:49	0:46
Inicio de cena (hh:mm)	21:01	0:39
Duración del ayuno nocturno (h)	13,41	1,19
ICC: índice cintura-cadera; SMet: síndrome metabólico; *Condiciones de ayuno.		

Variación en la liberación de glicerol en distintos momentos del día (24 h)

Para medir la movilización de grasa, se cuantificó la liberación de glicerol (mol/h/g) por parte de los explantes de TA en el medio de cultivo.

Aunque existen varias estrategias para evaluar la lipólisis, la evaluación más directa de la lipólisis es la medición de los productos lipolíticos liberados por los adipocitos o los explantes de grasa, uno de estos productos es el glicerol [312].

Nuestros resultados del modelo mixto muestran diferencias significativas en la liberación del glicerol (mol/h/g) entre los distintos tratamientos (Control, eTRE, dTRE y 24 h ayuno) ($P= 0,0001$), y también para el momento circadiano ($P= 0,0001$). Se observa interacción significativa entre el tipo de tratamiento y el momento circadiano para la liberación de glicerol ($P < 0,0001$), lo que sugiere que el efecto del tratamiento sobre la liberación de glicerol cambia en función del momento circadiano. En la **Figura 36** se muestra la liberación media de glicerol de los explantes de TA de los 21 participantes para cada momento circadiano en los diferentes tratamientos.

Estos resultados nos dan a entender que existe una influencia tanto en el tipo de tratamiento, como por el momento circadiano, para la liberación del glicerol.

Análisis exploratorios posteriores usando el mismo modelo mixto, pero separando los resultados para cada tiempo circadiano, mostraron diferencias significativas entre el Control y el eTRE en los puntos CTs 0,4,12,16, 20 y 24; y entre el Control y el dTRE en los puntos CTs 4, 8, 20 y 24, tal y como se observa en la **Figura 36** con los símbolos * y #. Y, además, el Control mostró diferencias significativas en cada punto CT con respecto a la condición de ayuno continuo de 24 horas ($P < 0,0001$). Por otra parte, también se encontraron diferencias significativas entre el eTRE y la condición de ayuno en cada CT excepto en CT0 y CT24 (8 a.m.); y entre el dTRE y la condición de ayuno en cada CT excepto en CT4 (12 a.m.) y CT8 (4 p.m.) con mayor liberación de glicerol en la condición de ayuno. Los símbolos de significación no se representan en la Figura 36, para evitar confusiones.

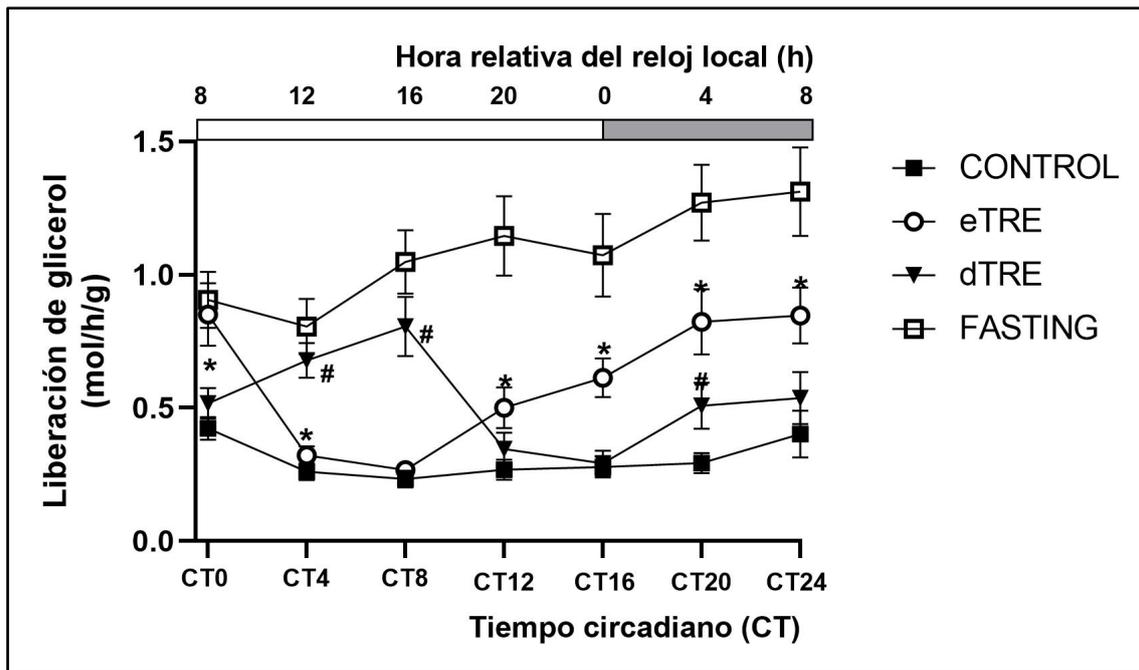


Figura 36. En esta figura se representa la media de glicerol cada 4 horas. Los datos se representan con cuadrados negros para el control, cuadrados blancos con bordes negros para la condición de ayuno (Fasting), círculos blancos con bordes negros para eTRE y triángulos negros para dTRE. Los asteriscos (*) y las almohadillas (#) indican significación estadística ($P < 0,0001$). Los asteriscos cuando se encontraron diferencias significativas entre control y eTRE en los puntos de tiempo circadiano y las almohadillas entre control y dTRE. El eje X superior representa las horas del reloj local, el recuar y el eje X inferior las horas circadianas.

Liberación de glicerol total (24 h) entre los distintos tratamientos

La **Figura 37A** representa la liberación total de glicerol durante 24 horas en las cuatro condiciones de tratamiento. Como era de esperar, el ayuno continuado de 24 h moviliza más grasa que con un patrón regular de comidas (Control), siendo esta diferencia significativa ($P < 0,0001$). Por otra parte, se observa que ambas condiciones de TRE (eTRE y dTRE), tienen mayor capacidad de liberación de glicerol que la situación de Control ($P < 0,0001$) durante un periodo total de 24 h. Lo que sugiere que el ayuno intermitente (TRE) da lugar a un aumento la movilización de grasa del TA, y lo que es más importante, existen diferencias significativas en la liberación de glicerol entre las condiciones de ayuno intermitente temprano (eTRE) y tardío (dTRE) durante las 24 horas del día, hacia una mayor liberación de glicerol durante el ayuno intermitente temprano (eTRE; $P = 0,019$) en comparación con dTRE.

Desde tiempos remotos, incluso aun sin saberse muy bien por qué, siempre se ha comentado lo bueno que era comer por la mañana, evitando comer mucho por la noche. De ahí el refrán “Desayuna como un rey, almuerza como un príncipe y cena como un mendigo” de *Moisés ben Maimón o Maimónides (años 1135-1404)*. Hoy en día, estudios previos vinculan que el efecto beneficioso se pueda deber a la alineación del momento de la comida con el ritmo circadiano endógeno, debido a que el ritmo circadiano participa en muchos ritmos metabólicos, incluidos los ritmos del metabolismo de la glucosa y los lípidos [313].

Como se ha mencionado anteriormente, en el presente estudio la estrategia TRE (tanto eTRE como dTRE) muestra una liberación de glicerol significativamente mayor que el del grupo control, lo cual sugiere que el ayuno intermitente es más efectivo en la movilización de grasa que un patrón de alimentación habitual, lo que podría estar relacionado con la mejora de la sensibilidad a la insulina y la reducción de la adiposidad, que se observa en varios ensayos clínicos con el TRE [158, 314-316]. Nuestro estudio se realizó en condiciones extremas de solo 4 horas de ingesta al día, y el resto de ayuno (4/20). Si comparamos con estudios clínicos, solo existe hasta el momento un único estudio en humanos que ha llegado a usar un TRE de 4 y lo comparan con una condición control en el que se produjo una reducción del porcentaje de grasa y reducción de la resistencia a la insulina al compararlo con patrón un de alimentación habitual [162], lo que apoyaría nuestros resultados sobre el aumento de la movilización de grasa por parte de una estrategia TRE 4/20 sobre un patrón de alimentación habitual.

Estos resultados, que muestran que el TRE temprano es más efectivo para la movilización de grasa que un TRE tardío, sugieren que concentrar la alimentación en la mañana podría producir beneficios adicionales con respecto a la lipólisis y la descomposición de las grasas, que si se concentra la alimentación por la noche. Pero hasta el momento, muchos otros estudios clínicos randomizados y cruzados no han hallado diferencias significativas entre la eTRE y la dTRE, tal y como se muestra en un reciente metaanálisis [317]. Sin embargo, algunos estudios independientes previos, mostraron que la eTRE mejora la sensibilidad a la insulina, el estrés oxidativo lipídico [158] y la presión

arterial [163] en comparación con la dTRE; mientras que otros estudios discrepan y no observan estas diferencias metabólicas [160, 318], por lo que el efecto del TRE sobre el peso corporal no está claro todavía [159].

El hecho de que se observe una mayor liberación de glicerol con un TRE temprano que un TRE tardío, donde la única diferencia es el momento del día en el que se realiza la comida, puede deberse a la influencia del reloj circadiano interno [319, 320]. Son muchas las funciones fisiológicas que exhiben un ritmo circadiano y cuya actuación es principalmente por la mañana. Este es el caso del vaciamiento gástrico [321], la biosíntesis y catabolismo de los lípidos [313] y la sensibilidad a la insulina en el tejido adiposo humano [115], funciones todas ellas que se realizan principalmente por la mañana. Otro factor que pudiera influir en que durante el TRE tardío, la movilización de grasa por el tejido adiposo fuera menos podría ser la falta de sincronización del momento de la comida con las señales de luz/oscuridad, que es lo que sucede cuando la máxima ingesta se realiza por la tarde/noche. Esta falta de sincronización podría alterar los mecanismos de saciedad a través de la ghrelina y la leptina [322], instando a una mayor ingesta calórica; además, por la mañana el cuerpo muestra una mayor termogénesis inducida por la dieta [323], que disminuye durante la noche. Todos estos procesos al concurrir por la mañana podrían explicar el aumento de la masa corporal de las personas que se saltan el desayuno y que por tanto acaban retrasando sus comidas a horarios más tardíos [324]. Por otra parte, estudios previos han observado que las personas obesas tienden a situar la hora de la comida más cerca del inicio de la noche en comparación con las personas delgadas [325] lo cual según lo mencionado anteriormente y con respecto a nuestros resultados haría que disminuyesen el proceso de movilización de grasas. A pesar de estas evidencias científicas, los mecanismos subyacentes a los efectos del horario de las comidas sobre la grasa corporal y la obesidad siguen siendo confusos [326].

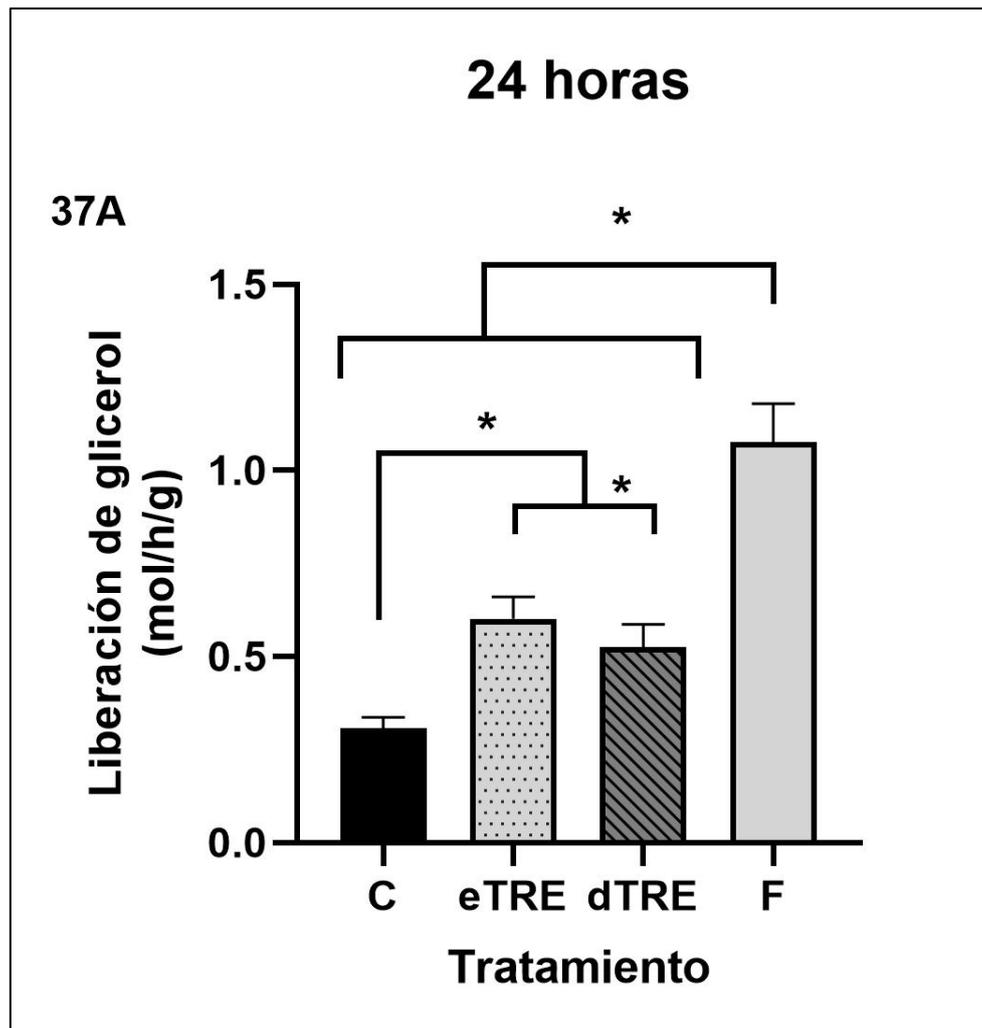


Figura 37 A. Representación de liberación total de glicerol durante las 24 horas del día. Los tratamientos se representan con barras verticales: control (n=20) barra negra, eTRE (n=21) barra con puntitos, dTRE (n=21) barra con rayas, y ayuno (n=21) barra gris. Los datos se representan en media±EEM. *indican significación estadística ($P < 0,0001$).

Movilización de grasa en condición de mañana y noche

Puesto que en nuestros resultados (Figura 37A) se observa una mayor movilización de grasas durante las 24 horas del día cuando la simulación de la ingesta se realiza por la mañana en comparación con cuando la ingesta se realiza por la noche en el TRE, creemos relevante conocer el comportamiento y las diferencias en liberación de glicerol que pueda haber entre los tratamientos durante el día, y durante la noche, a las horas que habitualmente se duerme. Para ello se repitió el análisis estadístico incluyendo solo el día/periodo de vigilia (de 8 a.m. a medianoche) para observar las diferencias de liberación de glicerol total entre sus tratamientos. Como era de esperar, se perciben diferencias

significativas entre control y ayuno ($P < 0,0001$), liberándose una cantidad significativamente mayor de glicerol en ayuno. También se aprecian diferencias significativas entre el control y ambas condiciones TRE (eTRE y dTRE), con una liberación de glicerol significativamente mayor en las condiciones TRE ($P < 0,0001$); mientras que no se advierten diferencias significativas entre eTRE y dTRE ($P = 0,976$) (**Figura 37B**). Sin embargo, cuando se analizaron los resultados de liberación de glicerol en el período nocturno/sueño (desde la medianoche hasta las 8 a.m. del día siguiente) sí se observa una mayor movilización de glicerol en eTRE en comparación con dTRE ($P = 0.000007$), manteniéndose la diferencia significativa entre el tratamiento Fasting 24 h y ambos TRE (eTRE y dTRE) con respecto al control ($P < 0,0001$) (**Figura 37C**).

A pesar de que los resultados en animales no son extrapolables a humanos debido a que sus fases de actividad y alimentación son opuestas a la de los humanos, estudios previos en animales revelan que cuando el horario de alimentación se restringe a una ventana de tiempo específica en comparación con un patrón de alimentación regular, se produce una pérdida de peso significativa mayor, una disminución del tamaño de adipocitos, un pardeamiento del tejido blanco a causa de un aumento de la expresión de la proteína (UCP1), un aumento de la β oxidación [327-329] y una disminución de la expresión de Cell death-inducing DNA fragmentation factor-like effector C (Cidec), un gen inhibidor de la lipólisis [330].

Como se ha comentado anteriormente observamos que la restricción de la ingesta a una ventana de tiempo de 4 horas por la mañana aumenta la liberación de glicerol total de 24 horas en comparación con la ventana de alimentación tardía, y que el aumento de movilización de grasa que se produce en eTRE respecto al dTRE se produce principalmente durante el período nocturno/descanso (Figura 37C). Los hallazgos sugieren que eTRE, puede promover una movilización de grasa más eficiente durante la noche, aumentando la lipólisis [331] para satisfacer las necesidades energéticas durante el ayuno nocturno [332]. Esta situación produce una alineación entre el ritmo circadiano endógeno y la ingesta, que tal y como hemos explicado anteriormente por la mañana nuestras funciones están más preparadas para comer. Estos hallazgos indicarían los beneficios potenciales de alinear los patrones de alimentación con

los ritmos circadiano. Dado que, estudios previos en humanos han mostrado que comer de acuerdo con los ritmos circadianos, situando la ingesta de alimentos por la mañana, en lugar de por la noche, produce una mejora de los valores lipídicos, glucémicos, además de aumentar la pérdida de peso y reducir la sensación de hambre [145, 315, 333]. Y es que el reloj circadiano endógeno desempeña un papel importante en el metabolismo [334]. Las primeras evidencias que respaldan la estrecha relación entre el reloj circadiano, el metabolismo y el momento de la comida como factor importante para modular el peso, se observaron en modelos animales, concretamente en ratones que se sometieron a una alimentación en su fase inactiva, lo que derivó en la desincronización entre los tejidos periféricos y el reloj central, seguido de un aumento de peso y alteraciones metabólicas [134, 335]. Demostrando por tanto que el momento de la comida actúa como una poderosa señal para la determinación de fase y ritmicidad en los órganos periféricos [154, 155].

Pero por lo general, estudios previos observaron que la pérdida de peso viene asociada a una mejora generalizada del metabolismo de la glucosa [336], presión arterial [224] y oxidación de las grasas [315, 337]. Leonidas S Lundell *et al.* sugerían que la TRE a corto plazo, era capaz de modular el ritmo diurno del metabolismo de los lípidos [338]. Por este motivo es de interés saber cuál es el mejor momento para organizar dicha restricción alimentaria [150] y parece ser de gran relevancia cuadrar la comida con los periodos circadianos. Pero de igual manera y a pesar de todas las posibles variables mencionadas, los mecanismos que subyacen a los efectos del horario de las comidas en los resultados de salud pueden ser multifactoriales.

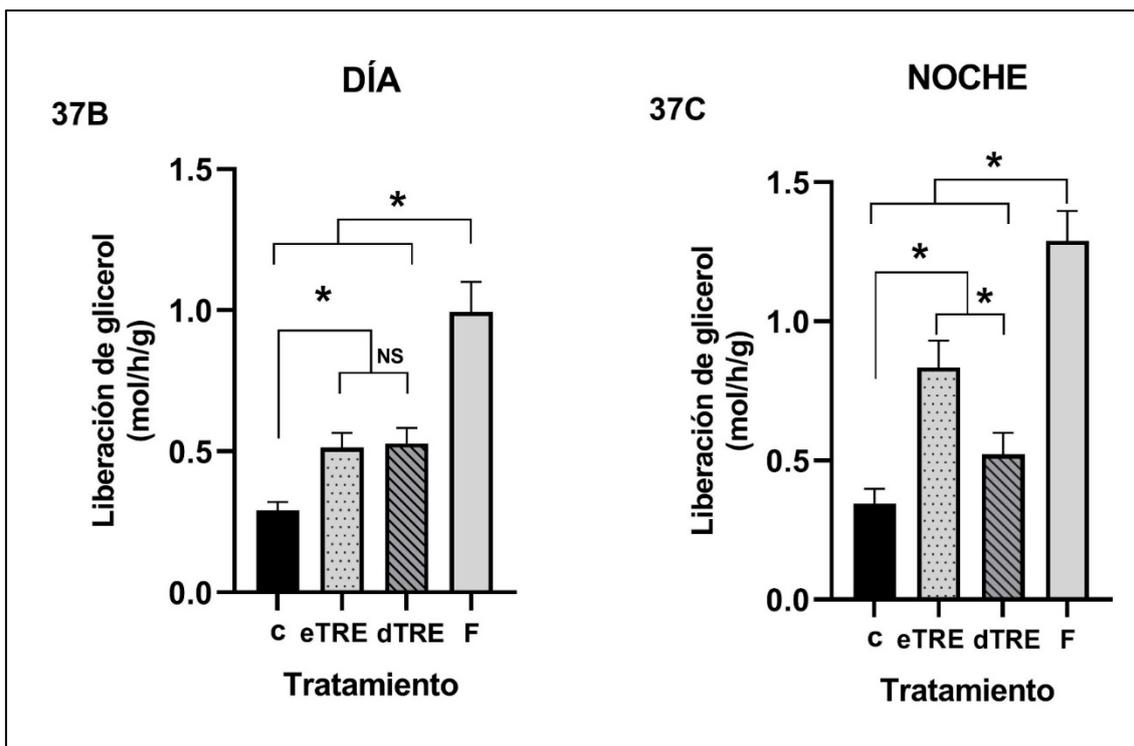


Figura 37 B-C. En esta figura se representa la liberación total de glicerol durante el día (B) y durante la noche (C). En ambas figuras los distintos tratamientos se representan con barras verticales: Control (C) barra negra, eTRE barra con puntitos, dTRE barra con rayas y ayuno barra gris. Los datos se representan en media \pm EEM *indican significación estadística ($P < 0,0001$). NS indica no significancia estadística.

Comparación entre eTRE y dTRE según las horas de ayuno

A día de hoy persiste el debate en la comunidad científica sobre la eficacia de la alimentación restringida en el tiempo como estrategia dietética para perder peso [339], ya que estudios previos sugieren que TRE no es más eficaz para la pérdida de peso que las dietas sin restricción horaria [159, 340].

Diferencias en duración del tiempo de ayuno

Una de las preguntas planteadas es si las diferencias en pérdida de peso que se podrían producir entre una condición en el que la ventana de ingesta se produce por la mañana o por la tarde/noche, se deban a la hora a la que se come, o a las diferencias en duración de ayuno entre las dos condiciones de TRE. Nuestros resultados muestran que existen diferencias significativas en la liberación de glicerol (mol/h/g) dependiendo de la duración del ayuno entre las dos situaciones de eTRE y dTRE, hacia una mayor liberación de glicerol cuando la duración de ayuno es mayor. Por ejemplo, tras 8 h de ayuno se produjo una liberación de

glicerol de $0,50 \pm 0,07$ mol/h/g de $0,56 \pm 0,07$ mol/h/g a las 12 h y de $0,75 \pm 0,08$ mol/h/g a las 16 h de ayuno (media \pm EEM) ($P < 0,0001$); mientras que no existieron diferencias significativas en función de la ventana de tiempo a la que se produjo la ingesta (eTRE y dTRE) ($P = 0,189$). Y además tampoco se encontraron interacciones significativas entre el tratamiento (eTRE y dTRE) y la duración del ayuno ($P = 0,988$). Es decir, que independientemente de la ventana temporal (eTRE o dTRE), la liberación de glicerol aumentó con la duración del ayuno, indicando que la movilización no es constante y por tanto varía como se muestra en la **Figura 38**.

Con el fin de ver como unas condiciones extremas de ayuno afectan a la movilización de grasa según el momento en el que se sitúa esa ventana de alimentación, se igualaron los puntos CTs según la duración del ayuno entre eTRE y dTRE (**Figura 38**).

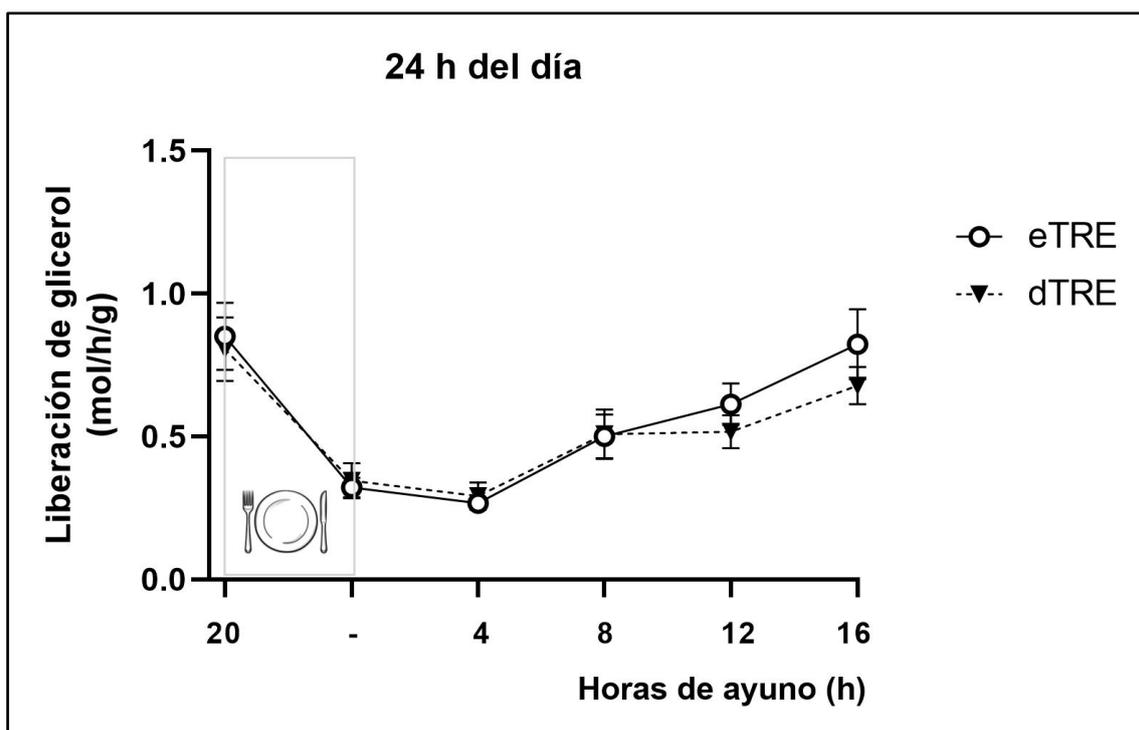


Figura 38. La liberación media de glicerol 24 horas se representa emparejando los puntos CT que tengan la misma duración de ayuno. eTRE se corresponde con círculo blanco con borde negro, y dTRE con triángulo negro. Todos los errores estándar de la media se representaron con líneas verticales. El recuadro y la figura del plato enmarcan el momento de la comida.

Diferencias en la duración de la ventana de tiempo de ingesta

La controversia que existe en los resultados obtenidos en relación al ayuno intermitente podría estar relacionada con el hecho de que no existe un consenso sobre la duración de la ventana de tiempo de ingesta recomendada para una pérdida de peso eficaz.

La mayoría de los ensayos previos apuestan por una aplicación dietética en la que la ventana de tiempo de ingesta oscile entre 8-10 horas, debido a que es más fácil su adherencia para compaginarla con la vida social. A pesar de la cantidad de estudios que han surgido durante estos últimos años, no se han encontrado muchas diferencias en el beneficio metabólico entre una ventana de ingesta de 10 o 6 horas [158, 341, 342], o de 4 o 6 horas [162], ya que en ambos casos se beneficiaron mejorando el peso corporal y las comorbilidades asociadas a la obesidad y sobrepeso.

En el presente trabajo, a pesar de no haber diferencia significativa entre la movilización de glicerol entre eTRE y dTRE a la misma duración de ayuno, se puede contemplar en la Figura 38 que la tendencia es a que se movilice mayor grasa cuando la ventana de alimentación se realiza por la mañana (eTRE) en lugar de por la noche (dTRE), y que la liberación va siendo mayor conforme se va aumentando las horas de ayuno.

El hecho de que exista la posibilidad de múltiples combinaciones de ventanas de tiempo es un problema a la hora de comparar estudios, y por tanto no se sabe cuál es la ventana de tiempo más adecuada para la pérdida de peso. Aunque, varios estudios han demostrado que una ventana de tiempo que oscile entre 6 y 10 horas es de momento la recomendada con más frecuencia en humanos por sus mejoras metabólicas, y reducción de peso corporal [163, 224, 341].

Solo existe un estudio que haya implementado una ventana de alimentación de 4 horas en humanos [162] y en su caso, al igual que en el nuestro, se observa que una ventana de alimentación corta de 4 horas produce una movilización de grasa más significativa que ninguna restricción de horario, lo que apoyaría nuestros resultados. En particular, los estudios experimentales

en humanos apuntan a que el consumo de la comida por las mañanas mejoran parámetros como la captación de glucosa y sensibilidad a la insulina [250], mientras que alimentarse bien entrada la noche se asocia con valores más elevados de triglicéridos, LDL y colesterol; lo que puede asociarse a mala salud cardio metabólica como indican estos estudios observacionales [227, 343]. En adultos sanos también se han observado cambios en el periodo posprandial, hacia un aumento de los niveles de glucosa, menor oxidación de ácido grasos libres cuando cenaban más tarde de las 22:00 h de la noche [344]. De manera similar, se han observado alteraciones en el ritmo circadiano, en este caso de temperatura corporal y cortisol, en niños que cenaban tarde [345], y sabemos que el cortisol es una hormona que está muy relacionada con la obesidad [200].

Todos estos estudios respaldan, de alguna manera, nuestros resultados, al indicar que la ventana de alimentación por el día puede promover una movilización de grasa más eficiente que por la noche, como consecuencia de su alineación con el ritmo circadiano natural del cuerpo y los procesos metabólicos. Permitiendo al organismo utilizar las reservas de grasa de forma eficiente para satisfacer las necesidades energéticas durante el ayuno nocturno [332].

Entre los puntos fuertes del estudio se encuentra que es el primero en evaluar el efecto directo del TRE sobre un patrón circadiano *ex vivo* en TA de humanos. Una de las limitaciones es que el estudio se realizó en personas con obesidad de clase 2 y 3 para asegurar una cantidad suficiente de TA para el cultivo de explantes, por lo que los resultados pueden no ser directamente transferibles a la población general. Además, el estudio sólo se realizó en TA subcutáneo y no en TA visceral. Aunque la edad, el sexo, la medicación y el cronotipo individual no influyeron significativamente en los resultados, otros estudios en poblaciones más amplias deberían probar si puede haber diferencias dependientes del sexo, la edad y el cronotipo, que fueron demasiado pequeñas para ser detectadas en el estudio actual. Además, sólo determinamos datos cada cuatro horas durante el periodo de 24 horas debido a las limitaciones en la cantidad de TA recopilada, y sólo probamos una ventana de alimentación de 4 horas, que puede ser difícil de aplicar en la sociedad actual. Deberían realizarse más estudios probando diferentes ventanas de alimentación de mayor duración para comprobar si los efectos de la TRE son similares.

Resultados y discusión en relación con el objetivo 3:

Este estudio permite analizar el efecto sobre la lipólisis de dos aspectos cruciales en la movilización de grasa: el momento circadiano y la duración del ayuno.

Podemos decir que una alimentación restringida en el tiempo moviliza en más grasa que un patrón dietético regular (con cuatro comidas diarias) (es decir, un patrón 16/8). También, nuestros resultados parecen indicar que hay diferencias en la cantidad total de glicerol liberado durante las 24 horas del día, entre eTRE y dTRE. Con una mayor liberación de glicerol durante el período nocturno en la condición temprana eTRE en comparación con la tardía dTRE. Lo que respaldaría la idea de que comer en consonancia con los ritmos circadianos, en los que puede mejorar la salud metabólica y la pérdida de peso.

Estos resultados pueden conducir a una mejor comprensión de los mecanismos implicados en estas novedosas estrategias dietéticas que utilizan la restricción horaria para la pérdida de peso. No obstante, para trasladar estas conclusiones a la práctica general, es fundamental comparar diferentes duraciones de la ventana temporal y tener en cuenta el horario habitual de comidas de los individuos y otros factores que pueden estar implicados en la eficacia de estos tratamientos, como la edad, el sexo, el cronotipo individual o factores genéticos, fisiológicos, psicológicos y ambientales, entre otros.

VI. CONCLUSIÓN

CONCLUSIÓN 1

1A. Confirmamos la existencia de ritmo circadiano exógeno en explantes de tejido adiposo humano para el gen *LIPE* y en la actividad de la lipasa sensible a hormona (LSH).

1B. El horario de comida y la duración del ayuno nocturno se asocian con la alteración del ritmo circadiano de la actividad de la LSH. En particular, el horario de cena tardío y la duración del ayuno nocturno menor de 12 horas se asocian con un aplanamiento de los ritmos (menor amplitud), lo que podría estar asociado a una menor movilización de grasa.

1C. La siesta se asocia con alteraciones en los patrones rítmicos del gen *LIPE* y de la proteína LSH. Los individuos que duermen habitualmente una siesta larga poseen un ritmo circadiano aplanado en comparación con los que no duermen siesta, lo que podría estar asociado a una menor movilización de grasa. Estos datos apoyan estudios previos de nuestro grupo que vinculan la siesta larga con la obesidad abdominal y el síndrome metabólico.

CONCLUSIÓN 2

2A. Demostramos que la sensibilidad a la insulina en explantes de tejido adiposo humano se ve reducida cuando se expone de manera simultánea al tejido adiposo a la melatonina e insulina.

2B. Este efecto es especialmente marcado cuando la concurrencia de melatonina e insulina se produce por la noche.

CONCLUSIÓN 3

3A. Confirmamos que el ayuno intermitente simulado en cultivos de tejido adiposo es capaz de movilizar mayor cantidad de grasa que un patrón dietético regular.

3B. La movilización de grasa del tejido adiposo es mayor cuando el periodo de alimentación se sitúa estrictamente en horario de mañana y no de tarde/noche.

CONCLUSIÓN GENERAL.

El tejido adiposo humano y sus ritmos circadianos se ven afectados por los hábitos de vida del individuo, en particular con la alteración de diferentes sincronizadores externos como son los horarios de comida y de sueño nocturno y diurno (la siesta), o por la duración del ayuno, lo que podría explicar en parte la asociación existente entre Cronodisrupción y Obesidad.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. OMS. *Obesity*. 2023 [cited 2023; Available from: https://www.who.int/health-topics/obesity#tab=tab_1.
2. Ralston, J.N., E.; Leach, R.J.; Hunter, J. *World Obesity Atlas 2022*. 2022; Available from: www.worldobesity.org.
3. (NIH), N.I.o.H. *Obesity*. 2023 [cited 2023; Available from: <https://www.niehs.nih.gov/health/topics/conditions/obesity/index.cfm>.
4. *La obesidad acelera su paso en España, mientras que la actividad física se estanca* in *Sociedad Española de Obesidad (SEEDO)*. 2022, SEEDO: <https://antigua.seedo.es/>.
5. Caponi, S., *Quetelet, the average man and medical knowledge*. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, 2013(20): p. 3.
6. Weir, C.B. and A. Jan, *BMI Classification Percentile And Cut Off Points*, in *StatPearls*. 2023: Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Arif Jan declares no relevant financial relationships with ineligible companies.
7. Romero-Corral, A., et al., *Accuracy of body mass index in diagnosing obesity in the adult general population*. *Int J Obes (Lond)*, 2008. **32**(6): p. 959-66.
8. Martín Moreno, V., J.B. Gómez Gandoy, and M.J. Antoranz González, *Medición de la grasa corporal mediante impedancia bioeléctrica, pliegues cutáneos y ecuaciones a partir de medidas antropométricas. Análisis comparativo %J Revista Española de Salud Pública*. 2001. **75**: p. 221-236.
9. Walpurga, A.-W., *The anthropomorphic figurines from Willendorf*. *Wissenschaftliche Mitteilungen Niederösterreichisches Landesmuseum*, 2008. **19**: p. 19-30.
10. Conard, N., *A female figurine from the basal Aurignacian of Hohle Fels Cave in southwestern Germany*. *Nature*, 2009. **459**: p. 248–252.
11. Campillo A, J., *El mono obeso: La evolución humana y las enfermedades de la opulencia: obesidad, diabetes, hipertensión, dislipemia y aterosclerosis*, ed. Booket. Vol. 5. 2010. 256.
12. FJ, P.S., *La obesidad en la historia*. Real Academia Nacional de Farmacia, 2014.
13. Haslam, D., *Weight management in obesity - past and present*. *Int J Clin Pract*, 2016. **70**(3): p. 206-17.

14. Jaacks, L.M., et al., *The obesity transition: stages of the global epidemic*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2019. **7**(3): p. 231-240.
15. Mozaffarian, D., *Perspective: Obesity-an unexplained epidemic*. Am J Clin Nutr, 2022. **115**(6): p. 1445-1450.
16. Hales, C.M., et al., *Prevalence of Obesity and Severe Obesity Among Adults: United States, 2017-2018*. NCHS Data Brief, 2020(360): p. 1-8.
17. Ryder, J.R., C.K. Fox, and A.S. Kelly, *Treatment Options for Severe Obesity in the Pediatric Population: Current Limitations and Future Opportunities*. Obesity (Silver Spring), 2018. **26**(6): p. 951-960.
18. Wang, Y.C., et al., *Severe Obesity In Adults Cost State Medicaid Programs Nearly \$8 Billion In 2013*. Health Aff (Millwood), 2015. **34**(11): p. 1923-31.
19. Drucker, D.J., *Mechanisms of Action and Therapeutic Application of Glucagon-like Peptide-1*. Cell Metab, 2018. **27**(4): p. 740-756.
20. Kershaw, E.E. and J.S. Flier, *Adipose tissue as an endocrine organ*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(6): p. 2548-56.
21. Fantuzzi, G., *Adipose tissue, adipokines, and inflammation*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(5): p. 911-9; quiz 920.
22. Makki, K., P. Froguel, and I. Wolowczuk, *Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines*. ISRN Inflamm, 2013. **2013**: p. 139239.
23. Frigolet, M.E. and R. Gutierrez-Aguilar, *The colors of adipose tissue*. Gac Med Mex, 2020. **156**(2): p. 142-149.
24. Cheng, L., et al., *Brown and beige adipose tissue: a novel therapeutic strategy for obesity and type 2 diabetes mellitus*. Adipocyte, 2021. **10**(1): p. 48-65.
25. Ibrahim, M.M., *Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences*. Obes Rev, 2010. **11**(1): p. 11-8.
26. Zhang, M., et al., *Associations of Different Adipose Tissue Depots with Insulin Resistance: A Systematic Review and Meta-analysis of Observational Studies*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 18495.
27. Fahed, G., et al., *Metabolic Syndrome: Updates on Pathophysiology and Management in 2021*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(2).

28. Chait, A. and L.J. den Hartigh, *Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease*. *Front Cardiovasc Med*, 2020. **7**: p. 22.
29. Amato, M.C., et al., *Visceral Adiposity Index: a reliable indicator of visceral fat function associated with cardiometabolic risk*. *Diabetes Care*, 2010. **33**(4): p. 920-2.
30. Expert Panel on Detection, E. and A. Treatment of High Blood Cholesterol in, *Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III)*. *JAMA*, 2001. **285**(19): p. 2486-97.
31. Arner, P., *Fat Tissue Growth and Development in Humans*. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser*, 2018. **89**: p. 37-45.
32. Roche, A.F., *The adipocyte-number hypothesis*. *Child Dev*, 1981. **52**(1): p. 31-43.
33. Spalding, K.L., et al., *Dynamics of fat cell turnover in humans*. *Nature*, 2008. **453**(7196): p. 783-7.
34. Vishvanath, L. and R.K. Gupta, *Contribution of adipogenesis to healthy adipose tissue expansion in obesity*. *J Clin Invest*, 2019. **129**(10): p. 4022-4031.
35. McLaughlin, T., et al., *Adipose Cell Size and Regional Fat Deposition as Predictors of Metabolic Response to Overfeeding in Insulin-Resistant and Insulin-Sensitive Humans*. *Diabetes*, 2016. **65**(5): p. 1245-54.
36. Salans, L.B., S.W. Cushman, and R.E. Weismann, *Studies of human adipose tissue. Adipose cell size and number in nonobese and obese patients*. *J Clin Invest*, 1973. **52**(4): p. 929-41.
37. Acosta, J.R., et al., *Increased fat cell size: a major phenotype of subcutaneous white adipose tissue in non-obese individuals with type 2 diabetes*. *Diabetologia*, 2016. **59**(3): p. 560-70.
38. Virtue, S. and A. Vidal-Puig, *Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1801**(3): p. 338-49.
39. Laurencikiene, J., et al., *Regulation of lipolysis in small and large fat cells of the same subject*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011. **96**(12): p. E2045-9.

40. Misra, A. and N.K. Vikram, *Clinical and pathophysiological consequences of abdominal adiposity and abdominal adipose tissue depots*. Nutrition, 2003. **19**(5): p. 457-66.
41. Harman-Boehm, I., et al., *Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(6): p. 2240-7.
42. Fried, S.K., D.A. Bunkin, and A.S. Greenberg, *Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(3): p. 847-50.
43. Fain, J.N., et al., *Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans*. Endocrinology, 2004. **145**(5): p. 2273-82.
44. Tchkonina, T., et al., *Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities*. J Clin Invest, 2013. **123**(3): p. 966-72.
45. Fontana, L., et al., *Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans*. Diabetes, 2007. **56**(4): p. 1010-3.
46. Alves-Bezerra, M. and D.E. Cohen, *Triglyceride Metabolism in the Liver*. Compr Physiol, 2017. **8**(1): p. 1-8.
47. Castro-Barquero, S., et al., *Loss of Visceral Fat is Associated with a Reduction in Inflammatory Status in Patients with Metabolic Syndrome*. Mol Nutr Food Res, 2023. **67**(4): p. e2200264.
48. Yang, A. and E.P. Mottillo, *Adipocyte lipolysis: from molecular mechanisms of regulation to disease and therapeutics*. Biochem J, 2020. **477**(5): p. 985-1008.
49. Ahmadian, M., Y. Wang, and H.S. Sul, *Lipolysis in adipocytes*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(5): p. 555-9.
50. Zechner, R., et al., *FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling*. Cell Metab, 2012. **15**(3): p. 279-91.

51. Nielsen, T.S., et al., *Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease*. J Mol Endocrinol, 2014. **52**(3): p. R199-222.
52. Bolsoni-Lopes, A. and M.I. Alonso-Vale, *Lipolysis and lipases in white adipose tissue - An update*. Arch Endocrinol Metab, 2015. **59**(4): p. 335-42.
53. Fruhbeck, G., et al., *Regulation of adipocyte lipolysis*. Nutr Res Rev, 2014. **27**(1): p. 63-93.
54. Kulyte, A., et al., *Genome-wide association study of adipocyte lipolysis in the GENetics of adipocyte lipolysis (GENiAL) cohort*. Mol Metab, 2020. **34**: p. 85-96.
55. Bezaire, V., et al., *Contribution of adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase to lipolysis in hMADS adipocytes*. J Biol Chem, 2009. **284**(27): p. 18282-91.
56. Haemmerle, G., et al., *Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis*. J Biol Chem, 2002. **277**(7): p. 4806-15.
57. Zhang, S., et al., *Signalling entrains the peripheral circadian clock*. Cell Signal, 2020. **69**: p. 109433.
58. Ince, L.M., *Introduction to biological rhythms: A brief history of chronobiology and its relevance to parasite immunology*. Parasite Immunol, 2022. **44**(3): p. e12905.
59. Erren, T.C., et al., *Chronodisruption and cancer*. Naturwissenschaften, 2008. **95**(5): p. 367-82.
60. Erren, T.C. and R.J. Reiter, *Defining chronodisruption*. J Pineal Res, 2009. **46**(3): p. 245-7.
61. Boivin, D.B., P. Boudreau, and A. Kosmadopoulos, *Disturbance of the Circadian System in Shift Work and Its Health Impact*. J Biol Rhythms, 2022. **37**(1): p. 3-28.
62. Wittmann, M., et al., *Social jetlag: misalignment of biological and social time*. Chronobiol Int, 2006. **23**(1-2): p. 497-509.
63. Arab, A., et al., *Social jetlag and obesity: A systematic review and meta-analysis*. Obes Rev, 2023.

64. Vera, B., et al., *Modifiable lifestyle behaviors, but not a genetic risk score, associate with metabolic syndrome in evening chronotypes*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 945.
65. Samblas, M., et al., *Methylation on the Circadian Gene BMAL1 Is Associated with the Effects of a Weight Loss Intervention on Serum Lipid Levels*. J Biol Rhythms, 2016. **31**(3): p. 308-17.
66. Milagro, F.I., et al., *CLOCK, PER2 and BMAL1 DNA methylation: association with obesity and metabolic syndrome characteristics and monounsaturated fat intake*. Chronobiol Int, 2012. **29**(9): p. 1180-94.
67. Garaulet, M., et al., *CLOCK genetic variation and metabolic syndrome risk: modulation by monounsaturated fatty acids*. Am J Clin Nutr, 2009. **90**(6): p. 1466-75.
68. Liu, X.Y., et al., *Nighttime snacking is associated with risk of obesity and hyperglycemia in adults: a cross-sectional survey from Chinese adult teachers*. J Biomed Res, 2017. **31**(6): p. 541-7.
69. Baron, K.G., et al., *Circadian timing and alignment in healthy adults: associations with BMI, body fat, caloric intake and physical activity*. Int J Obes (Lond), 2017. **41**(2): p. 203-209.
70. Garcia-Rios, A. and J.M. Ordovas, *Chronodisruption and cardiovascular disease*. Clin Investig Arterioscler, 2022. **34** Suppl 1: p. S32-S37.
71. Ortiz-Tudela, E., et al., *[Chronodisruption and ageing]*. Rev Esp Geriatr Gerontol, 2012. **47**(4): p. 168-73.
72. Gomez-Abellan, P., et al., *[Chronobiological aspects of obesity and metabolic syndrome]*. Endocrinol Nutr, 2012. **59**(1): p. 50-61.
73. De Mairan, J.-J., *Observation botanique*. Histoire de l'Académie royale des sciences avec les mémoires de mathématique et de physique tirés des registres de cette Académie, 1729. **35**.
74. Pittendrigh, C.S. and D.H. Minis, *Circadian systems: longevity as a function of circadian resonance in Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1972. **69**(6): p. 1537-9.
75. Daan, S. and J. Aschoff, *Circadian rhythms of locomotor activity in captive birds and mammals: Their variations with season and latitude*. Oecologia, 1975. **18**(4): p. 269-316.

76. Edery, I., et al., *Temporal phosphorylation of the Drosophila period protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(6): p. 2260-4.
77. Garaulet, M. and P. Gomez-Abellan, *Chronobiology and obesity*. Nutr Hosp, 2013. **28 Suppl 5**: p. 114-20.
78. Herbert, J., *The Suprachiasmatic Nucleus. The Mind's Clock*. Journal of Anatomy, 1994. **184**(431).
79. Mosko, S.S. and R.Y. Moore, *Neonatal suprachiasmatic nucleus lesions: effects on the development of circadian rhythms in the rat*. Brain Res, 1979. **164**: p. 17-38.
80. Ralph, M.R., et al., *Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period*. Science, 1990. **247**(4945): p. 975-8.
81. Reid, K.J., *Assessment of Circadian Rhythms*. Neurol Clin, 2019. **37**(3): p. 505-526.
82. Challet, E. and P. Pevet, *Interactions between photic and nonphotic stimuli to synchronize the master circadian clock in mammals*. Front Biosci, 2003. **8**: p. s246-57.
83. Laothamatas, I., et al., *Metabolic and chemical architecture of the mammalian circadian clock*. Cell Chem Biol, 2023.
84. Huang, N., et al., *Crystal structure of the heterodimeric CLOCK:BMAL1 transcriptional activator complex*. Science, 2012. **337**(6091): p. 189-94.
85. Partch, C.L., C.B. Green, and J.S. Takahashi, *Molecular architecture of the mammalian circadian clock*. Trends Cell Biol, 2014. **24**(2): p. 90-9.
86. Bozek, K., et al., *Regulation of clock-controlled genes in mammals*. PLoS One, 2009. **4**(3): p. e4882.
87. Mure, L.S., et al., *Diurnal transcriptome atlas of a primate across major neural and peripheral tissues*. Science, 2018. **359**(6381).
88. Roenneberg, T. and M. Merrow, *The Circadian Clock and Human Health*. Curr Biol, 2016. **26**(10): p. R432-43.
89. Balsalobre, A., et al., *Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling*. Science, 2000. **289**(5488): p. 2344-7.
90. Muhlbauer, E., et al., *Indication of circadian oscillations in the rat pancreas*. FEBS Lett, 2004. **564**(1-2): p. 91-6.
91. Zvonic, S., et al., *Characterization of peripheral circadian clocks in adipose tissues*. Diabetes, 2006. **55**(4): p. 962-70.

92. Schibler, U., et al., *Clock-Talk: Interactions between Central and Peripheral Circadian Oscillators in Mammals*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2015. **80**: p. 223-32.
93. Gomez-Abellan, P., et al., *Circadian expression of adiponectin and its receptors in human adipose tissue*. Endocrinology, 2010. **151**(1): p. 115-22.
94. Gomez Abellan, P., et al., *Site-specific circadian expression of leptin and its receptor in human adipose tissue*. Nutr Hosp, 2011. **26**(6): p. 1394-401.
95. Gomez-Santos, C., et al., *Circadian rhythm of clock genes in human adipose explants*. Obesity (Silver Spring), 2009. **17**(8): p. 1481-5.
96. Summa, K.C. and F.W. Turek, *Chronobiology and obesity: Interactions between circadian rhythms and energy regulation*. Adv Nutr, 2014. **5**(3): p. 312S-9S.
97. Laermans, J. and I. Depoortere, *Chronobesity: role of the circadian system in the obesity epidemic*. Obes Rev, 2016. **17**(2): p. 108-25.
98. Turek, F.W., et al., *Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice*. Science, 2005. **308**(5724): p. 1043-5.
99. Qian, J., et al., *Differential effects of the circadian system and circadian misalignment on insulin sensitivity and insulin secretion in humans*. Diabetes Obes Metab, 2018. **20**(10): p. 2481-2485.
100. Marcheva, B., et al., *Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes*. Nature, 2010. **466**(7306): p. 627-31.
101. Lee, J., et al., *Loss of Bmal1 leads to uncoupling and impaired glucose-stimulated insulin secretion in beta-cells*. Islets, 2011. **3**(6): p. 381-8.
102. Perelis, M., et al., *Pancreatic beta cell enhancers regulate rhythmic transcription of genes controlling insulin secretion*. Science, 2015. **350**(6261): p. aac4250.
103. Ando, H., et al., *Rhythmic messenger ribonucleic acid expression of clock genes and adipocytokines in mouse visceral adipose tissue*. Endocrinology, 2005. **146**(12): p. 5631-6.
104. Schabler, S., et al., *Loss of function in the Drosophila clock gene period results in altered intermediary lipid metabolism and increased susceptibility to starvation*. Cell Mol Life Sci, 2020. **77**(23): p. 4939-4956.

105. Tahira, K., et al., *Obesity alters the expression profile of clock genes in peripheral blood mononuclear cells*. Arch Med Sci, 2011. **7**(6): p. 933-40.
106. Wang, S., et al., *PPAR-gamma integrates obesity and adipocyte clock through epigenetic regulation of Bmal1*. Theranostics, 2022. **12**(4): p. 1589-1606.
107. Nedeltcheva, A.V. and F.A. Scheer, *Metabolic effects of sleep disruption, links to obesity and diabetes*. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2014. **21**(4): p. 293-8.
108. Touitou, Y., A. Reinberg, and D. Touitou, *Association between light at night, melatonin secretion, sleep deprivation, and the internal clock: Health impacts and mechanisms of circadian disruption*. Life Sci, 2017. **173**: p. 94-106.
109. Shea, S.A., et al., *Independent circadian and sleep/wake regulation of adipokines and glucose in humans*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(5): p. 2537-44.
110. Gomez-Abellan, P., et al., *Clock genes are implicated in the human metabolic syndrome*. Int J Obes (Lond), 2008. **32**(1): p. 121-8.
111. Hernandez-Morante, J.J., et al., *Expression of cortisol metabolism-related genes shows circadian rhythmic patterns in human adipose tissue*. Int J Obes (Lond), 2009. **33**(4): p. 473-80.
112. Gomez-Abellan, P., et al., *Glucocorticoids affect 24 h clock genes expression in human adipose tissue explant cultures*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e50435.
113. Garaulet, M., et al., *An approximation to the temporal order in endogenous circadian rhythms of genes implicated in human adipose tissue metabolism*. J Cell Physiol, 2011. **226**(8): p. 2075-80.
114. da Silva Rosa, S.C., et al., *Mechanisms of muscle insulin resistance and the cross-talk with liver and adipose tissue*. Physiol Rep, 2020. **8**(19): p. e14607.
115. Carrasco-Benso, M.P., et al., *Human adipose tissue expresses intrinsic circadian rhythm in insulin sensitivity*. FASEB J, 2016. **30**(9): p. 3117-23.
116. Xu, Y., et al., *Rest-activity circadian rhythm and impaired glucose tolerance in adults: an analysis of NHANES 2011-2014*. BMJ Open Diabetes Res Care, 2022. **10**(2).

117. Jamshed, H., et al., *Early Time-Restricted Feeding Improves 24-Hour Glucose Levels and Affects Markers of the Circadian Clock, Aging, and Autophagy in Humans*. *Nutrients*, 2019. **11**(6).
118. Morris, C.J., et al., *Endogenous circadian system and circadian misalignment impact glucose tolerance via separate mechanisms in humans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(17): p. E2225-34.
119. Cornelissen, G., *Cosinor-based rhythmometry*. *Theor Biol Med Model*, 2014. **11**: p. 16.
120. Pot, G.K., *Sleep and dietary habits in the urban environment: the role of chrono-nutrition*. *Proc Nutr Soc*, 2018. **77**(3): p. 189-198.
121. Watanabe, T., et al., *Long Working Hours Indirectly Affect Psychosomatic Stress Responses via Complete Mediation by Irregular Mealtimes and Shortened Sleep Duration: A Cross-Sectional Study*. *Int J Environ Res Public Health*, 2022. **19**(11).
122. Vetter, C., et al., *Night Shift Work, Genetic Risk, and Type 2 Diabetes in the UK Biobank*. *Diabetes Care*, 2018. **41**(4): p. 762-769.
123. Wei, T., et al., *Association between night-shift work and level of melatonin: systematic review and meta-analysis*. *Sleep Med*, 2020. **75**: p. 502-509.
124. Heyde, I. and H. Oster, *Differentiating external zeitgeber impact on peripheral circadian clock resetting*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 20114.
125. Gallo Marin, B., et al., *Predictors of COVID-19 severity: A literature review*. *Rev Med Virol*, 2021. **31**(1): p. 1-10.
126. Zeigler, Z., *COVID-19 Self-quarantine and Weight Gain Risk Factors in Adults*. *Curr Obes Rep*, 2021. **10**(3): p. 423-433.
127. Baquerizo-Sedano, L., et al., *Anti-COVID-19 measures threaten our healthy body weight: Changes in sleep and external synchronizers of circadian clocks during confinement*. *Clin Nutr*, 2022. **41**(12): p. 2988-2995.
128. Pardini, L. and B. Kaeffer, *Feeding and circadian clocks*. *Reprod Nutr Dev*, 2006. **46**(5): p. 463-80.
129. Budai, Z., L. Balogh, and Z. Sarang, *Short-term high-fat meal intake alters the expression of circadian clock-, inflammation-, and oxidative stress-related genes in human skeletal muscle*. *Int J Food Sci Nutr*, 2019. **70**(6): p. 749-758.

130. Barnea, M., Z. Madar, and O. Froy, *High-fat diet delays and fasting advances the circadian expression of adiponectin signaling components in mouse liver*. *Endocrinology*, 2009. **150**(1): p. 161-8.
131. Miranda, J., et al., *Effects of resveratrol on changes induced by high-fat feeding on clock genes in rats*. *Br J Nutr*, 2013. **110**(8): p. 1421-8.
132. Wehrens, S.M.T., et al., *Meal Timing Regulates the Human Circadian System*. *Curr Biol*, 2017. **27**(12): p. 1768-1775 e3.
133. Jakubowicz, D., et al., *Influence of Fasting until Noon (Extended Postabsorptive State) on Clock Gene mRNA Expression and Regulation of Body Weight and Glucose Metabolism*. *Int J Mol Sci*, 2023. **24**(8).
134. Damiola, F., et al., *Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus*. *Genes Dev*, 2000. **14**(23): p. 2950-61.
135. Hara, R., et al., *Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus*. *Genes Cells*, 2001. **6**(3): p. 269-78.
136. Stokkan, K.A., et al., *Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding*. *Science*, 2001. **291**(5503): p. 490-3.
137. Rudic, R.D., et al., *BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis*. *PLoS Biol*, 2004. **2**(11): p. e377.
138. Ando, H., et al., *Impairment of peripheral circadian clocks precedes metabolic abnormalities in ob/ob mice*. *Endocrinology*, 2011. **152**(4): p. 1347-54.
139. Ho, A. and A. Chin, *Circadian feeding and drinking patterns of genetically obese mice fed solid chow diet*. *Physiol Behav*, 1988. **43**(5): p. 651-6.
140. Mendoza, J., P. Pevet, and E. Challet, *High-fat feeding alters the clock synchronization to light*. *J Physiol*, 2008. **586**(24): p. 5901-10.
141. Zarrinpar, A., A. Chaix, and S. Panda, *Daily Eating Patterns and Their Impact on Health and Disease*. *Trends Endocrinol Metab*, 2016. **27**(2): p. 69-83.
142. Depner, C.M., et al., *Mistimed food intake and sleep alters 24-hour time-of-day patterns of the human plasma proteome*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018. **115**(23): p. E5390-E5399.

143. Wang, F., et al., *Meta-analysis on night shift work and risk of metabolic syndrome*. *Obes Rev*, 2014. **15**(9): p. 709-20.
144. Brum, M.C., et al., *Shift work and its association with metabolic disorders*. *Diabetol Metab Syndr*, 2015. **7**: p. 45.
145. Garaulet, M., et al., *Timing of food intake predicts weight loss effectiveness*. *Int J Obes (Lond)*, 2013. **37**(4): p. 604-11.
146. Bandin, C., et al., *Meal timing affects glucose tolerance, substrate oxidation and circadian-related variables: A randomized, crossover trial*. *Int J Obes (Lond)*, 2015. **39**(5): p. 828-33.
147. Collado, M.C., et al., *Timing of food intake impacts daily rhythms of human salivary microbiota: a randomized, crossover study*. *FASEB J*, 2018. **32**(4): p. 2060-2072.
148. Bandin, C., et al., *Circadian rhythmicity as a predictor of weight-loss effectiveness*. *Int J Obes (Lond)*, 2014. **38**(8): p. 1083-8.
149. Attina, A., et al., *Fasting: How to Guide*. *Nutrients*, 2021. **13**(5).
150. Regmi, P. and L.K. Heilbronn, *Time-Restricted Eating: Benefits, Mechanisms, and Challenges in Translation*. *iScience*, 2020. **23**(6): p. 101161.
151. Varady, K.A., et al., *Clinical application of intermittent fasting for weight loss: progress and future directions*. *Nat Rev Endocrinol*, 2022. **18**(5): p. 309-321.
152. Gill, S., et al., *Time-restricted feeding attenuates age-related cardiac decline in *Drosophila**. *Science*, 2015. **347**(6227): p. 1265-9.
153. Bray, M.S., et al., *Quantitative analysis of light-phase restricted feeding reveals metabolic dyssynchrony in mice*. *Int J Obes (Lond)*, 2013. **37**(6): p. 843-52.
154. de Goede, P., et al., *Time-Restricted Feeding Improves Glucose Tolerance in Rats, but Only When in Line With the Circadian Timing System*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2019. **10**: p. 554.
155. Regmi, P., et al., *Early or delayed time-restricted feeding prevents metabolic impact of obesity in mice*. *J Endocrinol*, 2021. **248**(1): p. 75-86.
156. Prasad, M., et al., *A Smartphone Intervention to Promote Time Restricted Eating Reduces Body Weight and Blood Pressure in Adults with Overweight and Obesity: A Pilot Study*. *Nutrients*, 2021. **13**(7).

157. Steger, F.L., et al., *Early time-restricted eating affects weight, metabolic health, mood, and sleep in adherent completers: A secondary analysis*. Obesity (Silver Spring), 2023. **31 Suppl 1**(Suppl 1): p. 96-107.
158. Sutton, E.F., et al., *Early Time-Restricted Feeding Improves Insulin Sensitivity, Blood Pressure, and Oxidative Stress Even without Weight Loss in Men with Prediabetes*. Cell Metab, 2018. **27**(6): p. 1212-1221 e3.
159. Jamshed, H., et al., *Effectiveness of Early Time-Restricted Eating for Weight Loss, Fat Loss, and Cardiometabolic Health in Adults With Obesity: A Randomized Clinical Trial*. JAMA Intern Med, 2022. **182**(9): p. 953-962.
160. Hutchison, A.T., et al., *Time-Restricted Feeding Improves Glucose Tolerance in Men at Risk for Type 2 Diabetes: A Randomized Crossover Trial*. Obesity (Silver Spring), 2019. **27**(5): p. 724-732.
161. Tacad, D.K.M., et al., *Satiety Associated with Calorie Restriction and Time-Restricted Feeding: Peripheral Hormones*. Adv Nutr, 2022. **13**(3): p. 792-820.
162. Cienfuegos, S., et al., *Effects of 4- and 6-h Time-Restricted Feeding on Weight and Cardiometabolic Health: A Randomized Controlled Trial in Adults with Obesity*. Cell Metab, 2020. **32**(3): p. 366-378 e3.
163. Gabel, K., et al., *Effects of 8-hour time restricted feeding on body weight and metabolic disease risk factors in obese adults: A pilot study*. Nutr Healthy Aging, 2018. **4**(4): p. 345-353.
164. Lopez-Minguez, J., P. Gomez-Abellan, and M. Garaulet, *Timing of Breakfast, Lunch, and Dinner. Effects on Obesity and Metabolic Risk*. Nutrients, 2019. **11**(11).
165. Saulle, R., et al., *Shift work, overweight and obesity in health professionals: a systematic review and meta-analysis*. Clin Ter, 2018. **169**(4): p. e189-e197.
166. Chellappa, S.L., et al., *Daytime eating prevents internal circadian misalignment and glucose intolerance in night work*. Sci Adv, 2021. **7**(49): p. eabg9910.
167. Tan, D.X., et al., *On the significance of an alternate pathway of melatonin synthesis via 5-methoxytryptamine: comparisons across species*. J Pineal Res, 2016. **61**(1): p. 27-40.

168. Amaral, F.G.D. and J. Cipolla-Neto, *A brief review about melatonin, a pineal hormone*. Arch Endocrinol Metab, 2018. **62**(4): p. 472-479.
169. Arendt, J., *Melatonin: Countering Chaotic Time Cues*. Front Endocrinol (Lausanne), 2019. **10**: p. 391.
170. Phillips, A.J.K., et al., *Irregular sleep/wake patterns are associated with poorer academic performance and delayed circadian and sleep/wake timing*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 3216.
171. Cipolla-Neto, J. and F.G.D. Amaral, *Melatonin as a Hormone: New Physiological and Clinical Insights*. Endocr Rev, 2018. **39**(6): p. 990-1028.
172. von Gall, C., J.H. Stehle, and D.R. Weaver, *Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction*. Cell Tissue Res, 2002. **309**(1): p. 151-62.
173. Jockers, R., et al., *Update on melatonin receptors: IUPHAR Review 20*. Br J Pharmacol, 2016. **173**(18): p. 2702-25.
174. Ekmekcioglu, C., *Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance*. Biomed Pharmacother, 2006. **60**(3): p. 97-108.
175. Shilo, L., et al., *The effects of coffee consumption on sleep and melatonin secretion*. Sleep Med, 2002. **3**(3): p. 271-3.
176. Cardinali, D.P. and P. Pevet, *Basic aspects of melatonin action*. Sleep Med Rev, 1998. **2**(3): p. 175-90.
177. Vasey, C., J. McBride, and K. Penta, *Circadian Rhythm Dysregulation and Restoration: The Role of Melatonin*. Nutrients, 2021. **13**(10).
178. Redlin, U., *Neural basis and biological function of masking by light in mammals: suppression of melatonin and locomotor activity*. Chronobiol Int, 2001. **18**(5): p. 737-58.
179. Li, J., et al., *Trends in Use of Melatonin Supplements Among US Adults, 1999-2018*. JAMA, 2022. **327**(5): p. 483-485.
180. Richter, J. *El consumo de melatonina ha aumentado en España desde el confinamiento*. 2021; Available from: https://www.cope.es/actualidad/sociedad/noticias/consumo-melatonina-aumentado-espana-desde-confinamiento-20210720_1410291.
181. Claustrat, B. and J. Leston, *Melatonin: Physiological effects in humans*. Neurochirurgie, 2015. **61**(2-3): p. 77-84.

182. Bartness, T.J., G.E. Demas, and C.K. Song, *Seasonal changes in adiposity: the roles of the photoperiod, melatonin and other hormones, and sympathetic nervous system*. *Exp Biol Med* (Maywood), 2002. **227**(6): p. 363-76.
183. Rasmussen, D.D., et al., *Daily melatonin administration at middle age suppresses male rat visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels*. *Endocrinology*, 1999. **140**(2): p. 1009-12.
184. Carey, D.G., et al., *Abdominal fat and insulin resistance in normal and overweight women: Direct measurements reveal a strong relationship in subjects at both low and high risk of NIDDM*. *Diabetes*, 1996. **45**(5): p. 633-8.
185. Brydon, L., et al., *Functional expression of MT2 (Mel1b) melatonin receptors in human PAZ6 adipocytes*. *Endocrinology*, 2001. **142**(10): p. 4264-71.
186. Tordjman, S., et al., *Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits*. *Curr Neuropharmacol*, 2017. **15**(3): p. 434-443.
187. Garaulet, M., et al., *Melatonin Effects on Glucose Metabolism: Time To Unlock the Controversy*. *Trends Endocrinol Metab*, 2020. **31**(3): p. 192-204.
188. Garaulet, M., et al., *Short sleep duration is associated with increased obesity markers in European adolescents: effect of physical activity and dietary habits. The HELENA study*. *Int J Obes (Lond)*, 2011. **35**(10): p. 1308-17.
189. Van Cauter, E., et al., *Metabolic consequences of sleep and sleep loss*. *Sleep Med*, 2008. **9 Suppl 1**(0 1): p. S23-8.
190. Gradisar, M., et al., *The sleep and technology use of Americans: findings from the National Sleep Foundation's 2011 Sleep in America poll*. *J Clin Sleep Med*, 2013. **9**(12): p. 1291-9.
191. FUNDADEPS. *Estudio sobre Salud y Descanso*. 2009; Available from: <https://fundadeps.org/recursos/estudio-sobre-salud-y-descanso/>.
192. Vgontzas, A.N., et al., *Daytime napping after a night of sleep loss decreases sleepiness, improves performance, and causes beneficial changes in cortisol and interleukin-6 secretion*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007. **292**(1): p. E253-61.

193. Hartzler, B.M., *Fatigue on the flight deck: the consequences of sleep loss and the benefits of napping*. *Accid Anal Prev*, 2014. **62**: p. 309-18.
194. Hayashi, M., N. Motoyoshi, and T. Hori, *Recuperative power of a short daytime nap with or without stage 2 sleep*. *Sleep*, 2005. **28**(7): p. 829-36.
195. Samel, A. and H.M. Wegmann, *Sleep and circadian rhythms of an airline pilot operating on the polar route: a case study*. *Aviat Space Environ Med*, 1988. **59**(5): p. 443-7.
196. Samel, A., et al., *Sleep patterns in aircrew operating on the polar route between Germany and east Asia*. *Aviat Space Environ Med*, 1991. **62**(7): p. 661-9.
197. Chaput, J.P., et al., *The role of insufficient sleep and circadian misalignment in obesity*. *Nat Rev Endocrinol*, 2023. **19**(2): p. 82-97.
198. Mograss, M., et al., *The effects of napping on night-time sleep in healthy young adults*. *J Sleep Res*, 2022. **31**(5): p. e13578.
199. Devine, J.K. and J.M. Wolf, *Determinants of cortisol awakening responses to naps and nighttime sleep*. *Psychoneuroendocrinology*, 2016. **63**: p. 128-34.
200. Bjorntorp, P. and R. Rosmond, *Obesity and cortisol*. *Nutrition*, 2000. **16**(10): p. 924-36.
201. Salehi, M., A. Ferenczi, and B. Zumoff, *Obesity and cortisol status*. *Horm Metab Res*, 2005. **37**(4): p. 193-7.
202. Shi, S.Q., et al., *Circadian disruption leads to insulin resistance and obesity*. *Curr Biol*, 2013. **23**(5): p. 372-81.
203. Zwick, R.K., et al., *Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue*. *Cell Metab*, 2018. **27**(1): p. 68-83.
204. Haslam, D. and N. Rigby, *A long look at obesity*. *Lancet*, 2010. **376**(9735): p. 85-6.
205. Quesada, L.R., CL.; Betancourt, J.; Nicolau, E., *Elementos teóricos y prácticos sobre la bioimpedancia eléctrica en salud*. *SciELO Revista Archivo Médico de Camagüey*, 2016. **20**.
206. Lean, M.E., T.S. Han, and C.E. Morrison, *Waist circumference as a measure for indicating need for weight management*. *BMJ*, 1995. **311**(6998): p. 158-61.

-
207. Garaulet, M., et al., *Two-dimensional predictive equation to classify visceral obesity in clinical practice*. Obesity (Silver Spring), 2006. **14**(7): p. 1181-91.
208. [SEEDO'2000 consensus for the evaluation of overweight and obesity and the establishment of criteria for therapeutic intervention. Sociedad Espanola para el Estudio de la Obesidad]. Med Clin (Barc), 2000. **115**(15): p. 587-97.
209. ADN, B.N.d. VALIDACIÓN EXTERNA DE LOS MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE ÁCIDOS NUCLEICOS. Available from: <https://www.bancoadn.org/control-de-calidad.html>.
210. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
211. Fundel, K., et al., *Normalization strategies for mRNA expression data in cartilage research*. Osteoarthritis Cartilage, 2008. **16**(8): p. 947-55.
212. Krintel, C., et al., *Ser649 and Ser650 are the major determinants of protein kinase A-mediated activation of human hormone-sensitive lipase against lipid substrates*. PLoS One, 2008. **3**(11): p. e3756.
213. Halberg, F. and G.S. Katinas, *Chronobiologic glossary of the International Society for the Study of Biologic Rhythms*. Int J Chronobiol, 1973. **1**(1): p. 31-63.
214. Hughes, M.E., et al., *Guidelines for Genome-Scale Analysis of Biological Rhythms*. J Biol Rhythms, 2017. **32**(5): p. 380-393.
215. Alberti, K.G., et al., *The metabolic syndrome--a new worldwide definition*. Lancet, 2005. **366**(9491): p. 1059-62.
216. Verboven, K., et al., *Abdominal subcutaneous and visceral adipocyte size, lipolysis and inflammation relate to insulin resistance in male obese humans*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 4677.
217. Fredrikson, G., H. Tornqvist, and P. Belfrage, *Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol*. Biochim Biophys Acta, 1986. **876**(2): p. 288-93.

218. Contreras, J.A., et al., *Human hormone-sensitive lipase: expression and large-scale purification from a baculovirus/insect cell system*. Protein Expr Purif, 1998. **12**(1): p. 93-9.
219. Hagstrom-Toft, E., et al., *A circadian rhythm in lipid mobilization which is altered in IDDM*. Diabetologia, 1997. **40**(9): p. 1070-8.
220. Longo, V.D. and S. Panda, *Fasting, Circadian Rhythms, and Time-Restricted Feeding in Healthy Lifespan*. Cell Metab, 2016. **23**(6): p. 1048-1059.
221. Shostak, A., J. Meyer-Kovac, and H. Oster, *Circadian regulation of lipid mobilization in white adipose tissues*. Diabetes, 2013. **62**(7): p. 2195-203.
222. Steinberg, D., et al., *Hormonal regulation of lipase, phosphorylase, and glycogen synthase in adipose tissue*. Adv Cyclic Nucleotide Res, 1975. **5**: p. 549-68.
223. Khoo, J.C., et al., *Hormonal regulation of adipocyte enzymes. The effects of epinephrine and insulin on the control of lipase, phosphorylase kinase, phosphorylase, and glycogen synthase*. J Biol Chem, 1973. **248**(11): p. 3823-30.
224. Wilkinson, M.J., et al., *Ten-Hour Time-Restricted Eating Reduces Weight, Blood Pressure, and Atherogenic Lipids in Patients with Metabolic Syndrome*. Cell Metab, 2020. **31**(1): p. 92-104 e5.
225. Xiao, Q., M. Garaulet, and F. Scheer, *Meal timing and obesity: interactions with macronutrient intake and chronotype*. Int J Obes (Lond), 2019. **43**(9): p. 1701-1711.
226. Yoshida, J., et al., *Association of night eating habits with metabolic syndrome and its components: a longitudinal study*. BMC Public Health, 2018. **18**(1): p. 1366.
227. Chen, H.J., et al., *Energy intake at different times of the day: Its association with elevated total and LDL cholesterol levels*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2019. **29**(4): p. 390-397.
228. Nakajima, K. and K. Suwa, *Association of hyperglycemia in a general Japanese population with late-night-dinner eating alone, but not breakfast skipping alone*. J Diabetes Metab Disord, 2015. **14**: p. 16.

-
229. Lopez-Minguez, J., et al., *Late dinner impairs glucose tolerance in MTNR1B risk allele carriers: A randomized, cross-over study*. Clin Nutr, 2018. **37**(4): p. 1133-1140.
230. Kutsuma, A., K. Nakajima, and K. Suwa, *Potential Association between Breakfast Skipping and Concomitant Late-Night-Dinner Eating with Metabolic Syndrome and Proteinuria in the Japanese Population*. Scientifica (Cairo), 2014. **2014**: p. 253581.
231. Berg, C., et al., *Eating patterns and portion size associated with obesity in a Swedish population*. Appetite, 2009. **52**(1): p. 21-6.
232. Lipke, K., A. Kubis-Kubiak, and A. Piwowar, *Molecular Mechanism of Lipotoxicity as an Interesting Aspect in the Development of Pathological States-Current View of Knowledge*. Cells, 2022. **11**(5).
233. Ruiz-Lozano, T., et al., *Timing of food intake is associated with weight loss evolution in severe obese patients after bariatric surgery*. Clin Nutr, 2016. **35**(6): p. 1308-1314.
234. Fuller, P.M., J.J. Gooley, and C.B. Saper, *Neurobiology of the sleep-wake cycle: sleep architecture, circadian regulation, and regulatory feedback*. J Biol Rhythms, 2006. **21**(6): p. 482-93.
235. Theorell-Haglow, J., et al., *Both habitual short sleepers and long sleepers are at greater risk of obesity: a population-based 10-year follow-up in women*. Sleep Med, 2014. **15**(10): p. 1204-11.
236. Kobayashi, D., et al., *Association between weight gain, obesity, and sleep duration: a large-scale 3-year cohort study*. Sleep Breath, 2012. **16**(3): p. 829-33.
237. Lopez-Garcia, E., et al., *Sleep duration, general and abdominal obesity, and weight change among the older adult population of Spain*. Am J Clin Nutr, 2008. **87**(2): p. 310-6.
238. Antonenko, D., et al., *Napping to renew learning capacity: enhanced encoding after stimulation of sleep slow oscillations*. Eur J Neurosci, 2013. **37**(7): p. 1142-51.
239. Vizmanos, B., et al., *Lifestyle mediators of associations among siestas, obesity, and metabolic health*. Obesity (Silver Spring), 2023. **31**(5): p. 1227-1239.

240. Wang, L., et al., *Associations of Daytime Napping with Incident Cardiovascular Diseases and Hypertension in Chinese Adults: A Nationwide Cohort Study*. Biomed Environ Sci, 2022. **35**(1): p. 22-34.
241. He, J., et al., *Association of Nap Duration after Lunch with Prevalence of Metabolic Syndrome in a Chinese Government Employee Population*. Int J Environ Res Public Health, 2020. **17**(12).
242. Cao, Z., et al., *The effects of midday nap duration on the risk of hypertension in a middle-aged and older Chinese population: a preliminary evidence from the Tongji-Dongfeng Cohort Study, China*. J Hypertens, 2014. **32**(10): p. 1993-8; discussion 1998.
243. Guo, V.Y., et al., *The association between daytime napping and risk of diabetes: a systematic review and meta-analysis of observational studies*. Sleep Med, 2017. **37**: p. 105-112.
244. Yamada, T., et al., *J-curve relation between daytime nap duration and type 2 diabetes or metabolic syndrome: A dose-response meta-analysis*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 38075.
245. Sayon-Orea, C., et al., *Association between sleeping hours and siesta and the risk of obesity: the SUN Mediterranean Cohort*. Obes Facts, 2013. **6**(4): p. 337-47.
246. Large, V., et al., *Hormone-sensitive lipase expression and activity in relation to lipolysis in human fat cells*. J Lipid Res, 1998. **39**(8): p. 1688-95.
247. Arredondo-Amador, M., et al., *Circadian Rhythms in Hormone-sensitive Lipase in Human Adipose Tissue: Relationship to Meal Timing and Fasting Duration*. J Clin Endocrinol Metab, 2020. **105**(12): p. e4407-16.
248. Maw, S.S., *Prevalence of metabolic syndrome, its risk factors and associated lifestyles in Myanmar adult people: A community based cross-sectional study*. Metabol Open, 2021. **12**: p. 100135.
249. Troisi, R.J., et al., *Relation of obesity and diet to sympathetic nervous system activity*. Hypertension, 1991. **17**(5): p. 669-77.
250. Scheer, F.A., et al., *Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(11): p. 4453-8.

251. Dominoni, D.M., J.C. Borniger, and R.J. Nelson, *Light at night, clocks and health: from humans to wild organisms*. Biol Lett, 2016. **12**(2): p. 20160015.
252. Woods, D.L., H. Kim, and M. Yefimova, *To nap or not to nap: excessive daytime napping is associated with elevated evening cortisol in nursing home residents with dementia*. Biol Res Nurs, 2013. **15**(2): p. 185-90.
253. Shostak, A., J. Husse, and H. Oster, *Circadian regulation of adipose function*. Adipocyte, 2013. **2**(4): p. 201-6.
254. Karczewska-Kupczewska, M., et al., *Changes in adipose tissue lipolysis gene expression and insulin sensitivity after weight loss*. Endocr Connect, 2020. **9**(2): p. 90-100.
255. Gribble, A.K., et al., *Risk of Developing Metabolic Syndrome Is Affected by Length of Daily Siesta: Results from a Prospective Cohort Study*. Nutrients, 2021. **13**(11).
256. Fang, W., et al., *Longer habitual afternoon napping is associated with a higher risk for impaired fasting plasma glucose and diabetes mellitus in older adults: results from the Dongfeng-Tongji cohort of retired workers*. Sleep Med, 2013. **14**(10): p. 950-4.
257. Yamada, T., et al., *Daytime Napping and the Risk of Cardiovascular Disease and All-Cause Mortality: A Prospective Study and Dose-Response Meta-Analysis*. Sleep, 2015. **38**(12): p. 1945-53.
258. Lin, D., et al., *Association between habitual daytime napping and metabolic syndrome: a population-based study*. Metabolism, 2014. **63**(12): p. 1520-7.
259. Yang, L., et al., *Sleep Duration and Midday Napping with 5-Year Incidence and Reversion of Metabolic Syndrome in Middle-Aged and Older Chinese*. Sleep, 2016. **39**(11): p. 1911-1918.
260. Papandreou, C., et al., *Long Daytime Napping Is Associated with Increased Adiposity and Type 2 Diabetes in an Elderly Population with Metabolic Syndrome*. J Clin Med, 2019. **8**(7).
261. Tang, X., F. Yao, and K. Liu, *Adiposity-related risks among the middle-aged and elderly Chinese: the role of siesta and nocturnal sleep duration*. Nutr Hosp, 2021. **38**(4): p. 797-806.

262. Cai, Z., et al., *The relationship between daytime napping and obesity: a systematic review and meta-analysis*. Sci Rep, 2023. **13**(1): p. 12124.
263. Lopez-Minguez, J., et al., *Heritability of siesta and night-time sleep as continuously assessed by a circadian-related integrated measure*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 12340.
264. Dashti, H.S., et al., *Genetic determinants of daytime napping and effects on cardiometabolic health*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 900.
265. Lockley, S.W., D.J. Skene, and J. Arendt, *Comparison between subjective and actigraphic measurement of sleep and sleep rhythms*. J Sleep Res, 1999. **8**(3): p. 175-83.
266. Chen, X., M.A. Beydoun, and Y. Wang, *Is sleep duration associated with childhood obesity? A systematic review and meta-analysis*. Obesity (Silver Spring), 2008. **16**(2): p. 265-74.
267. Tambalis, K.D., et al., *Insufficient Sleep Duration Is Associated With Dietary Habits, Screen Time, and Obesity in Children*. J Clin Sleep Med, 2018. **14**(10): p. 1689-1696.
268. Rubio-Sastre, P., et al., *Acute melatonin administration in humans impairs glucose tolerance in both the morning and evening*. Sleep, 2014. **37**(10): p. 1715-9.
269. Cagnacci, A., et al., *Influence of melatonin administration on glucose tolerance and insulin sensitivity of postmenopausal women*. Clin Endocrinol (Oxf), 2001. **54**(3): p. 339-46.
270. Peschke, E., et al., *Receptor (MT(1)) mediated influence of melatonin on cAMP concentration and insulin secretion of rat insulinoma cells INS-1*. J Pineal Res, 2002. **33**(2): p. 63-71.
271. Saltiel, A.R., *Insulin signaling in health and disease*. J Clin Invest, 2021. **131**(1).
272. Service, F.J., et al., *Effects of size, time of day and sequence of meal ingestion on carbohydrate tolerance in normal subjects*. Diabetologia, 1983. **25**(4): p. 316-21.
273. Van Cauter, E., et al., *Modulation of glucose regulation and insulin secretion by circadian rhythmicity and sleep*. J Clin Invest, 1991. **88**(3): p. 934-42.

274. Stenvers, D.J., et al., *Circadian clocks and insulin resistance*. Nat Rev Endocrinol, 2019. **15**(2): p. 75-89.
275. Lyssenko, V., et al., *Common variant in MTNR1B associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion*. Nat Genet, 2009. **41**(1): p. 82-8.
276. Tuomi, T., et al., *Increased Melatonin Signaling Is a Risk Factor for Type 2 Diabetes*. Cell Metab, 2016. **23**(6): p. 1067-1077.
277. Saklayen, M.G., *The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome*. Curr Hypertens Rep, 2018. **20**(2): p. 12.
278. Bonnefond, A., et al., *Rare MTNR1B variants impairing melatonin receptor 1B function contribute to type 2 diabetes*. Nat Genet, 2012. **44**(3): p. 297-301.
279. Garaulet, M., et al., *Interplay of Dinner Timing and MTNR1B Type 2 Diabetes Risk Variant on Glucose Tolerance and Insulin Secretion: A Randomized Crossover Trial*. Diabetes Care, 2022. **45**(3): p. 512-519.
280. O'Connell, J., et al., *The relationship of omental and subcutaneous adipocyte size to metabolic disease in severe obesity*. PLoS One, 2010. **5**(4): p. e9997.
281. Adamczyk-Sowa, M., et al., *Labeled [(3)H]-thymidine incorporation in the DNA of 3T3-L1 preadipocytes due to MT(2)- and not MT(3)- melatonin receptor*. J Physiol Pharmacol, 2014. **65**(1): p. 135-43.
282. Alonso-Vale, M.I., et al., *Melatonin enhances leptin expression by rat adipocytes in the presence of insulin*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **288**(4): p. E805-12.
283. Costes, S., et al., *Activation of Melatonin Signaling Promotes beta-Cell Survival and Function*. Mol Endocrinol, 2015. **29**(5): p. 682-92.
284. Lauritzen, E.S., et al., *Three months of melatonin treatment reduces insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes-A randomized placebo-controlled crossover trial*. J Pineal Res, 2022. **73**(1): p. e12809.
285. Takigawa, Y., et al., *The transcription factor Znf219 regulates chondrocyte differentiation by assembling a transcription factory with Sox9*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 21): p. 3780-8.

286. Clough, R.L., G. Dermentzaki, and L. Stefanis, *Functional dissection of the alpha-synuclein promoter: transcriptional regulation by ZSCAN21 and ZNF219*. J Neurochem, 2009. **110**(5): p. 1479-90.
287. Glatt, S. and C.W. Muller, *Structural insights into Elongator function*. Curr Opin Struct Biol, 2013. **23**(2): p. 235-42.
288. Yuan, J., et al., *Cloning and characterization of the human gene DERP6, which activates transcriptional activities of p53*. Mol Biol Rep, 2006. **33**(3): p. 151-8.
289. Canto, C., et al., *AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity*. Nature, 2009. **458**(7241): p. 1056-60.
290. GeneCards. *HYI*. [cited 2024; Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HYI&keywords=HYI>.
291. Colsoul, B., et al., *Loss of high-frequency glucose-induced Ca²⁺ oscillations in pancreatic islets correlates with impaired glucose tolerance in Trpm5^{-/-} mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(11): p. 5208-13.
292. Uchida, K., et al., *Lack of TRPM2 impaired insulin secretion and glucose metabolisms in mice*. Diabetes, 2011. **60**(1): p. 119-26.
293. Lee, J. and P.F. Pilch, *The insulin receptor: structure, function, and signaling*. Am J Physiol, 1994. **266**(2 Pt 1): p. C319-34.
294. Inoki, K., et al., *TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(9): p. 648-57.
295. Yoon, M.S., *The Role of Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) in Insulin Signaling*. Nutrients, 2017. **9**(11).
296. Zhang, H.H., et al., *Insulin stimulates adipogenesis through the Akt-TSC2-mTORC1 pathway*. PLoS One, 2009. **4**(7): p. e6189.
297. Galic, S., et al., *Suppressor of cytokine signalling (SOCS) proteins as guardians of inflammatory responses critical for regulating insulin sensitivity*. Biochem J, 2014. **461**(2): p. 177-88.
298. Suchy, D., et al., *SOCS and diabetes--ups and downs of a turbulent relationship*. Cell Biochem Funct, 2013. **31**(3): p. 181-95.
299. Kedzierski, L., et al., *SOCS4 is dispensable for an efficient recall response to influenza despite being required for primary immunity*. Immunol Cell Biol, 2015. **93**(10): p. 909-13.

-
300. Abe, T., K. Hirasaka, and T. Nikawa, *Involvement of Cbl-b-mediated macrophage inactivation in insulin resistance*. *World J Diabetes*, 2017. **8**(3): p. 97-103.
301. Yokoi, N., et al., *Identification and functional analysis of CBLB mutations in type 1 diabetes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **368**(1): p. 37-42.
302. Lata, E., et al., *RNA Polymerase III Subunit Mutations in Genetic Diseases*. *Front Mol Biosci*, 2021. **8**: p. 696438.
303. McNamar, R., et al., *PAF49: An RNA Polymerase I subunit essential for rDNA transcription and stabilization of PAF53*. *J Biol Chem*, 2023. **299**(8): p. 104951.
304. Shi, Y.J. and K.K. Huo, *Knockdown expression of Apc11 leads to cell-cycle distribution reduction in G2/M phase*. *Genet Mol Res*, 2012. **11**(3): p. 2814-22.
305. Mikasa, M., et al., *COQ2 variants in Parkinson's disease and multiple system atrophy*. *J Neural Transm (Vienna)*, 2018. **125**(6): p. 937-944.
306. Ito, D. and A. Kumanogoh, *The role of Sema4A in angiogenesis, immune responses, carcinogenesis, and retinal systems*. *Cell Adh Migr*, 2016. **10**(6): p. 692-699.
307. Mohajeri, K., et al., *Transcriptional and functional consequences of alterations to MEF2C and its topological organization in neuronal models*. *Am J Hum Genet*, 2022. **109**(11): p. 2049-2067.
308. Franca, M.M. and B.B. Mendonca, *Genetics of ovarian insufficiency and defects of folliculogenesis*. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2022. **36**(1): p. 101594.
309. Clarke, T.C., et al., *Trends in the use of complementary health approaches among adults: United States, 2002-2012*. *Natl Health Stat Report*, 2015(79): p. 1-16.
310. Park, J., et al., *Effect of alternate-day fasting on obesity and cardiometabolic risk: A systematic review and meta-analysis*. *Metabolism*, 2020. **111**: p. 154336.
311. Christensen, R.A.G. and A.A. Kirkham, *Time-Restricted Eating: A Novel and Simple Dietary Intervention for Primary and Secondary Prevention of Breast Cancer and Cardiovascular Disease*. *Nutrients*, 2021. **13**(10).

312. Schweiger, M., et al., *Measurement of lipolysis*. Methods Enzymol, 2014. **538**: p. 171-93.
313. Poggiogalle, E., H. Jamshed, and C.M. Peterson, *Circadian regulation of glucose, lipid, and energy metabolism in humans*. Metabolism, 2018. **84**: p. 11-27.
314. Xie, Z., et al., *Randomized controlled trial for time-restricted eating in healthy volunteers without obesity*. Nat Commun, 2022. **13**(1): p. 1003.
315. Ravussin, E., et al., *Early Time-Restricted Feeding Reduces Appetite and Increases Fat Oxidation But Does Not Affect Energy Expenditure in Humans*. Obesity (Silver Spring), 2019. **27**(8): p. 1244-1254.
316. Antoni, R., et al., *A pilot feasibility study exploring the effects of a moderate time-restricted feeding intervention on energy intake, adiposity and metabolic physiology in free-living human subjects*. 2018. **7**: p. e22.
317. Liu, J., P. Yi, and F. Liu, *The Effect of Early Time-Restricted Eating vs Later Time-Restricted Eating on Weight Loss and Metabolic Health*. J Clin Endocrinol Metab, 2023. **108**(7): p. 1824-1834.
318. Queiroz, J.D.N., et al., *Cardiometabolic effects of early v. delayed time-restricted eating plus energetic restriction in adults with overweight and obesity: an exploratory randomised clinical trial*. Br J Nutr, 2022: p. 1-13.
319. Laermans, J., et al., *Shifting the circadian rhythm of feeding in mice induces gastrointestinal, metabolic and immune alterations which are influenced by ghrelin and the core clock gene Bmal1*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e110176.
320. Vollmers, C., et al., *Time of feeding and the intrinsic circadian clock drive rhythms in hepatic gene expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(50): p. 21453-8.
321. Goo, R.H., et al., *Circadian variation in gastric emptying of meals in humans*. Gastroenterology, 1987. **93**(3): p. 515-8.
322. Spiegel, K., et al., *Brief communication: Sleep curtailment in healthy young men is associated with decreased leptin levels, elevated ghrelin levels, and increased hunger and appetite*. Ann Intern Med, 2004. **141**(11): p. 846-50.

323. Morris, C.J., et al., *The Human Circadian System Has a Dominating Role in Causing the Morning/Evening Difference in Diet-Induced Thermogenesis*. Obesity (Silver Spring), 2015. **23**(10): p. 2053-8.
324. Fukuda, Y. and T. Morita, *Effects of the light-dark cycle on diurnal rhythms of diet-induced thermogenesis in humans*. Chronobiol Int, 2017. **34**(10): p. 1465-1472.
325. McHill, A.W., et al., *Later circadian timing of food intake is associated with increased body fat*. Am J Clin Nutr, 2017. **106**(5): p. 1213-1219.
326. Paoli, A., et al., *The Influence of Meal Frequency and Timing on Health in Humans: The Role of Fasting*. Nutrients, 2019. **11**(4).
327. Bushman, T., T.Y. Lin, and X. Chen, *Depot-Dependent Impact of Time-Restricted Feeding on Adipose Tissue Metabolism in High Fat Diet-Induced Obese Male Mice*. Nutrients, 2023. **15**(1).
328. Aouichat, S., et al., *Time-Restricted Feeding Improves Body Weight Gain, Lipid Profiles, and Atherogenic Indices in Cafeteria-Diet-Fed Rats: Role of Browning of Inguinal White Adipose Tissue*. Nutrients, 2020. **12**(8).
329. Hepler, C., et al., *Time-restricted feeding mitigates obesity through adipocyte thermogenesis*. Science, 2022. **378**(6617): p. 276-284.
330. Hatori, M., et al., *Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet*. Cell Metab, 2012. **15**(6): p. 848-60.
331. Grabner, G.F., et al., *Lipolysis: cellular mechanisms for lipid mobilization from fat stores*. Nat Metab, 2021. **3**(11): p. 1445-1465.
332. Kersten, S., *The impact of fasting on adipose tissue metabolism*. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2023. **1868**(3): p. 159262.
333. Ruddick-Collins, L.C., et al., *Timing of daily calorie loading affects appetite and hunger responses without changes in energy metabolism in healthy subjects with obesity*. Cell Metab, 2022. **34**(10): p. 1472-1485 e6.
334. Kim, Y.H. and M.A. Lazar, *Transcriptional Control of Circadian Rhythms and Metabolism: A Matter of Time and Space*. Endocr Rev, 2020. **41**(5): p. 707-32.
335. Fonken, L.K., et al., *Light at night increases body mass by shifting the time of food intake*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(43): p. 18664-9.

336. Cienfuegos, S., et al., *Time restricted eating for the prevention of type 2 diabetes*. J Physiol, 2022. **600**(5): p. 1253-1264.
337. Witt, C.R., et al., *A Self-Selected 16:8 Time-Restricted Eating Protocol Improves Fat Oxidation Rates, Markers of Cardiometabolic Health, and 10-km Cycling Performance in Middle-Age Male Cyclists*. J Strength Cond Res, 2023. **37**(5): p. 1117-1123.
338. Lundell, L.S., et al., *Time-restricted feeding alters lipid and amino acid metabolite rhythmicity without perturbing clock gene expression*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 4643.
339. Elortegui Pascual, P., et al., *A meta-analysis comparing the effectiveness of alternate day fasting, the 5:2 diet, and time-restricted eating for weight loss*. Obesity (Silver Spring), 2023. **31 Suppl 1**(Suppl 1): p. 9-21.
340. Liu, D., et al., *Calorie Restriction with or without Time-Restricted Eating in Weight Loss*. N Engl J Med, 2022. **386**(16): p. 1495-1504.
341. McAllister, M.J., et al., *Time-restricted feeding improves markers of cardiometabolic health in physically active college-age men: a 4-week randomized pre-post pilot study*. Nutr Res, 2020. **75**: p. 32-43.
342. Kesztyus, D., et al., *Applicability of time-restricted eating for the prevention of lifestyle-dependent diseases in a working population: results of a pilot study in a pre-post design*. Ger Med Sci, 2021. **19**: p. Doc04.
343. Bonham, M.P., et al., *Effect of Night Time Eating on Postprandial Triglyceride Metabolism in Healthy Adults: A Systematic Literature Review*. J Biol Rhythms, 2019. **34**(2): p. 119-130.
344. Gu, C., et al., *Metabolic Effects of Late Dinner in Healthy Volunteers-A Randomized Crossover Clinical Trial*. J Clin Endocrinol Metab, 2020. **105**(8): p. 2789-802.
345. Martinez-Lozano, N., et al., *Late Eating Is Associated with Obesity, Inflammatory Markers and Circadian-Related Disturbances in School-Aged Children*. Nutrients, 2020. **12**(9).

VIII. ANEXOS

CUESTIONARIOS

Cuestionario de sueño

¿Tienes problemas de sueño? SI/NO Hora de acostarse:
Hora de levantarse:.....

¿Cómo duermes? Regular/Bien/Mal ¿Te sueles despertar por las noches?
 SI/NO ¿Cuántas veces?.....

- SIESTA ENTRE SEMANA

¿Sueles dormir siesta entre semana? SI/NO

Si la respuesta es NO, ¿cuál es el motivo?.....

¿Cuántas veces por semana?..... ¿Cuál es la duración en min?.....

¿Eres estacional en la siesta (invierno/verano? SI/NO

- SIESTA DURANTE EL FIN DE SEMANA

¿Sueles dormir siesta los fines de semana? SI/NO

Si la respuesta es NO, ¿cuál es el motivo?.....

¿Cuántas veces por semana?..... ¿Cuál es la duración en min?.....

¿Eres estacional en la siesta (invierno/verano? SI/NO

- SIESTA EN GENERAL

¿Por qué duermes siesta en general? Cansancio/Relajarme/Desconectar del
 trabajo/Necesidad

Otras
 causas:.....

¿En qué lugar duermes la siesta? Sofá/Cama

Si pudieras elegir entre dormir o no dormir siesta... ¿Dormirías siempre? SI/NO

Duración:<30 / 30-60 / >60

¿Cómo te encuentras después de la siesta si...es corta (<30)? Bien/Mal....es
 larga (>30)? Bien/Mal

Si no pudieras dormir siesta, ¿cómo te sentirías? Irritado/Cansancio
 acumulado/No me afectaría

Al despertar, ¿Tienes hambre? SI/NO ¿Qué te apetece?
 Dulce/Salado/Indiferente

- HORARIOS DE COMIDAS

¿Sueles desayunar entre semana? SI/NO ¿Sueles desayunar los fines de semana?
SI/NO

Entre semana... a qué hora sueles ¿Desayunar?..... ¿Comer?..... ¿Cenar?.....

Fin de semana... a qué hora sueles ¿Desayunar?..... ¿Comer?..... ¿Cenar?.....

Ejemplo del día de ayer: (Entre semana/Fin de semana)

DESAYUNO: Hora: Duración:.....

MEDIA MAÑANA: Hora: Duración:.....

COMIDA: Hora: Duración:.....

MERIENDA: Hora: Duración:.....

CENA: Hora: Duración:.....

¿Picas entre horas? SI/NO ¿Cuántas veces al día?

¿Sueles comer algo durante las 2,5h antes de ir a la cama? SI/NO si la respuesta es
SI, ¿Qué suele comer: dulce, salado, ¿Qué tipo de alimento?

- EJERCICIO FÍSICO

¿Haces un ejercicio físico específico? SI/NO

¿Cuál?.....
.....

Horas por semana:.....

Hora del ejercicio físico: Mañana/Tarde/Noche

¿Cómo te consideras? Sedentario/Activo/MuyActivo

Cuestionario de matutinidad vespertinidad de horne osberg

P1. Si sólo pensaras en cuando te sentirías mejor y fueras totalmente libre de planificarte el día. ¿A qué hora te levantarías?

5. Entre las 5 y las 6:30 de la mañana.
4. El Entre las 6:30 y las 8.
3. Entre las 8 y las 9:30 de la mañana.
2. Entre las 9:30 y las 11 de la mañana.
1. Entre las 11 y las 12.

P2. Si solo pensaras en cuando te sentirías mejor y fueras totalmente libre de planificarte el día. ¿A qué hora te acostarías?

5. Entre las 8 - 9 a.m.
4. Entre las 9 - 10 a.m.
3. Entre las 10:30 - 12:30 p.m.
2. Entre las 12:30-1:30 p.m.
1. Entre las 1:30 - 3 p.m.

P3. Para levantarte por la mañana a una hora específica. ¿Hasta qué punto necesitas que te avise el despertador?

4. No lo necesito.
3. Lo necesito poco.
2. Lo necesito bastante.
1. Lo necesito mucho.

P4. En circunstancias ambientales normales. ¿Qué tal te resulta levantarte por las mañanas?

1. Nada fácil.
2. No muy fácil.
3. Bastante fácil.
4. Muy fácil.

P5. Una vez levantado por las mañanas. ¿Qué tal te encuentras durante la primera media hora?

1. Nada alerta.
2. Poco alerta.

3. Bastante alerta.

4. Muy alerta.

P6. Una vez levantado por las mañanas. ¿Cómo es tu apetito durante la primera media hora?

1. Muy escaso.

2. Bastante escaso.

3. Bastante bueno.

4. Muy bueno.

P7. Una vez levantado por las mañanas. ¿Qué tal te sientes durante la primera media hora?

1. Muy cansado.

2. Bastante cansado.

3. Bastante descansado.

4. Muy descansado.

P8. Cuando no tienes compromisos al día siguiente. ¿A qué hora te acuestas en relación con tu hora habitual?

4. Raramente o nunca más tarde.

3. Menos de 1 hora más tarde.

2. De 1 a 2 horas más tarde.

1. Más de 2 horas más tarde.

P9. Has decidido hacer un poco de ejercicio físico. Un amigo te propone hacerlo una hora dos veces por semana y según él la mejor hora sería de 7 a 8 de la mañana. ¿Cómo crees que te encontrarías?

4. Estaría en buena forma.

3. Estaría en una forma aceptable.

2. Me resultaría difícil.

1. Me resultaría muy difícil.

P10. ¿A qué hora de la noche te sientes cansado y como consecuencia necesitas dormir?

5. A las 8-9 p.m.

4. A las 9-10:30 p, m.

3. A las 10:30-12:30 p.m.

2. A las 1-2 a.m.

1. A las 2-3 a.m.

P11. Quieres estar en tu punto máximo de rendimiento para una prueba de dos horas que va a ser mentalmente agotadora. Siendo totalmente libre de planificar el día y pensando sólo en cuando te sentirías mejor. ¿Qué horario elegirías?

6. De 8 a 10 de la mañana.

4. De 11 de la mañana a la 1 de] mediodía.

2. De 3 a las 5 de la tarde.

1. De 7 de la tarde a 9 de la noche.

P12. Si te acostases a las 11 de la noche. ¿Qué nivel de cansancio notarías?

0. Ningún cansancio.

2. Algún cansancio.

3. Bastante cansancio.

5. Mucho cansancio.

P13. Por algún motivo te has acostado varias horas más tarde de lo habitual, aunque al día siguiente no has de levantarte a ninguna hora en particular. ¿Cuándo crees que te despertarías?

4. A la hora habitual y ya no dormiría más.

3. A la hora habitual y luego dormiría.

2. A la hora habitual y volvería a dormirme.

1. Más tarde de lo habitual.

P14. Una noche tienes que permanecer despierto de 4 a 6 de la madrugada debido a una guardia nocturna. Sin tener ningún compromiso al día siguiente, ¿qué preferirías?

1. No acostarme hasta pasada la guardia.

2. Echar un sueño antes y dormir después.

3. Echar un buen sueño antes y un sueñecito después,

4. Hacer toda la dormida antes de la guardia.

P15. Tienes que hacer dos horas de trabajo físico pesado. Eres totalmente libre para planificarte el día. Pensando sólo en cuando te sentirías mejor, ¿qué horario escogerías?

4. De 8 a 10 de la mañana.

3. De 11 de la mañana a 1 del mediodía.
2. De 3 a 5 de la tarde.
1. De 7 de la tarde a 9 de la noche.

P16. Has decidido hacer ejercicio físico intenso. Un amigo te sugiere practicar una hora dos veces por semana de 10 a 11 de la noche. ¿Cómo crees que te sentaría?

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

P17. Imagínate que puedes escoger tu horario de trabajo. Supón que tu jornada es de CINCO horas (incluyendo los descansos) y que tu actividad es interesante y remunerada según tu rendimiento. ¿Qué CINCO HORAS CONSECUTIVAS seleccionarías?

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

Considera la casilla marcada para escoger entre los siguientes rangos.

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

P18. ¿A qué hora del día crees que alcanzas tu cota máxima de bienestar?

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

P19. Se habla de personas de tipo matutino y vespertino. ¿Cuál de estos tipos te consideras ser?

6. Un tipo claramente matutino.
4. Un tipo más matutino que vespertino.
2. Un tipo más vespertino que matutino.
1. Un tipo claramente vespertino.

Suma los puntos que figuran al lado de la casilla y consulta a qué carácter corresponde la puntuación total.

La puntuación obtenida ha sido: _____ puntos

Valoración Antropométrica

PLIEGUES (mm)	LADO DERECHO		
	1	2	3
BICIPITAL			
TRICIPITAL			
SUBESCAPULAR			
SUPRAILÍACO			
PERÍMETROS (cm)	1	2	3
CINTURA (máximo perímetro)			
CADERA			

Presión Sistólica:

Diámetro Sagital:

Presión Diastólica:

Diámetro Coronal:

TANITA

Tipo	Normal	Atlético
Sexo	Hombre	Mujer
Edad	años	
Altura	cm	
Peso	Kg	
IMC	Kg/m²	
TMB	KJ	KCal
Impedancia	Ω	
Masa Grasa	%	
Masa Grasa	Kg	
Masa Magra	Kg	
Agua Total	Kg	

Historial clínico

1. Menopausia (Historia ginecológica/obstétrica):

Premenopausia:..... Perimenopausia:..... Postmenopausia:.....

Fórmula menstrual:..... Edad menopausia:.....

Gestaciones:..... Abortos:..... Partos:..... Cesáreas:.....

Diabetes gestacional:.....Hipertensión gestacional:.....

2. DIABETES:

N0/SI

• Tipo de tratamiento:

3. Otras enfermedades:

- Tipo dieta pre-cirugía:

- Cuánto tiempo lleva haciéndola:

4. Historia de la obesidad:

* Inicio de la obesidad:

Infancia:..... Niñez:..... Adolescencia:..... +20 años:..... +40 años:.....

Motivo:.....

* Épocas de obesidad y grado:

Infancia:..... Niñez:..... Adolescencia:..... 20-30 A:.....

30-40 A:..... 40-50 A:.....50-60 A:..... +60 A:.....

* Relación con la familia, grado (-, +, ++, +++):

Padre:..... Madre:..... Cuántos Hermanos:..... Hermanos obesos:.....

Abuelo paterno:..... Abuela paterna:.....Abuelo materno:.....

Abuela materna:.....Pareja:.....Cuántos Hijos:..... Hijos obesos:.....

5. Relación con hábitos y ejercicio físico: (en 24 horas):

Horas sentado:..... Lugar de trabajo:

Ejercicio físico:..... Leve:..... Moderado:..... Intenso:.....

¿A qué hora lo suele hacer: mañana, tarde o noche o ambas?

Deporte extra:.....

Consumo de alcohol:..... Fuma:.....Nº de cigarrillos:.....

6. Psiquismo:

Normal:..... Ansioso:..... Depresivo:..... Impulso bulímico:.....

Come después de saciarse:.....

Percepción de la imagen corporal: Delgado:..... Normal:..... Gordo:.....

IX. CONTRIBUCIÓN CIENTÍFICA

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

- Autores (p.o. de firma): **Zambrano C**, Kulyté A, Luján J, Rivero-Gutierrez B, Sánchez de Medina F, Martínez-Augustin O, Ryden M, Scheer FAJL, Garaulet M.

Título: Habitual nappers and non-nappers differ in circadian rhythms of LIPE expression in abdominal adipose tissue explants.

Revista: Front Endocrinol (Lausanne). 2023 Jun 9; 14:1166961 doi: 10.3389/fendo.2023.1166961.

Clave: A

Fecha: 2023

Publicación realizada junto con el grupo de investigación de obesidad de la universidad de Murcia, en estado pre-doctoral.

- Autores (p.o. de firma): Arrendondo-Amador M, **Zambrano C**, Kulyté A, Luján J, Sánchez de Medina F, Scheer FAJL, Arner P, Ryden M, Martínez-Augustin O, Garaulet M.

Título: Circadian Rhythms in Hormone-sensitive Lipase in Human Adipose Tissue: Relationship to Meal Timing and Fasting Duration.

Revista: J Clin Endocrinol Metab. 2020 Dec 1;105(12): e4407-e4416.; doi: 10.1210/clinem/dgaa492

Clave: A

Fecha: 2020

Contribuciones a congresos nacionales

Autores: **Zambrano C**, Garitaonaindia, Pérez Sanz F, Picinat Cecilia M, Sánchez de Medina F, Salmerón D, Lujan JA, Scheer FAJL, Saxena R, Martínez-Augustin O, Garaulet M.

Título: Melatonin decreases insulin sensitivity in human adipose tissue culture.

Tipo de participación: Comunicación en póster

Congreso: Sociedad Española de Nutrición (SEÑ 2023)

Lugar celebración: Cartagena- Murcia

Fecha: 2023

Contribuciones a seminarios internacionales

Autores: **Zambrano C**, Garaulet M.

Título: Morning and evening time restricted eating in human adipose tissue culture.

Tipo de participación: Comunicación

Congreso: RCCHU International Seminar: I PhD International Seminar organized by RCC Harvard Study Group on Functional Foods, Bioactives and Human Health

Lugar celebración: Online-Cambridge University- EEUU.

Fecha: 2022

Artículo

“Habitual nappers and non-nappers differ in circadian rhythms of LIPE expression in abdominal adipose tissue explants”

Carolina Zambrano, Agné Kulyté, Juan Luján, Belén Rivero-Gutierrez , Fermín Sánchez de Medina , Olga Martínez-Augustin , Mikael Ryden , Frank A J L Scheer, Marta Garaulet.

The Frontiers in Endocrinology (Lausanne). 2023

(índice de impacto=6,055; cuartil: 1^o)

DOI: doi.org10.3389/fendo.2023.1166961

“Habitual nappers and non-nappers differ in circadian rhythms of LIPE expression in abdominal adipose tissue explants.”

Carolina Zambrano, Agné Kulyté, Juan Luján, Belén Rivero-Gutierrez , Fermín Sánchez de Medina , Olga Martínez-Augustin , Mikael Ryden , Frank A J L Scheer, Marta Garaulet.

Resumen

Antecedentes y finalidad: La siesta es una práctica muy extendida en todo el mundo y en los últimos años se ha relacionado con un aumento de la adiposidad abdominal. La *LIPE* codifica la proteína lipasa sensible a hormonas, una enzima que desempeña un papel importante en la movilización de lípidos y presenta un ritmo de expresión circadiano en el tejido adiposo humano. Nuestra hipótesis es que la siesta habitual puede afectar al patrón de expresión circadiano de la *LIPE*, lo que a su vez puede atenuar la movilización de lípidos e inducir la acumulación de grasa abdominal.

Métodos: Se cultivaron explantes de tejido adiposo abdominal de participantes con obesidad (n=18) durante un periodo de 24 horas y se analizaron cada 4 horas. Se seleccionaron personas que dormían habitualmente (n=8) para que coincidieran con las que no lo hacían (n=10) en edad, sexo, IMC, adiposidad y rasgos del síndrome metabólico. Se analizó la ritmicidad circadiana de la expresión de *LIPE* mediante el método cosinor.

Resultados: Los explantes de tejido adiposo mostraron ritmos circadianos robustos en la expresión de *LIPE* en los no nappers ($P= 0,00009$). Por el contrario, los nappers presentaban un ritmo aplanado ($P= 0,360$) con una disminución de la amplitud del 71% en comparación con los no nappers. La disminución de la amplitud entre los que dormían la siesta estaba relacionada con la frecuencia de las siestas (veces por semana), y una menor amplitud del ritmo estaba asociada a una mayor frecuencia de las siestas ($r=-0,797$; $P= 0,018$).

Conclusiones: Nuestros resultados sugieren que los nappers muestran una expresión circadiana de *LIPE* desregulada. Aunque los mecanismos causales están aún por definir, esto puede alterar la movilización de lípidos y contribuir al aumento de la obesidad abdominal en nappers habituales.

Artículo

“Circadian Rhythms in Hormone-sensitive Lipase in Human Adipose Tissue: Relationship to Meal Timing and Fasting Duration.”

María Arredondo-Amador, Carolina Zambrano, Agnė Kulytė, Juan Luján, Kun Hu, Fermín Sánchez de Medina, Frank A J L Scheer, Peter Arner, Mikael Ryden, Olga Martínez-Augustin, Marta Garaulet.

Journal of Clinical Endocrinology and Metabolisms. 2020

(índice de impacto=5,958; cuartil: 1^o)

DOI: 10.1210/clinem/dgaa492

“Circadian Rhythms in Hormone-sensitive Lipase in Human Adipose Tissue: Relationship to Meal Timing and Fasting Duration.”

María Arredondo-Amador, Carolina Zambrano, Agnė Kulytė, Juan Luján, Kun Hu, Fermín Sánchez de Medina, Frank A J L Scheer, Peter Arner, Mikael Ryden , Olga Martínez-Augustin, Marta Garaulet.

Resumen

Antecedentes: La movilización de grasa en el tejido adiposo tiene un ritmo específico. Sin embargo, en humanos no se han demostrado ritmos circadianos en la actividad de la principal enzima responsable de la movilización de grasa, la lipasa sensible a hormonas (LSH).

Objetivo: Analizar en un estudio transversal si existe un ritmo circadiano endógeno en la actividad de la LSH en el TA humano ex vivo y si las características del ritmo están relacionadas con el momento de la comida o la duración del ayuno.

Métodos: Se obtuvieron biopsias abdominales de TA de 18 participantes con obesidad severa (edad: 46 ± 11 años; índice de masa corporal 42 ± 6 kg/m²) sometidos a bypass gástrico laparoscópico. Se analizaron los ritmos de veinticuatro horas de la actividad de la LSH y la expresión de la *LIPE* (transcripción de la LSH en humanos) en el TA subcutáneo junto con el horario habitual de comida y la duración del ayuno nocturno.

Resultados: La actividad LSH exhibió un ritmo circadiano ($P= 0.023$) y alcanzó el valor máximo a la hora circadiana 16 (CT) que correspondió a alrededor de la medianoche (hora relativa del reloj local. De forma similar, la *LIPE* mostró un ritmo circadiano con acrofase también por la noche ($P= 0.0002$). Los participantes con una mayor duración del ayuno nocturno $>11,20$ horas mostraron casi el doble de amplitud (1,91 veces) en el ritmo de actividad de la *LIPE* que los de corta duración ($P= 0.013$); mientras que los comensales tempranos habituales (antes de las 21:52 horas) tuvieron una amplitud 1,60 veces mayor que los comensales tardíos ($P= 0.035$).

Conclusiones: Nuestros resultados demuestran los ritmos circadianos en la actividad LSH y pueden conducir a una mejor comprensión de las intrincadas

relaciones entre el momento de la comida, la duración del ayuno y la regulación de la grasa corporal.

