



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

**Análisis de la Salud Circadiana como Factor
Predictivo de Éxito en la Pérdida de Peso**

**Dña. María Cristina Bandín Saura
2015**

Memoria presentada por
Lda. D^a M^a CRISTINA BANDÍN SAURA
para optar al GRADO DE DOCTOR por la
Universidad de Murcia, 2015.

Esta Tesis Doctoral ha sido dirigida por:

Dra. MARTA GARAULET AZA.

Catedrática de Fisiología. Departamento de Fisiología.

Universidad de Murcia, España.

Dr. JUAN ANTONIO MADRID PÉREZ.

Catedrático de Fisiología. Departamento de Fisiología.

Universidad de Murcia, España.

*“Aunque ya nada pueda devolver tu presencia,
siempre perdurará tu belleza en el recuerdo”.*

A Pepe y Teresa

*“Hay dos hechos que me conmueven:
uno es que te comprendan,
y el otro que te toleren”.*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a la Universidad de Murcia, el haberme proporcionado los medios técnicos y humanos necesarios para mi formación investigadora y en general, a todas aquellas personas e instituciones que han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral.

A la Prof. D^a Marta Garaulet, Catedrática de Fisiología de la Universidad de Murcia y directora de esta tesis. Marta no podría vivir sin la investigación, sin ese inigualable “placer de descubrir” del que hablaba Severo Ochoa, es su “modus vivendi” y gracias a ello y a su increíble capacidad de trabajo, se ha convertido en una investigadora de primera línea dentro de la comunidad científica. Le estoy muy agradecida por darme la oportunidad de trabajar con ella, por la confianza que siempre ha depositado en mí, por sacar lo mejor de mí en cada momento y animarme a continuar en situaciones difíciles. Pero no sólo es su profesionalidad, sino también su personalidad, lo que hace de ella un ser extraordinario, por la que siento una gran admiración y un gran orgullo al considerarme su amiga. GRACIAS por tu paciencia y dedicación, para mí eres un ejemplo de trabajo.

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

Al Prof. D. Salvador Zamora, Catedrático de Fisiología de la Universidad de Murcia, por darme la oportunidad de aprender de su dilatada experiencia en el campo de la Fisiología.

A todos los profesores del Departamento de Fisiología, especialmente a José Ángel López y Javier Martínez por sus consejos y amistad y a Paquita Pérez-Llamas y Elvira Larqué por el cariño que me han demostrado a lo largo de estos años.

A Antonio Martínez-Nicolás, de la “sala de crono” por ayudarme con la cronobiología en esos difíciles momentos que son los inicios y a lo largo de estos años. Por tu esfuerzo y trabajo, gracias.

A todos los demás miembros del departamento, porque ellos saben mejor que nadie la dura vida de un doctorando. Entre ellos, a Domingo Ruiz, Antonio Gazquez, María Ruiz, Dani González, Eli Ortiz, M^a José Martínez Madrid, trabajadores y responsables, gracias por vuestro compañerismo. Especialmente quiero dar las gracias a mis compañeros del grupo de nutrición: a Puri, perfeccionista, trabajadora incansable y siempre dispuesta a ayudar, a Jesús, inteligente, buen investigador y con una gran capacidad para trabajar en equipo, a Maria Paz, por su afán en hacer bien las cosas, a Gema y Nuria gracias por vuestro compañerismo. Después de tantos años y vivencias juntos los considero mis amigos y he tenido mucha suerte de haberlos encontrado en mi camino, lo hemos pasado irrealmente bien!, conseguirán todo lo que se propongan, estoy segura de ello. Y por último a todos, los que han estado y ya no están MUCHAS GRACIAS.

A todas las pacientes procedentes de los Centros de Nutrición Garaulet de Murcia, que desinteresadamente se han prestado voluntarias para desarrollar este trabajo, muchas gracias a todas.

A mis padres, porque gracias a su esfuerzo y dedicación soy quien soy,
GRACIAS.

Esta tesis está dedicada a Pepe y Teresa, mi marido y nuestra hija, itengo suerte de tenerlos!. A Pepe, porque sin él tampoco sería posible esta tesis, gracias por poner orden en mi “mundo caótico” y por estar siempre a mi lado animándome a seguir adelante. Y por último a Teresa, mi hija, el mayor regalo que me ha dado la vida, ella es mi motor y mi fuerza, espero que esta tesis sea para ella un ejemplo de esfuerzo y superación y espero también no tener que oír de nuevo “mama desapúntate de la universidad”. Sois lo más importante en mi vida y os quiero.

Índice

ÍNDICE

I.-INTRODUCCIÓN.	1
1.-OBESIDAD.....	1
2.-OBESIDAD Y CRONODISRUPCIÓN.....	3
2. 1-Fisiología del sistema circadiano.	5
2.2-Evidencias genéticas de la relación entre la obesidad y alteraciones de los ritmos circadianos.....	10
2.3-Evidencias ambientales de la relación entre la obesidad y alteraciones de los ritmos circadianos.....	12
3.-CARACTERIZACIÓN CRONOBIOLOGICA EN LA PRÁCTICA CLÍNICA.	15
3.1.-Representación gráfica y análisis de los ritmos circadianos.....	16
3.2.-Técnicas cronobiológicas en la práctica clínica.	18
3.2.1.- Temperatura corporal.....	18
3.2.2.-Cortisol.....	20
3.2.3.-Estudio del sueño: Polisomnografía (PSG).....	22
3.2.4.-Actimetría.....	23
3.2.5.-TAP.....	25
3.2.6.-Electrocardiograma (ECG).....	25
4.-PÉRDIDA DE PESO Y CRONODISRUPCIÓN	26
4.1.-Aplicación de un score metabólico en la práctica clínica de la obesidad.....	27
4.2.-Cambios ambientales relacionados con el horario de la comida.....	28
4.3.-Genética del reloj y pérdida de peso en el tratamiento de la obesidad.	31
II.-HIPÓTESIS DE PARTIDA Y OBJETIVOS.	33

ÍNDICE

III.-CAPITULOS EXPERIMENTALES	37
1.-Artículo 1:“Circadian rhythmicity as a predictor of weight-loss effectiveness”	37
2.-Artículo 2:“Meal timing affects glucose tolerance, substrate oxidation and circadian-related variables: a randomized, crossover trial”	47
3.-Artículo 3:“Differences in circadian rhythmicity in CLOCK 3111T/C genetic variants in moderate obese women as assessed by thermometry, actimetry and body position”	57
IV.-DISCUSION	69
1.-Discusión General	69
2.-Discusión específica por artículos.	71
2.1.-“Ritmos circadianos como predictores de la efectividad de los tratamientos de pérdida de peso”	71
2.2.-“Efectos de la hora de la comida sobre la tolerancia a la glucosa, oxidación de sustrato y variables circadianas: estudio randomizado y cruzado”.	76
2.3.-“Diferencias en la ritmicidad circadiana de la variante génica CLOCK 3111T/C en mujeres obesas moderadas, según la evaluación de la termometría, actimetría y posición del cuerpo”	82
V.-CONCLUSIONES.....	87
VI.-BIBLIOGRAFIA.	89
VII.-ANEXOS.....	97
Anexo I.....	99
1.-Cartas de aceptación de los trabajos publicados.....	99
2.-Indice de Impacto de las revistas.....	101
Anexo II.....	102

ÍNDICE

1.-Cuestionarios.....	102
1.1.-Cuestionario Internacional de Actividad Física.....	102
1.2.-Cuestionario de matutinidad-vespertinidad	108
2.-Registro diario de sueño	112
3.-Registro diario de consumo de alimentos.	113
4.- Ficha de paciente	114
5.-Toma de muestras de saliva.....	115

*“El tiempo entra por los ojos,
eso lo sabe cualquiera”.*

J.Cortázar.

Introducción

I.-INTRODUCCIÓN.

1.-OBESIDAD.

Los avances tecnológicos y el desarrollo socioeconómico producido desde comienzos del siglo XX han dado lugar a importantes cambios en la sociedad.

Ciertos aspectos de esta evolución han sido realmente positivos, sin embargo otros muchos relacionados no sólo con nuestro modelo dietético, sino con nuestro estilo de vida, han propiciado cambios en las pautas alimentarias de la población con una gran repercusión en el estado nutricional de la misma (1).

En este contexto, la obesidad ha aumentado considerablemente en todo el mundo. La Organización Mundial de la Salud cifró en 2008, que el 35% de las personas adultas de más de 20 años tenían sobrepeso y el 11% eran obesas.

Paralelamente a este incremento, ha habido un aumento de las enfermedades metabólicas asociadas con la obesidad abdominal, tales como diabetes tipo 2, dislipemias e hipertensión arterial, todo ello con importantes consecuencias sanitarias, sociales y económicas. Por tanto, están más que justificados los esfuerzos de la comunidad científica por conocer las causas y establecer estrategias para la prevención y tratamiento de la obesidad.

Las corrientes epidemiológicas actuales sobre la evolución de las tasas de obesidad, indican que una causa importante del problema subyace en modelos dietéticos y de actividad física inadecuados, en este sentido se han incorporado a los **tratamientos de pérdida de peso nuevas estrategias para aumentar el éxito** de los mismos. Así, la incorporación de técnicas conductuales asociadas a la promoción

de hábitos alimenticios, consistentes en patrones de dieta mediterránea parecen ser una herramienta útil para dicho propósito. Sin embargo, la puesta en práctica de estos nuevos enfoques, a veces es insuficiente, ya que existe una gran variabilidad interindividual en la respuesta a dichas intervenciones, además debemos tener en cuenta que un aspecto a considerar en el éxito de estos tratamientos es la genética de cada individuo (2).

Por tanto, el principal reto en el tratamiento dietético, es detectar aquellos factores asociados con el éxito de la pérdida de peso e identificar a los individuos que son resistentes a dichos tratamientos, a fin de proporcionarles las estrategias o alternativas más apropiadas.

Actualmente, con el descubrimiento del genoma humano en 2001 y el desarrollo de nuevas técnicas en biología molecular, ha surgido una nueva área de interés científico, la **nutrigenética**. El objetivo de esta nueva ciencia es describir la modulación del efecto de la dieta sobre un fenotipo específico, producido por un polimorfismo o variante genética (3), de esta forma surge un nuevo concepto la “interacción gen-dieta”. Hoy en día, el estudio de la interacción entre factores endógenos como la genética y exógenos como la dieta, la actividad física y el estilo de vida, presenta un papel importante en el desarrollo y el tratamiento de la obesidad (4).

Recientes estudios sobre polimorfismos en determinados genes, evidencian esta interacción y su relación con la obesidad. Mientras que los genes *APOA2* y *APOA5* se asocian con obesidad debido a interacciones dietéticas, especialmente con la ingesta de grasa, el gen *FTO* parece relacionarse con la obesidad por una asociación con el gasto energético debido a una baja tasa de actividad física (5, 6).

Recientemente en el campo de la nutrigenética, se ha introducido un nuevo término que es el de la cronobiología. Los estudios sobre polimorfismos en los genes reloj y las perturbaciones circadianas asociadas, han permitido a los científicos encontrar un nexo de unión entre la **nutrigenética**, la **cronobiología** y la **obesidad**(7).

Así, por ejemplo, se ha demostrado que aquellos individuos que se caracterizan por presentar un cronotipo vespertino (más activos por la tarde que por la mañana) tienden a tener un mayor grado de obesidad y un mayor índice de cintura-cadera (índice de riesgo cardiovascular)(8).

Además, en un reciente estudio publicado en 2011, se muestra como aquellos individuos portadores de un polimorfismo en el gen *CLOCK* 3111 T/C, presentan una reducción en las horas de sueño, cambios en los valores plasmáticos de ghrelina, alteraciones en el comportamiento alimentario y una preferencia vespertina, que pueden estar afectando a su pérdida de peso(9).

Por tanto, en el nuevo abordaje de la obesidad creemos que la **caracterización cronobiológica del individuo**, nos proporcionaría una herramienta muy valiosa en el diagnóstico de la obesidad y lo que es más importante, en su tratamiento. Sin embargo, hasta ahora no hay estudios en relación a la **cronobiología y el tratamiento de la obesidad**.

2.-OBESIDAD Y CRONODISRUPCIÓN.

La obesidad se puede entender como un trastorno resultante de una desproporción entre la ingesta calórica y el requerimiento energético. En este sentido,

resulta interesante destacar que los principales componentes de la homeostasis energética, incluyendo el ciclo de sueño-vigilia, la termogénesis, la alimentación y el metabolismo de glucosa y de lípidos, son sometidos a regulación circadiana, y sincronizados con los cambios en el ambiente externo que impone la salida y la puesta del sol (10).

Una de las características más evidentes de los seres vivos es la existencia de cambios rítmicos. En general, los organismos vivos presentan un gran número de procesos que se producen de una manera periódica y previsible y que se denominan “ritmos biológicos”. Aquellos ritmos cuyo período o duración completa de un ciclo, se encuentra entre 20 y 28 h se denominan circadianos.

Los ritmos circadianos (del latín *circa diem*, alrededor de un día) son una parte tan innata de nuestras vidas que raramente les prestamos atención (11). El funcionamiento correcto de estos ritmos circadianos endógenos permite a los organismos predecir y anticiparse a los cambios medioambientales, así como adaptar temporalmente sus funciones conductuales y fisiológicas a estos cambios.

Estos ritmos, además de ser propios de cada individuo, están modulados por factores genéticos, tal como se ha demostrado en un estudio reciente realizado por nuestro grupo en gemelas y mellizas, que muestra que algunas características del ritmo circadiano de la temperatura corporal presentan un componente eminentemente genético (aproximadamente un 70% de las diferencias entre hermanas se pueden explicar por factores genéticos) (12).

La alteración de estos ritmos circadianos se conoce actualmente como cronodisrupción (CD). Los hábitos sociales actuales, **tales como la reducción del**

tiempo de sueño y el incremento de irregularidad interdiaria del sueño-vigilia (jet-lag, trabajo por turnos y un aumento de la exposición a la luz brillante durante la noche) o el elevado consumo de «snacks», actúan sobre el cerebro induciendo una pérdida de la «percepción» de los ritmos internos y externos (13). La evidencia actual sugiere que la CD está estrechamente asociada con un aumento del riesgo de desarrollar ciertas enfermedades o con el empeoramiento de patologías preexistentes como el envejecimiento prematuro, el cáncer, enfermedades cardiovasculares, obesidad y síndrome metabólico (14, 15).

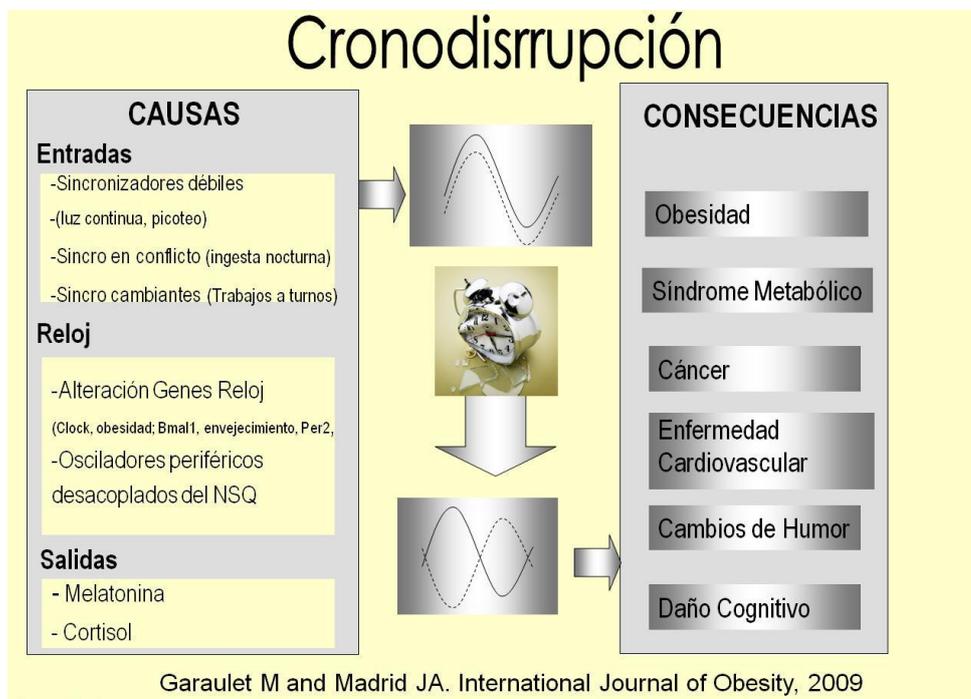


Figura 1. Cronodisrupción. Se ha observado que la interrupción de estos ritmos biológicos, lo que se conoce como cronodisrupción, se está asociando cada vez más a enfermedades de relevancia actual como la obesidad y el síndrome metabólico.

2. 1-Fisiología del sistema circadiano.

El sistema circadiano se define como el sistema responsable de la generación y mantenimiento de los ritmos circadianos del organismo y de su sincronización con el

medio ambiente. Pero los ritmos de los organismos vivos, no son consecuencia pasiva de las condiciones ambientales, sino que su origen es endógeno.

Este sistema está compuesto por un reloj biológico interno como pieza principal, que tiene capacidad intrínseca de oscilar funcionando como un marcapasos y presenta unas vías de entrada de información desde los receptores que captan las señales del medio ambiente y unas vías de salida dirigidas a los sistemas fisiológicos responsables de manifestar los ritmos biológicos de un individuo.

Marcapasos central

El principal reloj biológico interno o marcapasos en los mamíferos reside en el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo.

Consiste en un circuito de retroalimentación autorregulado de transcripción-transducción que genera, en ausencia de estímulos ambientales, ciclos ligeramente superiores a 24 horas, sin embargo, bajo condiciones ambientales naturales, el NSQ se «reajusta» cada día mediante una señal periódica de luz/oscuridad gracias a la existencia de una ruta no visual basada en las células ganglionares provistas del pigmento melanopsina.

Las señales ambientales o estímulos externos rítmicos capaces de modificar la duración del ciclo o período al que oscila el reloj endógeno, dirigiéndolo o encarrilándolo, se denominan *zeitgebers*.

Y aunque la entrada luminosa (cambios luz/oscuridad) sea el principal *zeitgeber* o agente sincronizador, existen otras entradas periódicas, como el horario de las

comidas (ingesta/ayuno) y el ejercicio programado (actividad/reposo), capaces de poner en hora el sistema circadiano de los mamíferos, en particular a los relojes periféricos. Consecuencia de este reajuste los ritmos biológicos se mantienen en un orden temporal concreto.

El control de la expresión de los ritmos circadianos se realiza a través de los denominados “genes reloj”. En síntesis, estos genes codifican una serie de proteínas que generan mecanismos de autorregulación mediante bucles de retroalimentación transcripcionales positivos y negativos (16).

El principal activador transcripcional es un dímero entre las proteínas *CLOCK* (*circadian locomotor output cycles kaput*) y *BMAL1* (*brain and muscle ARNT-like protein1*) que estimula la transcripción de los genes *PER1*, *PER2*, *PER3*, *CRY1*, *CRY2*, *REVERB α* , *ROR α* y otros genes controlados por el reloj (CCGs: Clock Controlled Genes), controlando su expresión. El heterodímero *CLOCK/BMAL1* además estimula la expresión de *BMAL1*, formando un bucle de retroalimentación positivo.

Por otro lado, el bucle de retroalimentación negativo está regulado principalmente por *PER* y *CRY*, que inhibe la transcripción de *CLOCK/BMAL1*. La expresión de *BMAL1* también está controlada por *REVERB α* (la inhibe) y *ROR α* (la estimula). La regulación de la expresión de los CCGs por el reloj circadiano confiere ritmicidad a los procesos moleculares y fisiológicos.

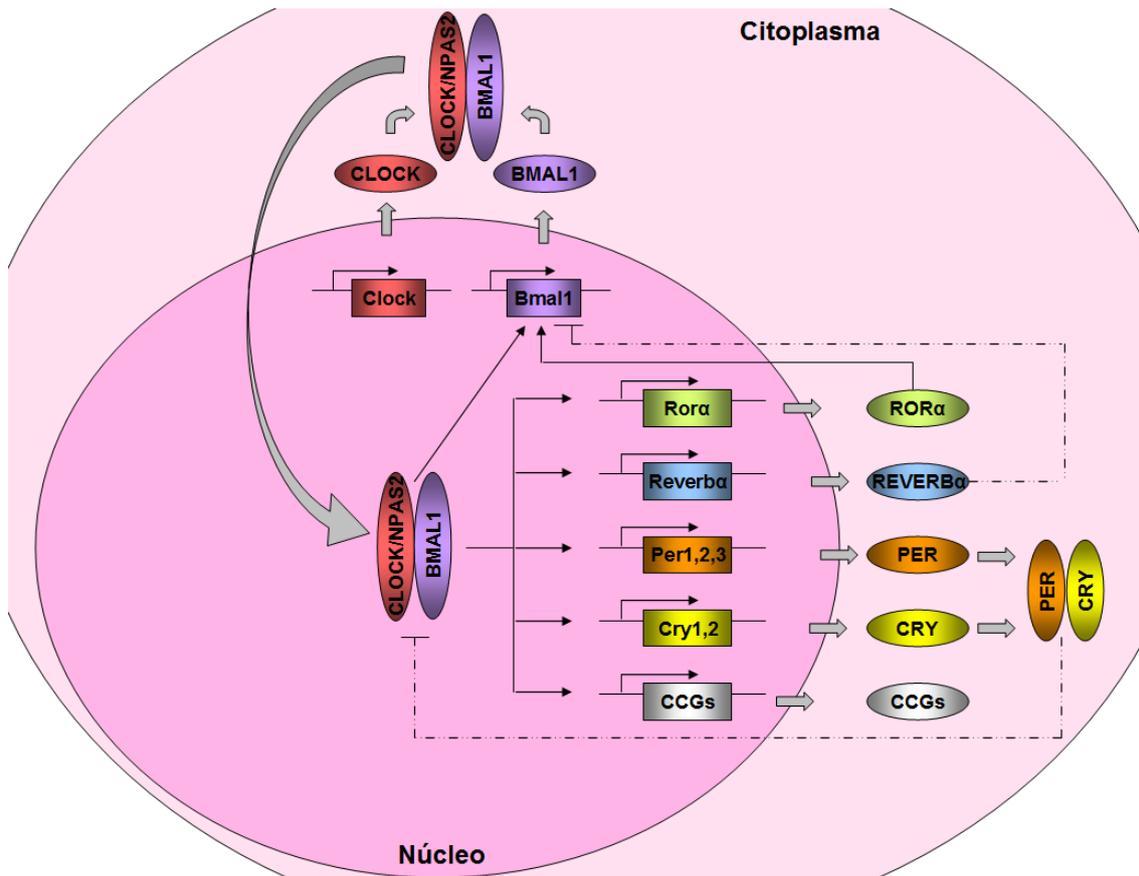


Figura 2. Maquinaria molecular del reloj circadiano. Los elementos positivos CLOCK y BMAL1 heteromerizan en el citoplasma, formando un complejo proteico. El heterodímero setransloca al núcleo y se une sobre el promotor de determinados genes (Per1, Per2, Per3, Cry1,Cry2, Reverba, Rora y muchos genes controlados por el reloj (CCGs: Clock Controlled Genes), controlando su expresión. El bucle de retroalimentación negativo está regulado principalmente por PER y CRY, que heteromerizan en el citoplasma, translocándose al núcleo e inhibiendo la transcripción de CLOCK/BMAL1. Líneas sólidas: estimulación. Líneas punteadas: inhibición.

Relojes periféricos

Estudios recientes muestran que la regulación del sistema circadiano intracelular no sólo reside en el cerebro, sino que determinados tejidos periféricos como corazón, hígado y páncreas, entre otros, presentan sus propios relojes, capaces de funcionar de forma autónoma mediante la expresión circadiana de sus «genes reloj», aunque modulados y sincronizados por el reloj central (17, 18).

El tejido adiposo (TA) como tejido periférico, posee genes reloj que juegan un papel fundamental en la fisiología del propio tejido, regulando la expresión rítmica de sustancias bioactivas secretadas como son las adipoquinas (adiponectina, leptina y resistina, entre otras) y que por lo tanto afectan el metabolismo sistémico. Investigaciones recientes muestran la importancia que tiene el funcionamiento correcto de los genes reloj del TA y el efecto de su desincronización en el desarrollo de ciertas enfermedades como la obesidad.

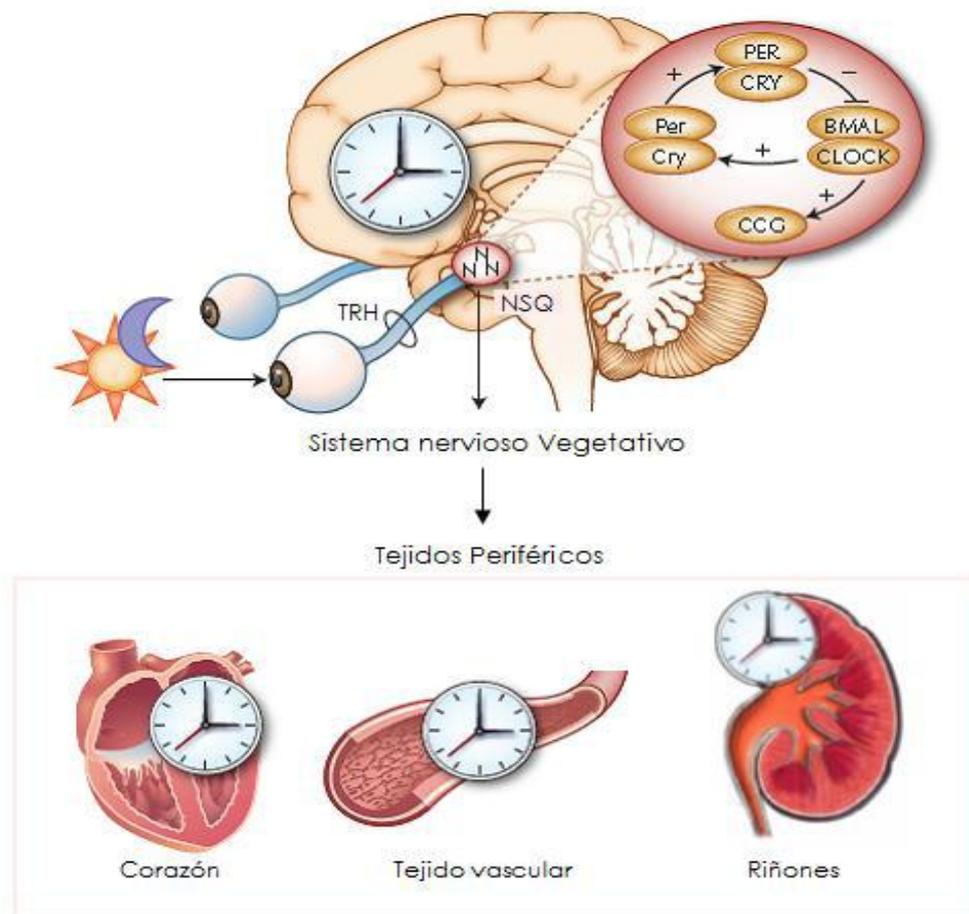


Figura 3. Organización del sistema circadiano. El reloj molecular del núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo se reajusta cada día mediante señales de luz/oscuridad que llegan a través del tracto retinohipotalámico (TRH). A su vez, este reloj central pone “en hora” a numerosos tejidos periféricos como por ejemplo el corazón, tejido vascular y riñones, entre otros, mediante el sistema nervioso vegetativo y señales hormonales.

2.2-Evidencias genéticas de la relación entre la obesidad y alteraciones de los ritmos circadianos.

Expresión de genes reloj en TA

La primera prueba directa de que el adipocito poseía la maquinaria molecular de un reloj biológico, se obtuvo en análisis realizados en animales de experimentación, fue en 2005 cuando Ando y *col.* demostraron en un estudio en ratones obesos que el sistema de genes reloj intracelular actuaba en el TA visceral y que podía estar influenciado por enfermedades como la obesidad y la diabetes tipo 2 (19).

Esta idea fue reforzada con el estudio de Turek y *col.* (20), en el que ratones mutantes “*knock-out*” homocigóticos para *CLOCK* presentaban alterados los ritmos de ingesta, siendo hiperfágicos y obesos, y además desarrollaban síndrome metabólico (SM) caracterizado por hiperleptinemia, hiperlipidemia, esteatosis hepática, hiperglucemia e hipoinsulinemia. Este estudio fue crucial para el conocimiento de la relación entre obesidad y cronodisrupción, y ha constituido la base de estudios posteriores tanto fisiológicos como clínicos y epidemiológicos sobre obesidad, síndrome metabólico y cronobiología.

En 2008, nuestro grupo de investigación llevó a cabo un estudio en humanos (obesos mórbidos), donde quedó demostrado por primera vez que los genes reloj se expresan en el TA visceral y subcutáneo, los resultados de este trabajo, mostraron que la expresión de estos genes está asociada al contenido de grasa abdominal y factores de riesgo cardiovascular del individuo (10), es por ello, que estos genes reloj se proponen como indicadores potenciales en las perturbaciones del SM.

Además la presencia en el individuo de variantes genotípicas (polimorfismos) de los genes del reloj se relacionan con un aumento de la incidencia de obesidad y SM (21, 22).

Polimorfismos de los genes reloj

A partir de estudios de nuestro propio grupo y otros, podemos deducir que la presencia de algunos polimorfismos del gen *CLOCK* (rs3749474, rs4580704 y rs1801260 (3111T/C)), tiene un especial interés por asociarse con el índice de masa corporal (IMC), con la ingesta energética y con diferentes variables relacionadas con la obesidad (23-26).

De hecho, los individuos portadores de las variantes génicas o polimorfismos del *CLOCK*, comían más, dormían menos, ingerían más grasa, y en definitiva estaban más obesos, presentando en particular una mayor obesidad abdominal, caracterizada por ser la de mayor riesgo metabólico y una mayor dificultad para perder peso a lo largo de 28 semanas de tratamiento(27).

Pero quizás de los resultados obtenidos, uno de los más interesantes fue que estas asociaciones entre el polimorfismo genético y obesidad abdominal o alteraciones del metabolismo de la glucosa sólo se demostraban en individuos practicando una alimentación desequilibrada, asociada con un consumo alto de grasas saturadas (bollería industrial, embutidos, etc.) y baja proporción de grasas monoinsaturadas (aceite de oliva). Sin embargo, el polimorfismo carecía de efecto en aquellos sujetos con un consumo en aceite de oliva (ácido oleico) superior a la media.

En esta línea, también se han realizado estudios con otros genes reloj. Diversos trabajos han mostrado que la presencia de ciertos polimorfismos de gen *PER2* se asocia con alteraciones psicológicas entre las que destacan: la depresión estacional y el trastorno bipolar (28). Además, nuestro grupo ha demostrado previamente, que ciertos polimorfismos en *PER2* se asocian también con la obesidad y en especial con la distribución de grasa abdominal (23).

2.3-Evidencias ambientales de la relación entre la obesidad y alteraciones de los ritmos circadianos.

El reloj biológico de los humanos, puede entrar en conflicto con la vida moderna. Como hemos comentado anteriormente, el aumento de la exposición a la luz brillante entre otros factores, acarrea importantes cambios en el estilo de vida de las personas, así encontramos que se ha prolongado la jornada de actividad de trabajo o esparcimiento en perjuicio de las horas de sueño, esto provoca una desregularización interna de los relojes respecto a las condiciones ambientales externas, lo que genera desórdenes en el sueño, insomnio, depresiones estacionales, obesidad, diabetes, etc. (29, 30).

Estudios epidemiológicos muestran que **el trabajo por turnos** está asociado con la obesidad, hipertrigliceridemia, bajos valores de HDL, obesidad abdominal, diabetes y enfermedad cardiovascular (31). Además, se observa que los trabajadores por turnos presentan un aumento de glucosa, insulina y triglicéridos como respuesta metabólica postprandial que deriva en una disrupción de la ritmicidad circadiana de los perfiles de melatonina (32).

Se han encontrado también, resultados interesantes relacionando la **duración del sueño** y el riesgo metabólico. Estudios clínicos muestran que sujetos saludables que restringen a 4 horas la duración del sueño durante 6 noches consecutivas, muestran una alteración en la tolerancia a la glucosa y una disminución de la respuesta de la insulina, que tiene como consecuencia un aumento de las concentraciones de glucosa en sangre (33).

Además, las personas que duermen poco, muestran reducidos significativamente los valores circulantes de la hormona anorexigénica leptina y elevados los valores de la hormona orexigénica ghrelina (34). Esta situación, es bastante importante en niños que tienen una duración del sueño corta, afectada por el día laboral, la estación del año y el ser poseedores de hermanos más jóvenes, todo ello, se ha descrito como un factor de riesgo independiente para la obesidad (33).

Por otro lado, estudios en animales de experimentación, muestran que los ciclos de reposo/actividad y de ayuno/ingesta son dos importantes sincronizadores externos del los relojes periféricos.

En este sentido los **horarios de actividad física y de alimentación** pueden jugar un papel relevante en el sistema circadiano, y en su relación con la obesidad.

Recientemente, se ha demostrado que el mismo ejercicio realizado en diferentes momentos del día puede tener distinto efecto sobre nuestro sistema circadiano (35). Así, en una muestra realizada en mujeres deportistas jugadoras de rugby, se demostró que cuando se realizaba actividad física matutina, como ir a correr a las 9 AM, la temperatura corporal periférica presentaba un ritmo diario mejorado respecto a la semana control. Sin embargo cuando estas jugadoras realizaban el mismo ejercicio,

correr durante 60 minutos, por la noche a las 9 PM, el ritmo de temperatura presentaba alteraciones tales como una menor amplitud, retraso de acrofase, una mayor variabilidad intradiaria, etc. (35).

La dieta es otro de los factores sincronizadores de relojes periféricos, la alimentación presenta una distribución circadiana bi o trimodal con 2 o 3 comidas diarias, en donde los intervalos le deben permitir al organismo hacer la digestión para aprovechar al máximo los nutrientes de los alimentos y distribuirlos en los depósitos del cuerpo.

En relación a esto, el apetito y la selección de alimentos cambian a lo largo del día y las estaciones del año, lo que sugiere necesidades diferenciales del cuerpo en distintos horarios o épocas. Parece ser que la tolerancia a los lípidos es más favorable en las primeras horas del día y más baja de noche (36). La hormona insulina aumenta de mañana para propiciar el uso de glúcidos mientras que las enzimas gástricas aumentan su actividad al anochecer para favorecer la digestión. Para el diagnóstico de la diabetes, la tolerancia a la glucosa cambia a lo largo del día, y es menor de tarde (de 14 a 18 horas) (36).

Un reciente estudio corrobora estos resultados, ya que tras realizar un test de tolerancia de glucosa después de administrar 75 g de glucosa, en las mismas mujeres, por la mañana y por la noche, la tolerancia a la glucosa resultó ser menor por la noche, presentándose a su vez una mayor resistencia a la acción de la insulina (37).

En los últimos años la proporción de adultos que **se saltan el desayuno** ha aumentado de un 14 % a un 25 % (38), lo cual plantea la cuestión de si podría haber una relación causal del horario de la comida en la obesidad. Así, durante años se ha

hipotetizado que saltarse el desayuno y trasladar la ingesta energética hacia la tarde-noche, supone un aumento del riesgo de obesidad y de diabetes tipo 2. Sin embargo, no ha sido hasta estos últimos años, cuando se ha empezado a demostrar que el momento de la ingesta, es un factor clave en la obesidad y que puede ser independiente de la ingesta calórica diaria.

Así, en el año 2009, los datos experimentales en animales mostraron que la inversión del ciclo de alimentación/ayuno, sin cambios en la ingesta calórica total, provocaba un aumento dramático de la ganancia de peso con una dieta de alto contenido graso (39), resultados que fueron confirmados con estudios posteriores usando diferentes modelos animales y diferentes diseños de estudio.

También en el año 2009, datos experimentales en humanos en condiciones controladas de laboratorio (incluyendo una dieta isocalórica) mostraron que una inversión de 12–horas del ciclo ayuno/ingesta y el sueño/ vigilia (comer durante la noche y ayunar durante el día) se acompañaba de una alteración de la tolerancia a la glucosa y una disminución de las concentraciones plasmáticas de la hormona de la saciedad, leptina (40).

3.-CARACTERIZACIÓN CRONBIOLÓGICA EN LA PRÁCTICA CLÍNICA.

Una de las principales dificultades que nos encontramos a la hora de estudiar o diagnosticar la salud del sistema circadiano en la práctica clínica, es que debemos realizar múltiples medidas a lo largo de las 24h del día en los individuos. Además, es necesario en la medida de lo posible, poder determinar estos ritmos sin el uso de técnicas invasivas.

Los estudios de laboratorio, presentan capacidad de realizar múltiples determinaciones, en sangre, saliva, electrocardiogramas, polisomnografías, etc. Pero muchas veces estos estudios no captan la realidad del individuo en su vida diaria. Por eso, son necesarias **técnicas no invasivas que permitan el estudio del sistema circadiano en la vida diaria del individuo.**

Los relojes biológicos son poco o nada accesibles, por ello, en muchos casos debemos recurrir a una medida indirecta de su funcionamiento. Los ritmos comportamentales (serían como las manecillas del reloj) nos indican cómo funciona su maquinaria, entre ellos se incluye: la actividad motora, ritmos de alimentación, temperatura corporal (ya sea central o periférica), frecuencia cardiaca, presión arterial, fuerza muscular y la secreción de la mayoría de las hormonas, especialmente melatonina y cortisol, todos ellos presentan ritmos robustos y constituyen buenos indicadores del funcionamiento del sistema circadiano.

Lo ideal, si es técnicamente posible, es que se registren simultáneamente dos o más ritmos marcadores de un mismo organismo.

3.1.-Representación gráfica y análisis de los ritmos circadianos.

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

Entre los parámetros que caracterizan los ritmos circadianos, el período o tiempo que tarda en repetirse una oscilación completa y su inversa, la frecuencia o números de ciclos por unidad de tiempo, son los que se han utilizado tradicionalmente para caracterizar los diferentes ritmos biológicos (41). A medida que vamos aumentando la frecuencia de muestreo, nos vamos aproximando más a la situación real.

El concepto de ritmo u oscilación está claramente definido en matemáticas o en la física, y denomina la repetición del valor de un parámetro cada cierto intervalo de tiempo. El modelo matemático más sencillo capaz de explicar y que menos prejuzga la naturaleza del ritmo es el correspondiente a la función sinusoidal (método del cosinor).

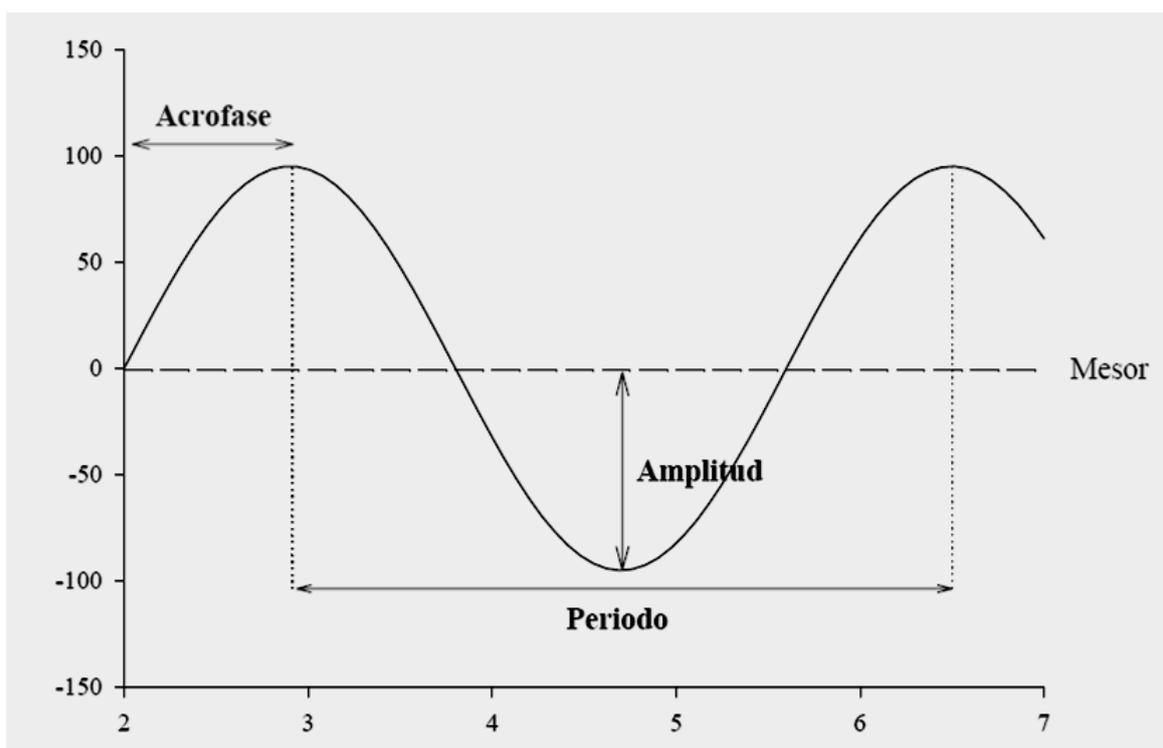


Figura 4. Parámetros que caracterizan los ritmos biológicos ajustados a una sinusoidal: mesor, acrofase, amplitud y periodo.

Los parámetros que definen un ritmo son:

- Periodo, es el intervalo de tiempo entre dos puntos iguales de ritmo.
- Valor medio o mesor, es la media aritmética de todos los valores obtenidos dentro de un ciclo.
- Amplitud, es la diferencia entre el valor máximo y el valor medio de una oscilación.
- Acrofase, es el momento en el que la variable alcanza el valor máximo del ritmo.

3.2.-Técnicas cronobiológicas en la práctica clínica.

3.2.1.- Temperatura corporal

La medición de la temperatura puede ser de gran utilidad en la práctica clínica para determinar ritmicidad.

La temperatura central, ha demostrado ser un marcador adecuado de los ritmos circadianos del individuo, sin embargo su medición no siempre es posible en la práctica diaria. Una aproximación podría ser la medición de la temperatura periférica. Hemos de tener en cuenta que el ritmo circadiano de temperatura corporal central y periférica son inversos, de tal forma que un ritmo de temperatura central coincide aproximadamente con un mínimo en la periférica y *viceversa*.

Básicamente, la vasodilatación periférica ayuda a disipar el calor corporal disminuyendo la temperatura central, (por eso el ritmo de temperatura periférica muestra una oposición de fase con respecto al de temperatura central), mientras que una vasoconstricción periférica ayuda a la elevación de la temperatura central (42).

La representación gráfica del patrón circadiano de temperatura periférica medida en la muñeca, se caracteriza por presentar una elevación de dichos valores previo a la hora de apagar la luces (acostarse), un estado estable en forma de meseta durante la noche con altas temperaturas y un descenso pronunciado de la misma al despertar y después de levantarse por la mañana, en las horas asociadas a la siesta presenta un segundo pico, coincidente con el periodo postprandial y por ultimo una zona de mantenimiento del despertar con valores bajos de temperatura.

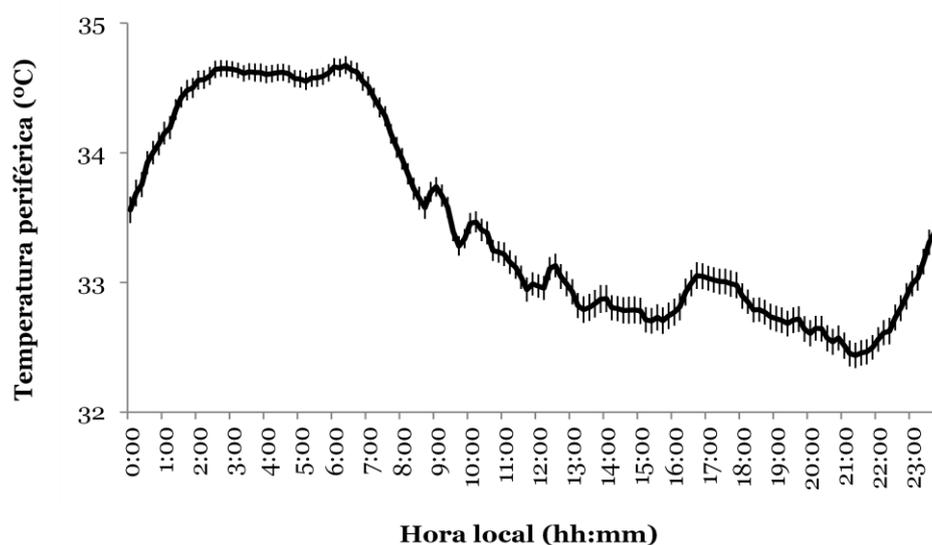


Figura 5. Ritmo circadiano de temperatura periférica. Datos tomados del Departamento de Fisiología de la Universidad de Murcia. Grupo de Nutrición.

En 2011, Garaulet y *col* mostraron las diferencias en los patrones de temperatura periférica en mujeres obesas y normo peso, demostrando la existencia de una fuerte asociación entre la obesidad y perturbaciones de éstos ritmos (27).

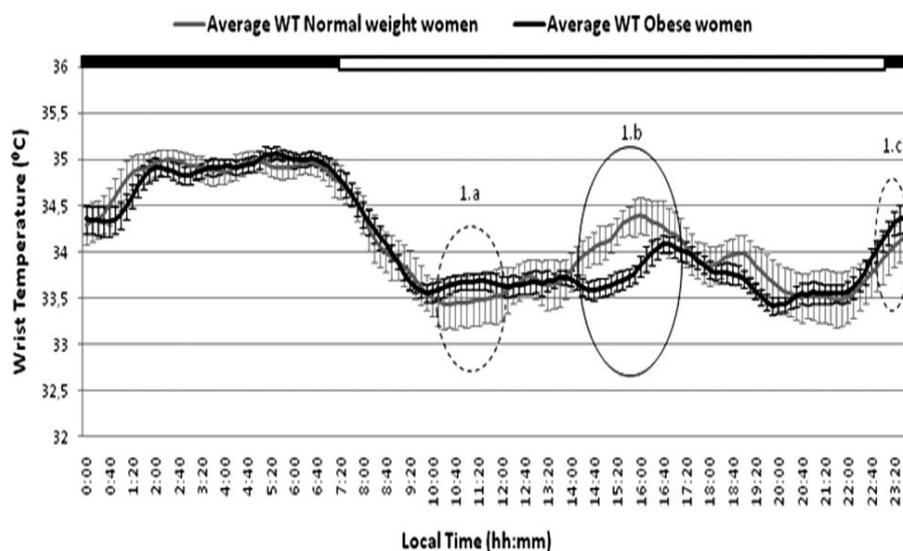


Figura 6. Onda media de temperatura periférica medida durante 3 días consecutivos en mujeres obesas y normo peso. Corbalan-Tutau y col. *Chronobiol Int.* 2011.

Cabe destacar que durante el día el aumento de la temperatura periférica coincide con la hora de la digestión de los alimentos (periodo postprandial). En este sentido, las diferencias en la ingesta (que podría ser mayor en la población obesa) y las diferencias en la acción dinámica específica de los alimentos, podrían ser en parte los responsables de este aumento diferencial en la producción de calor postprandial entre mujeres obesas y normo peso (27, 43). A su vez, la ausencia de este pico postprandial ha sido considerada en estudios previos como un marcador de CD y se ha relacionado con alteraciones metabólicas(44).

3.2.2.-Cortisol

Otro importante indicador de la función del eje hipofisario-adrenal es el cortisol. La periodicidad de 24 horas en la secreción de dicho eje, se considera como un paradigma de la ritmicidad circadiana en humanos. Empieza a manifestarse a la edad de 6 meses y persiste en adultos hasta la ancianidad.

Los perfiles diarios de cortisol plasmáticos son paralelos a los de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) y similares en ambos sexos. Este patrón muestra un máximo al principio de la mañana, una disminución a lo largo del día y un período nocturno de baja concentración, lo que nos permite mantener un grado de actividad alto durante el día en contraste con el período nocturno

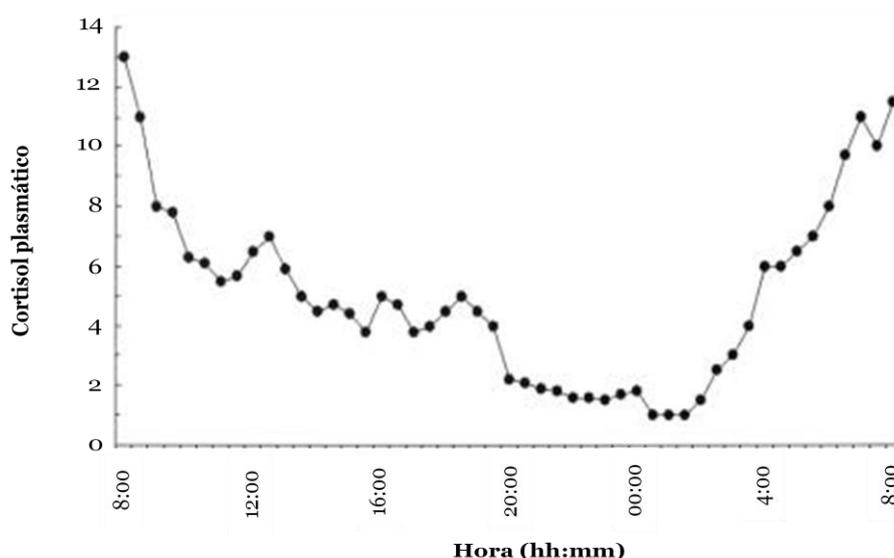


Figura7. Patrón circadiano de cortisol. Born J, Fehm HL. Noise Health 2000.

El hecho de que el ritmo circadiano de cortisol tenga una gran reproductibilidad y amplitud, hace que se utilice frecuentemente como marcador del estado del marcapasos circadiano.

Una menor amplitud de la variación circadiana de cortisol (diferencia entre los valores de mañana y noche), ha sido asociado previamente con la obesidad, en concreto con la obesidad abdominal (44). El cortisol también ha sido identificado como un marcador de la función neuroendocrina que puede estar influenciada por el estrés psicológico u otros factores (45, 46). Además, el cortisol y sus variaciones a lo largo de 24h, puede ser medido en saliva, presentando estos valores una reproductibilidad muy

alta de lo que se encontraría en sangre. Sus ritmos circadianos tan marcados y reproducibles, así como su fácil accesibilidad, hacen del cortisol uno de los mejores marcadores en la práctica clínica.

3.2.3.-Estudio del sueño: Polisomnografía (PSG)

Entre las oscilaciones circadianas que sufre el organismo, una de las más importantes es el ritmo de temperatura corporal, pero hay múltiples indicios que muestran una fuerte correlación entre el ritmo de temperatura corporal y el sueño.

Además de los estudios ya relatados anteriormente, en donde se relaciona la duración del sueño y el SM, Eve Van Cauter y Kristen Knutson (33) han explicado en su trabajo titulado “Sueño y la epidemia de obesidad en niños y adultos” que la falta de sueño puede afectar al balance energético y como resultado influir en la ganancia de peso. En un sujeto adulto normal el sueño se caracteriza por ser continuo, y en él se pasa paulatinamente de un estado de vigilia hacia otro de sueño más ligero para terminar en un estado de sueño más profundo. Este patrón se repite a lo largo de la noche en ciclos cuya composición básica se encuentra dividida de modo arbitrario en fases que se representa gráficamente en el siguiente hipnograma.

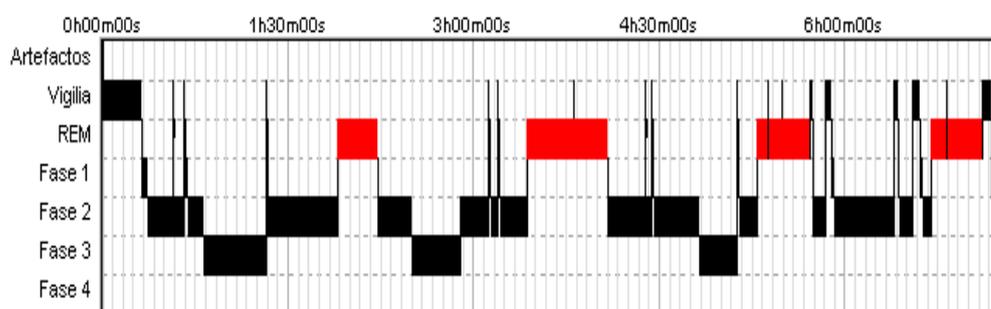


Figura 8. Hipnograma, representa los patrones de las distintas fases del sueño.

La calidad del sueño se mide mediante parámetros tales como, latencia de sueño, número de despertares, facilidad para conciliar el sueño después de despertarse y duración total del mismo, estos parámetros definen la estructura del sueño y se obtienen objetivamente mediante registros polisomnográficos.

La PSG es el estudio del sueño y mediante la monitorización del sujeto se recoge la actividad bioeléctrica cerebral y variables de tipo cardiorrespiratorio (flujo respiratorio, esfuerzo torácico y abdominal, electrocardiograma, saturación de oxígeno), posición corporal, ronquido y electromiografía de extremidades que el individuo produce durante el sueño con el objeto de estudiar y diferenciar las distintas patologías del mismo.

Por lo tanto el estudio de la arquitectura del sueño mediante esta técnica nos ayudaría a progresar en el reconocimiento de las características del sueño y su asociación con la obesidad.

3.2.4.-Actimetría

La actimetría, es una técnica de evaluación del comportamiento relativamente reciente. Es un método simple y no invasivo que permite evaluar indirectamente el ritmo sueño-vigilia, por lo tanto, se puede considerar un marcador del ritmo.

El método consiste en la obtención de un registro prolongado de datos mediante el empleo de un dispositivo denominado actímetro, que registra y almacena información sobre el movimiento corporal. La monitorización consiste en cuantificar los movimientos realizados por el paciente mediante medidas de la aceleración

resultante de dichos movimientos. A partir de la información proporcionada por el actímetro, definimos dos variables: actividad motora (A) y posición del cuerpo (P).

La representación gráfica del patrón circadiano de actividad y posición, se caracteriza por presentar valores bajos durante la noche (sueño) y valores más elevados durante el día (vigilia).

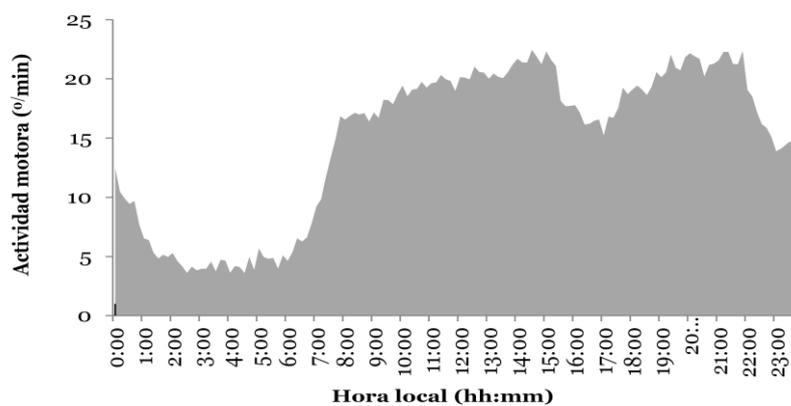


Figura 9. Ritmo circadiano de la actividad motora. Datos tomados del Departamento de Fisiología de la Universidad de Murcia. Grupo de Nutrición.

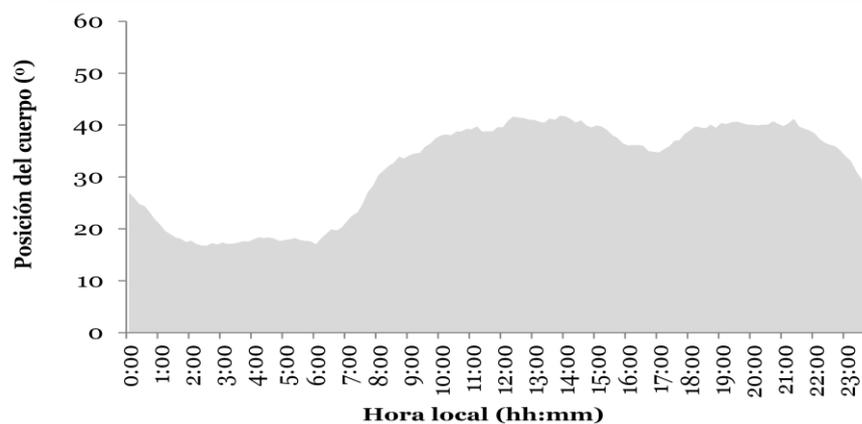


Figura 10. Ritmo circadiano de la posición del cuerpo. Datos tomados del Departamento de Fisiología de la Universidad de Murcia. Grupo de Nutrición.

3.2.5.-TAP

La existencia de los artefactos y los diferentes factores de enmascaramiento para las variables rítmicas de temperatura, actividad y posición, considerados marcadores circadianos, llevaron a proponer a Ortiz-Tudela y *col.* (47) la integración de estas tres variables en una sola para evaluar el estado del sistema circadiano humano en condiciones normales de vida.

Valores bajos de TAP implican la coexistencia de baja actividad, posición horizontal y alta temperatura. Este método sencillo y no invasivo, permite la evaluación del ciclo de sueño-vigilia de un paciente en su ambiente (casa/normal) a un coste mucho más bajo que la PSG (48).

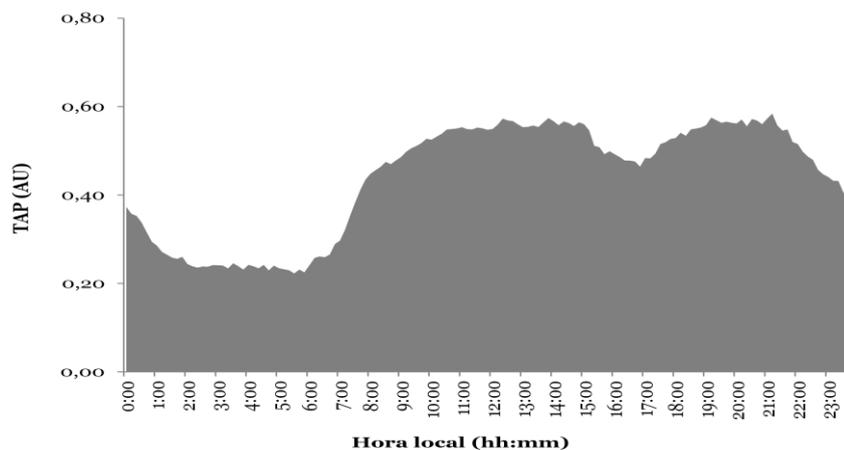


Figura 11. Ritmo circadiano de la variable integrada TAP. Datos tomados del Departamento de Fisiología de la Universidad de Murcia. Grupo de Nutrición

3.2.6.-Electrocardiograma (ECG)

La función del sistema nervioso autónomo (SNA) es regular la función de los órganos, según cambian las condiciones medioambientales. Existe una larga historia de

epidemiología clínica en humanos que indica que el infarto de miocardio y las crisis de hipertensión alcanzan picos a ciertas horas durante el día (49). Estudios epidemiológicos muestran que el trabajo por turnos está asociado con la obesidad abdominal, bajos valores de HDL, diabetes y enfermedad cardiovascular (31).

El estudio de la variabilidad del ritmo cardíaco a partir de los registros de ECG a corto y largo plazo, supone una herramienta valiosa en la contribución al diagnóstico de la disfunción autonómica cardiovascular, proporcionando un método de valoración que puede compensar la mayoría de las limitaciones de las medidas casuales, pudiendo llegar a convertirse en un procedimiento usual para la caracterización de los patrones circadianos de la función cardíaca. Así, la variabilidad de la frecuencia cardíaca, puede proporcionar información de diagnóstico sobre la primera disfunción autonómica subclínica en la obesidad (50).

4.-PÉRDIDA DE PESO Y CRONODISRUPCIÓN:

Una vez establecida la relación entre obesidad y cronobiología, la comunidad científica se plantea un nuevo reto: *¿Hasta qué punto la cronobiología puede ser utilizada en el tratamiento de la obesidad?*

En este sentido, los estudios realizados son escasos pero prometedores. Nuestro grupo de investigación ha colaborado al establecimiento de las bases futuras del uso de la cronobiología en el tratamiento de la obesidad, abarcando tres aspectos diferentes 1) Detección de la CD asociada a la obesidad en la práctica clínica, 2) Horario de comida y pérdida de peso y 3) genética de genes reloj y pérdida de peso.

4.1.-Aplicación de un score metabólico en la práctica clínica de la obesidad.

Corbalán-Tutau y *col*, muestran en un reciente estudio, que el uso de técnicas no invasivas y fáciles de medir basadas en: temperatura periférica, hora de inicio y final de sueño y una medida de cortisol salivar por la mañana, podrían ser suficientes para caracterizar la cronobiología de la obesidad.

A partir de los datos obtenidos mediante estas técnicas han diseñado un “**índice de cronodisrupción**” el cual clasifica a los pacientes obesos en dos grupos en función de sus alteraciones circadianas. Además, han demostrado que aquellos individuos que tienen CD son también los que presentan un aumento de los diversos componentes del SM (51).

Por tanto, una de las preguntas que se nos plantea, ya caracterizada la asociación entre obesidad y CD, es si aquellas personas que presentan una mayor CD tienen mayor resistencia a la pérdida de peso.

Por ello, se hace necesario futuros estudios basados en la determinación del estado cronobiológico del individuo y de esta forma poder evaluar si la ritmicidad circadiana pudiera ser un buen marcador en la eficacia de la pérdida de peso, y así diseñar estrategias personalizadas de tratamiento basadas en sincronizadores, tales como, horarios, luz, ingesta o actividad física. O intervenciones sobre el horario de sueño, en especial, en aquellos portadores de la variante génica de riesgo en los genes reloj, de los individuos que acuden a perder peso a Centros de Nutrición.

4.2.-Cambios ambientales relacionados con el horario de la comida.

Quizá, el estudio de mayor relevancia en este campo, haya sido el estudio longitudinal realizado por el grupo de investigación de la Doctora Marta Garaulet en colaboración con el grupo de Sueño de la Universidad de Harvard, dirigido por el Prof. Frank Scheer y publicado en 2013 en la revista *International Journal of Obesity* (52).

En él, ha quedado demostrado que en España, en una población mediterránea, **el momento de la comida principal del día era predictivo de la pérdida de peso**. Estos resultados se mostraron en 420 personas obesas y con sobrepeso durante una intervención dietética de 20 semanas y resultó que este efecto era independiente de la ingesta total de calorías.

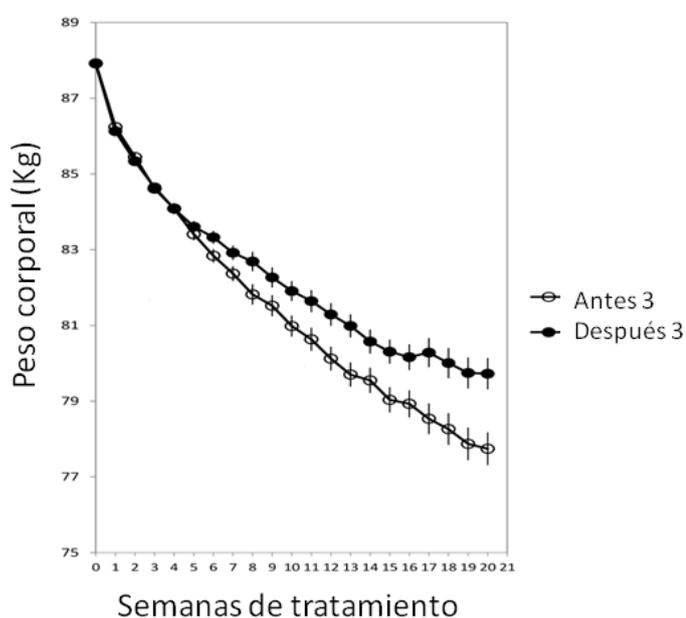


Figura 12. Diferencias en la pérdida de peso durante 20 semanas de tratamiento entre comedores tempranos (antes de las 15:00h) y comedores tardíos (después de las 15:00 h). *Garaulet M. Int J Obes.*

La importancia de este artículo radica en que es el primer trabajo en demostrar que no sólo “qué” comemos sino también “cuándo” lo hacemos es decisivo en la pérdida de peso. Además, los resultados previos fueron sorprendentes ya que tanto los comedores tempranos (antes de las 15:00h) como los tardíos (después de las 15:00h) presentaron ingestas y gastos energéticos semejantes, lo que hace necesario encontrar una explicación metabólica a estos resultados.

Cambios más sutiles en el horario de las comidas, es decir, en la distribución de la ingesta calórica durante un periodo normal de vigilia, podrían influir en el éxito de la terapia de la pérdida de peso. Por ejemplo, un reciente estudio experimental de 12 semanas de duración ha mostrado que los sujetos a los que se les asignaba una alta ingesta de calorías durante el desayuno (aprox. 700 kcal) perdían significativamente más peso que aquellos a los que se les asignaba un alto consumo de calorías durante la cena (también 700 kcal) (53).

Por otro lado, un resultado relevante del estudio de comedores tempranos y tardíos, fue que **la sensibilidad a la insulina según las estimaciones de HOMA-IR** era menor en los comedores tardíos en comparación con los comedores tempranos (52).

Además en el estudio de Jakubowicz D y col, 2013 (53), los autores también demostraron a través del análisis de una curva oral de glucosa así como la de insulina, que los comedores de “cena de altas calorías” presentaban una mayor intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina que los comedores de desayuno, tras el tratamiento de pérdida de peso. Es conocido, que la insulina desempeña un papel fundamental en el equilibrio energético y cualquier alteración en su secreción y acción, puede

desencadenar mecanismos que modifican el metabolismo energético originado de la alteración de la oxidación de los macronutrientes (54).

El horario de las comidas también ha demostrado que es capaz de afectar a la pauta diaria en los glucocorticoides y los relojes circadianos en los tejidos metabólicos tales como el tejido adiposo, el hígado y el páncreas en estudios con animales (55, 56). Sin embargo el mecanismo es desconocido.

Por tanto el estudio de factores tales como diferencias en el gasto energético postprandial, diferente utilización del sustrato metabólico, cambios en el metabolismo de los carbohidratos o alteraciones en variables relacionadas con el sistema circadiano, como la variabilidad diaria del cortisol o las variaciones de temperatura corporal a lo largo de las 24h del día, podrían explicar la peor respuesta metabólica de los comedores tardíos y mejorar así la efectividad en la terapia de pérdida de peso.

Otro factor que podría ser determinante en la caracterización cronobiológica de la obesidad, es el estudio de los cambios de la microbiota oral, en función de la hora de la comida.

Existen estudios que muestran cambios en los grupos de bacterias de la saliva antes y después de las comidas (57), pero se desconoce si la hora de la comida es un factor determinante en estos cambios, que pudiera explicar las alteraciones en ingesta y en energía entre los comedores tempranos (antes de las 15:00h) y los comedores tardíos (después de las 15:00h) relacionados con la pérdida de peso. Son necesarios estudios de laboratorio controlados para responder a estas cuestiones.

4.3.-Genética del reloj y pérdida de peso en el tratamiento de la obesidad.

El descubrimiento del reloj molecular responsable de la generación de los ritmos circadianos señala a los genes relacionados con la maquinaria molecular del reloj circadiano como candidatos en el estudio de la vulnerabilidad genética a la obesidad.

Además de los estudios ya nombrados a lo largo de esta memoria en relación a la asociación entre la obesidad y diferentes variantes génicas en los genes reloj, tales como gen *CLOCK* (rs3749474, rs4580704 y rs1801260 (3111T/C), así como la interacción entre estas variantes génicas y la dieta para la obesidad, como es el caso de la interacción del gen *CLOCK* con la ingesta de grasas saturadas para el perímetro de cintura, etc., nuestro grupo de investigación demostró que aquellas personas portadoras de la variante génica en *PER2* tenían conductas, hábitos y emociones **obesogénicas** que influían en **el éxito del tratamiento de pérdida de peso**, los portadores del alelo de riesgo abandonaban el tratamiento antes que los no portadores, además también presentaban conductas que influían en el peor pronóstico en la pérdida de pesos tales como: picoteo, estrés por la dieta y consumo de alimentos como escape al aburrimiento (23).

Pero quizá los resultados más llamativos en relación a los genes del reloj fisiológico y la pérdida de peso sean nuestros resultados sobre el polimorfismo *CLOCK* 3111T/C, ya que parecen indicar que existe una asociación entre esta variante génica del *CLOCK* y la pérdida de peso.

Así, un trabajo publicado por nuestro grupo en *International Journal of Obesity* en 2010, muestra que los portadores del alelo C presentan mayor resistencia a la

pérdida de peso y diferentes cambios metabólicos cuando se somete a estos individuos a una dieta hipocalórica (23).

De hecho, en otra publicación reciente se ha demostrado que los pacientes portadores del alelo menor C en *CLOCK* 3111T/C tienden a presentar una menor duración del sueño, preferencias por la noche, es decir son de cronotipo vespertino, aumento de ghrelina (hormona relacionada con el apetito) y una tendencia a presentar peores hábitos alimentarios, alejados de la dieta mediterránea (58). Sin embargo, habría que demostrar:

- a) si los portadores del alelo de riesgo C presentan **alteraciones en su sistema circadiano (CD)** al compararse con los no portadores T por un lado,
- b) y en el caso de que existieran estas alteraciones, sería necesario estudiar si esta **CD podría ser un factor predictivo** de una peor respuesta a los tratamientos de pérdida de peso.
- c) además, se deberían realizar **estudios de otros factores relacionados con el Sistema Nervioso Autónomo**, ya que es otro elemento que podría estar influyendo en las diferencias entre portadores y no portadores del alelo de riesgo C en *CLOCK* 3111T/C.

*“Entre el día y la noche
hay un territorio inexplorado.*

*No es sol ni es sombra:
es tiempo”.*

Octavio Paz

Hipótesis y objetivos

II.-HIPÓTESIS DE PARTIDA Y OBJETIVOS.

Sabemos que la genética está detrás de nuestra maquinaria circadiana. De hecho, el polimorfismo de un sólo nucleótido (SNP) del gen *CLOCK* 3111T/C, ha sido previamente relacionado con la obesidad y la pérdida de peso. Sin embargo, la asociación fenotípica y la funcionalidad del locus *CLOCK* 3111 es aún desconocida.

Estudios previos de nuestro grupo de investigación han mostrado que la cronobiología se asocia de manera relevante con la obesidad. Además, estudios de asociación entre pérdida de peso y genes reloj realizados en una población de 1475 pacientes que acudieron a diferentes centros de adelgazamiento en España, muestran que aquellos portadores de la variante de riesgo (C) en *CLOCK* 3111, presentan una mayor dificultad de pérdida de peso que los portadores de la variante más frecuente (T). Sin embargo no se conoce el por qué de esta relación.

Por otro lado nuestro grupo también ha demostrado que la hora de la comida principal del mediodía es un factor predictivo de la pérdida de peso. Así, en una población mediterránea del sureste de España ($n=420$), se ha demostrado que aquellos individuos que comen tarde (después de las 15:00 h) presentan una mayor resistencia a la pérdida de peso que los que comen temprano (antes de las 15:00 h). Un resultado interesante fue que no existían diferencias significativas en la ingesta ni en el gasto energético entre comedores “tempranos” y “tardíos”. Sin embargo, la estimación del gasto energético se realizó a partir de la ecuación de Harris y Benedict multiplicado por un factor de actividad, y se hacen necesarios estudios más precisos en el gasto energético que aporten una explicación fisiológica a este fenómeno.

Por todo ello, pensamos que la existencia de alteraciones en la ritmicidad circadiana podría estar influyendo en la asociación del gen *CLOCK* y la respuesta a una dieta de adelgazamiento.

Además teniendo en cuenta que la hora de la comida es uno de los sincronizadores externos de nuestros relojes periféricos, el retraso de la misma puede producir cambios en los patrones diarios de variables relacionadas con nuestro sistema circadiano, como el cortisol y la temperatura periférica, y con procesos metabólicos, como pueden ser alteraciones en el gasto energético, el cociente respiratorio corregido o en la glucosa. Este hecho podría explicar la peor respuesta metabólica de los comedores tardíos a la dieta.

Por último, creemos que la genética podría estar influyendo en alguna de estas alteraciones circadianas asociadas a una peor respuesta a la dieta. Por ello pensamos que estas características estarán presentes en los portadores del alelo menor (C) del *CLOCK* 3111T/C.

Considerando estos estudios preliminares y en base a nuestra hipótesis de partida, **el objetivo global** de esta tesis doctoral es investigar los aspectos cronobiológicos que existen tras la mejor o peor respuesta de pérdida de peso ante una dieta de adelgazamiento, y tratar de explicar los resultados previos en relación a los genes reloj y a los horarios de comida.

Para conseguir dar respuesta a nuestro objetivo global nos hemos propuesto los siguientes **objetivos específicos**:

- 1.** Investigar la posible relación entre la pérdida de peso y la ritmicidad circadiana, utilizando la temperatura periférica medida en la muñeca y mediciones de actimetría, en mujeres sometidas a un programa de pérdida de peso, con el fin de evaluar si la ritmicidad circadiana pudiera ser un marcador de la eficacia en la pérdida de peso.
- 2.** Estudiar la influencia del horario de las comidas en el gasto energético en reposo, la termogénesis inducida por la dieta, la oxidación de sustratos, la tolerancia a la glucosa, y las medidas relacionadas con el sistema circadiano, incluyendo la diferencia de la mañana-tarde del cortisol y el perfil diario de la temperatura de la muñeca, como posibles mecanismos subyacentes a los efectos diferenciales del horario de las comidas en el metabolismo.
- 3.** Determinar, en condiciones de vida ambulatoria, si la presencia del alelo menor C del gen *CLOCK* 3111 en mujeres con sobrepeso pudiera estar relacionado con los trastornos circadianos, y con cambios en la calidad del sueño y así mejorar la comprensión de las asociaciones previamente demostradas con la obesidad y la reducción de la pérdida de peso de los portadores C.

*“Y cuando por fin encontré respuesta a la vida
entonces me cambiaron las preguntas”*

M. Benedetti

Capítulos experimentales

III.-CAPITULOS EXPERIMENTALES.

1.-ARTICULO 1:

**“CIRCADIAN RHYTHMICITY AS A PREDICTOR OF WEIGHT-LOSS
EFFECTIVENESS”.**

C Bandín, A Martínez-Nicolás, JM Ordovás, JA Madrid, M Garaulet

International Journal of Obesity (2013), 1–6

(Índice de Impacto=5,386; cuartil:1º)

<https://www.nature.com/ijo/>

Circadian rhythmicity as a predictor of weight-loss effectiveness.

C Bandín, A Martínez-Nicolás, JM Ordovás, JA Madrid, M Garaulet

Resumen

Uno de los principales desafíos asociados al éxito en los tratamientos dietéticos de control de peso es la identificación de aquellas personas que no responden a las intervenciones específicas.

Objetivo: Investigar la posible relación entre la pérdida de peso y la ritmicidad circadiana, utilizando para ello la temperatura de la muñeca y mediciones de actimetría, en mujeres sometidas a un programa de pérdida de peso, con el fin de evaluar si la ritmicidad circadiana pudiera ser un marcador de la eficacia de los tratamientos de pérdida de peso.

Métodos: Los participantes fueron 85 mujeres con sobrepeso y obesidad (índice de masa corporal, IMC: $30.24 \pm 4.95 \text{ kgm}^{-2}$) sometidas a un programa de reducción de peso basado en la dieta mediterránea. La eficacia del tratamiento se definió mediante tres indicadores: pérdida de peso total, porcentaje de pérdida de peso respecto al peso inicial y pérdida de peso semanal. La ritmicidad circadiana se determinó mediante tres variables: temperatura de la muñeca, actividad motora y posición del cuerpo, todas ellas se analizaron utilizando diferentes sensores.

Resultados: La pérdida de peso menor se relacionó con un patrón de temperatura más aplanado. Nuestros resultados mostraron que a menor pérdida de peso menor amplitud de cosinor ($r = 0,235$, $p = 0,032$), una mayor fragmentación del

ritmo determinado por una mayor variabilidad intradiaria (IV) ($r = 0,339$, $p = 0,002$), y un deterioro del ritmo circadiano de temperatura de muñeca determinado por Índice Funcionalidad Circadiana (CFI) ($r = 0,228$, $p = 0,038$). Análisis posteriores mostraron que aquellos individuos con baja respuesta al tratamiento (LR) presentaban una amplitud menor ($0,71 \pm 0,36$ frente a $1,24 \pm 0,62$, $p = 0,036$) y una mayor fragmentación del ritmo circadiano ($0,24 \pm 0,11$ frente a $0,15 \pm 0,07$, $p = 0,043$) que los pacientes con respuesta elevada (HR). Mientras que no se encontraron diferencias significativas en la tasas de actividad entre los pacientes con respuesta elevada y baja respuesta, si encontramos diferencias significativas en los valores medios de la posición del cuerpo entre los (HR) ($39,12 \pm 3,791$) en comparación con las mujeres (LR) ($35,31 \pm 2,531$, $p = 0,01$).

Conclusión: Los ritmos circadianos en el inicio del tratamiento son buenos indicadores de la futura pérdida de peso. El tratamiento adicional debe considerar aspectos cronobiológicos para diagnosticar la obesidad y la eficacia de los tratamientos.

2.-ARTICULO 2:

**“MEAL TIMING AFFECTS GLUCOSE TOLERANCE, SUBSTRATE
OXIDATION AND CIRCADIAN-RELATED VARIABLES: A RANDOMIZED,
CROSSOVER TRIAL”.**

Bandín C, Scheer FAJL, Luque AJ, Ávila-Gandía V, Zamora S, Madrid JA, Gómez-
Abellán P, Garaulet M

International Journal of Obesity (2014), 1-6

(Índice de Impacto=5,386; cuartil:1º)

<https://www.nature.com/ijo/>

Meal timing affects glucose tolerance, substrate oxidation and circadian-related variables: a randomized, crossover trial.

Bandín C, Scheer FAJL, Luque AJ, Ávila-Gandía V, Zamora S, Madrid JA, Gómez-Abellán P, Garaulet M.

Resumen

El momento de la ingesta de alimentos está asociado a la regulación de peso corporal, la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa. Sin embargo, el mecanismo es desconocido.

Objetivo: Investigar los efectos de los cambios en el horario de las comidas sobre el gasto de energía, la tolerancia a la glucosa y variables circadianas.

Métodos: 32 mujeres [edad 24 ± 4 e IMC $22,9 \pm 2,6$ kg/m²] participaron en este estudio. Se llevó a cabo en dos protocolos diseñados de forma aleatoria y cruzada. Para el protocolo (P1) (n = 10) se realizaron medidas de gasto energético en reposo mediante calorimetría indirecta y tolerancia a la glucosa durante el periodo postprandial, para el protocolo (P2) se incluyeron mediciones relacionadas con el sistema circadiano basados en perfiles de cortisol salivar y temperatura periférica medida en la muñeca (n = 22). En cada protocolo, los participantes se les proporcionó comidas estandarizadas (desayuno, almuerzo y cena) durante las dos semanas de intervención y se estudiaron bajo dos condiciones: comiendo temprano (EE y el almuerzo a las 13:00h) y comiendo tarde (LE y el almuerzo 16:30h).

Resultados: LE, en comparación con EE, antes de comer presentan menor gasto energético (P = 0,048), un cociente respiratorio corregido (CRQ) más bajo y un perfil después

de la comida modificada del CRQ ($P = 0,019$). Estos cambios reflejan una utilización antes de comer significativamente más bajo de hidratos de carbono cuando comparamos LE vs EE ($P = 0,006$). LE también aumentó el área bajo la curva de la glucosa, después de comer en un 46%, lo que demuestra disminución de la tolerancia a la glucosa ($P = 0,002$). También se encontraron cambios en el perfil diario de cortisol y de temperatura en LE, el perfil de cortisol con menores valores en la mañana, y una supresión del pico postprandial de temperatura ($P < 0,05$).

Conclusiones: Comer tarde se asoció con una disminución del gasto energético en reposo, una disminución de la oxidación de carbohidratos en ayunas, disminución de tolerancia a la glucosa, con un perfil diario más aplanado en las concentraciones de cortisol libre y una disminución del efecto térmico de los alimentos según la temperatura periférica medida en la muñeca. Estos resultados pueden estar implicados en los efectos diferenciales de horario de las comidas en la salud metabólica.

3.-ARTICULO 3:

**“DIFFERENCES IN CIRCADIAN RHYTHMICITY IN CLOCK 3111T/C
GENETIC VARIANTS IN MODERATE OBESE WOMEN AS ASSESSED BY
THERMOMETRY, ACTIMETRY AND BODY POSITION”.**

C Bandín, A Martínez-Nicolás, JM Ordovás, JA Ros Lucas, P Castell, T Silvente, JA
Madrid, M Garaulet

International Journal of Obesity (2012), 1–7

(Índice de Impacto=5,386; cuartil:1º)

<https://www.nature.com/ijo/>

Differences in circadian rhythmicity in CLOCK 311T/C genetic variants in moderate obese women as assessed by thermometry, actimetry and body position.

C Bandín, A Martínez-Nicolás, JM Ordovás, JA Ros Lucas, P Castell, T Silvente, JA Madrid, M Garaulet

Resumen

La genética está detrás de nuestra maquinaria circadiana. El polimorfismo de un sólo nucleótido (SNP) del gen *CLOCK* (*Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*) concretamente el 311T/C, ha sido previamente relacionada con la obesidad y la pérdida de peso. Sin embargo, la asociación fenotípica y la funcionalidad del *CLOCK* 311 locus es aún desconocido.

Objetivo: determinar, en condiciones de vida libre, si la presencia del polimorfismo *CLOCK* 311T/C en mujeres con sobrepeso podría estar relacionado con (a) trastornos circadianos, y (b) cambios en la calidad del sueño, para intentar mejorar la comprensión de las asociaciones previamente demostradas con la obesidad y la reducción de la pérdida de peso de las portadoras C.

Métodos: Se reclutaron 85 mujeres con sobrepeso, edad 43 ± 12 e IMC $28,6 \pm 4,3$ kg/m². Las variables de temperatura de la muñeca (T), actimetría (A), posición del cuerpo (P) y TAP se midieron como marcadores de la funcionalidad sistema circadiano durante 8 días consecutivos. Adicionalmente se completó un cuestionario de actividad, un registro de comida y sueño diario, mientras que la calidad del sueño se determinó mediante polisomnografía domiciliaria.

De esta muestra, se encontró que 43 mujeres portaban el SNP del alelo menor (C) para *CLOCK* 3111 y 42 mujeres eran no portadoras de dicho alelo (portadoras del alelo mayor TT). Ambos grupos de pacientes estaban igualados en número, edad, parámetros de obesidad e ingesta de energía.

Resultados: En comparación con los sujetos TT, que mostraron perfiles del ritmo circadiano más robustos, los pacientes con el alelo C muestran anomalías del sistema circadiano significativas, tales como: menor amplitud y una mayor fragmentación del ritmo, con un patrón circadiano debilitado según lo evaluado por el Índice de Funcionalidad circadiana (CFI).

Además los portadores C eran menos activos, comenzado su actividad más tarde en la mañana y presentándose más somnolientos durante el día, mostrando un retraso en la acrofase característico de los sujetos de tipo vespertino.

Conclusión: Aquellos individuos portadores del alelo menor C del *CLOCK* 3111 presentan un ritmo circadiano menos robusto que el TT y una acrofase retrasada que caracteriza a los sujetos con cronotipo vespertino. Apoyamos la idea de que la identificación de genotipos de reloj en los pacientes puede ayudar al terapeuta en la caracterización de las raíces del problema metabólico.

El tiempo no espera a nadie;

el reloj biológico, tampoco.

D. Golombek

Discusión

IV.-DISCUSION

1.-DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados de la presente memoria demuestran la importancia del estudio de la cronobiología en la obesidad y su tratamiento. La evaluación de la salud circadiana del individuo mediante la medición de la temperatura periférica es relevante para un mejor diagnóstico de la obesidad y de la ***efectividad de los tratamientos de pérdida de peso.***

En este sentido, parámetros como la amplitud y la fragmentación del ritmo circadiano de temperatura, así como la temperatura media diurna del individuo y la evaluación del estado funcional del sistema circadiano (CFI), se muestran como factores predictores de la respuesta a un programa de reducción de peso.

Además, el conocimiento de la ***variante génica CLOCK 3111T/C*** es interesante en la práctica clínica ya que los portadores del alelo menor C presentan perfiles circadianos menos saludables, caracterizados por una menor amplitud y una mayor fragmentación del ritmo, mostrando a su vez un índice de funcionalidad del sistema circadiano debilitado. Además estos individuos comienzan su actividad más tarde en la mañana y presentan una acrofase del ritmo de posición retrasada, característico de individuos con cronotipo vespertino.

Estas perturbaciones, presentes en el sistema circadiano de los portadores del alelo menor de *CLOCK 3111T/C*, pueden ser una de las causas de su mayor resistencia a la pérdida de peso.

Por otro lado, los resultados de esta tesis doctoral, confirman los hallazgos previos de nuestro grupo de investigación, que indican que la **hora de la comida** es un factor determinante en la pérdida de peso.

Mediante los trabajos experimentales realizados en la presente memoria, hemos profundizado en los mecanismos fisiológicos implicados en la peor respuesta a la pérdida de peso que caracteriza a los comedores tardíos, y hemos demostrado que retrasar el momento de la comida principal del día provoca cambios metabólicos y circadianos.

De tal modo que, comer tarde, provoca una disminución de la tolerancia a la glucosa y un menor gasto energético en reposo, así como un aplanamiento del perfil diario de cortisol y de temperatura periférica, cambio este último, causado principalmente por la disminución del efecto térmico de los alimentos (pico postprandial), hechos que podrían ayudar a explicar esta evidencia.

Todos estos resultados, en su conjunto, demuestran el papel relevante que presenta la cronobiología en la obesidad, y sugieren que el uso de técnicas cronobiológicas no invasivas tales como: medida de la temperatura periférica, actimetría, y mediciones de cortisol en saliva, así como registros de horarios de sueño y alimentación, pueden ser de gran utilidad en la práctica clínica para el diagnóstico y tratamiento de la obesidad.

2.-DISCUSIÓN ESPECÍFICA POR ARTÍCULOS.

2.1.-“Ritmos circadianos como predictores de la efectividad de los tratamientos de pérdida de peso”.

La ritmicidad circadiana puede ser un factor predictivo y útil en la determinación de la eficacia de los tratamientos de pérdida de peso. Hemos demostrado como la alta variabilidad en la respuesta a la pérdida de peso que se encuentra en las mujeres estudiadas está significativamente relacionada con el ritmo circadiano de la temperatura de la muñeca.

Las mujeres participantes en este estudio (n=85), alcanzaron una pérdida de peso media de 8,5 kg (10% del peso inicial) durante las primeras 21 semanas de tratamiento, esto se tradujo en una tasa media de pérdida de peso de 460 g por semana. Sin embargo, se observó una gran variabilidad interindividual en la respuesta, mientras que la mayoría de las mujeres perdían entre 5 y 10% de su peso corporal inicial, cuando nos fijamos en los extremos, es decir, aquellas mujeres con respuesta al tratamiento elevada (HR) (decil superior) y baja (LR) (decil inferior), observamos como las HR perdían entre 15-30% de su peso inicial, mientras que las LR ganaron (1%) de peso durante la intervención.

Así, cuando comparamos los deciles extremos, separando a nuestras mujeres en altas respondedoras (HR) y bajas respondedoras (LR) para la efectividad de los tratamientos, encontramos que la gran amplitud del ritmo y la baja fragmentación encontradas en las HR, eran ambos parámetros predictores de la pérdida de mayor peso y de la eficacia de la intervención.

En general, estos resultados están en acuerdo con nuestra hipótesis inicial en la que los altos y bajos respondedores a una intervención de pérdida de peso diferirían en el patrón diurno de la temperatura periférica de muñeca y la posición del cuerpo, tal y como se refleja en las diferencias en los valores medios y en los patrones de ritmicidad circadiana de ambas variables.

En este estudio, los pacientes LR muestran perfiles circadianos menos robustos, caracterizados por presentar una menor amplitud, una mayor fragmentación del ritmo y una debilitada función circadiana, según la evaluación del índice de funcionalidad circadiana (CFI). Además, encontramos diferencias significativas entre ambos grupos en los valores medios de temperatura, mayores en LR, probablemente como resultado de la vasodilatación de la piel debido a la activación del sistema nervioso parasimpático, hecho que se ha relacionado con somnolencia y altos estados de relajación (27).

Curiosamente, entre las diferencias en los parámetros circadianos, la menor amplitud encontrada en los LR es uno de los signos característicos del envejecimiento. Una amplitud atenuada se ha observado en sujetos de edad avanzada, así como en sujetos obesos (27) y en pacientes de Alzheimer (59, 60). Un patrón saludable de temperatura de la muñeca, muestra una gran amplitud del ritmo con valores altos de temperatura durante las horas de sueño (en la noche), y una caída pronunciada después de levantarse por la mañana con valores bajos durante el tiempo de vigilia. Además presenta un segundo pico después de comer, en la tarde, coincidente con la hora de la siesta, y una caída entre 20:00 y 22:00 horas, un período que se conoce como "wake maintenance zone" (zona de mantenimiento de vigilia) (43). En general, un "patrón circadiano saludable" incluye lo siguiente: gran amplitud, alta regularidad (alta IS) y baja fragmentación (baja IV)(43).

En el trabajo actual, la variabilidad intradiaria (IV) de la temperatura de la muñeca también se relacionó con la eficacia de la intervención, los individuos LR presentan una mayor fragmentación del ritmo en comparación con los HR. La IV es una medida de la fragmentación del ritmo que parece ser dependiente de los trastornos circadianos endógenos, ya que muestra una baja correlación con el bienestar funcional, social y emocional del individuo (61). Varios estudios han demostrado que la fragmentación aumenta con las enfermedades asociadas con la demencia, disminución de la función cognitiva, el envejecimiento, la obesidad, etc. (62).

Además, previamente se ha demostrado que en los individuos obesos existe una relación entre el aumento de la fragmentación del ritmo y la disminución de la amplitud del ritmo de melatonina, relación que ha sido descrita como un signo biológico de CD (27).

Destacamos, que se encontraron diferencias significativas en la IV entre HR y LR, mientras que no se observaron diferencias significativas en la estabilidad interdiaria (IS), lo que sugiere que estas diferencias en la variable de temperatura de muñeca no fueron debidas a una inestabilidad de fase.

Entre las variables circadianas analizadas, el CFI es un valor adecuado y preciso para definir el estado circadiano de los sujetos. Este índice integra tres parámetros circadianos complementarios (IV, la amplitud relativa y el IS) lo que nos permite clasificar el estado del sistema circadiano de las participantes (47). En el presente estudio, el CFI fue significativamente mayor en pacientes HR si los comparamos con los LR, esto apoya la idea de que un patrón circadiano saludable se relaciona y puede ser un marcador de la eficacia para bajar de peso en los tratamientos de obesidad.

Es interesante resaltar que CFI parece ser un buen predictor de la velocidad para bajar de peso (gr/semana), mientras que, por ejemplo, la temperatura media de la muñeca o la amplitud parece ser un buen indicador de porcentaje de pérdida de peso. Por otra parte, IV es un buen predictor de ambas situaciones (pérdida de peso total y velocidad de pérdida de peso).

Finalmente, es importante subrayar que el patrón de temperatura de la muñeca en HR se ajusta mejor a la función coseno que los LR. Por otra parte, el descenso pronunciado de la temperatura después de levantarse por la mañana que caracterizó el patrón circadiano de HR se atenuó en las LR.

Otra diferencia importante se relaciona con los ritmos ultradianos (periodos de 12 hasta 2 h) y el CFI. Las mujeres con baja respuesta al tratamiento se caracterizan por una disminución en el segundo armónico (P₂) y con un índice de funcionalidad circadiana (CFI) disminuido. Hemos demostrado previamente que la ausencia de esta segunda pico (P₂) es un marcador de CD y de alteraciones metabólicas, y además está relacionado con la obesidad (27).

Un número de factores puede estar detrás de estas diferencias en la ritmicidad circadiana entre la alta y baja respuesta de estas mujeres a un tratamiento de pérdida de peso. La obesidad en sí puede alterar el sistema circadiano. Un estado obeso puede en realidad exacerbar los desequilibrios circadiano en humanos, sabemos que las personas que sufren de obesidad y diabetes presentan menor amplitud de sus ritmos (27, 63).

Sin embargo, este no es el caso, en el estudio actual las diferencias en la ritmicidad circadiana entre los altos respondedores (HR) y bajos respondedores (LR) fue significativa incluso después de ajustar por obesidad; más importante aún, los altos

respondedores fueron las mujeres que mostraron ritmos circadianos saludables a pesar de ser significativamente más obesas que los bajos respondedores. Las diferencias en el gasto energético podrían ser el responsable de estos resultados. De hecho, mientras que no se encontraron diferencias significativas en las tasas de actividad total y en los patrones circadianos de actividad física entre los HR y los LR, sí encontramos diferencias significativas en los patrones de posición, con valores más altos durante el día en las mujeres HR. Además, el horario de las comidas (52), determinados polimorfismos de los genes reloj (9, 64) y un comportamiento alimentario anormal (65) podrían estar influyendo en estos resultados.

Independientemente de los factores que influyen, el estudio apoya el concepto de que la ritmicidad circadiana está implicada en la eficacia de los tratamientos de pérdida de peso y que podría ser considerado como un factor predictor de eficacia para bajar de peso. En resumen, las mujeres con baja respuesta a un tratamiento de pérdida de peso muestran ritmos circadianos menos marcados que aquellas con alta respuesta.

La caracterización del patrón circadiano de la temperatura de la muñeca, la actividad y la posición del cuerpo en condiciones ambulatorias pueden orientar a los profesionales de salud para predecir el éxito de los programas de pérdida de peso. Además la incorporación de consejos sobre determinados sincronizadores externos, tales como el momento de la ingesta de alimentos, la actividad física y el sueño contribuirán a lograr una vida más saludable del sistema circadiano y, posteriormente una pérdida de peso más eficaz.

2.2.-“Efectos de la hora de la comida sobre la tolerancia a la glucosa, oxidación de sustrato y variables circadianas: estudio randomizado y cruzado”.

Respecto al momento de la ingesta de la comida principal del día, hemos demostrado por primera vez en humanos, que retrasar la hora de la comida durante una semana provoca cambios metabólicos y circadianos que podrían dar una explicación a los efectos diferenciales del horario de la comida sobre la salud metabólica del individuo.

Nuestros resultados muestran que retrasar la hora de la comida induce a un menor gasto energético en reposo previo al momento de la ingesta de alimentos, disminución de la oxidación de carbohidratos en ayunas, disminución de tolerancia a la glucosa durante el periodo postprandial, un perfil diario más aplanado en las concentraciones de cortisol libre y una disminución del efecto térmico de los alimentos según la temperatura periférica medida en la muñeca del individuo.

Previamente, ha sido demostrado, mediante un estudio de intervención de 20 semanas, que comer tarde era predictivo de menor pérdida de peso, aunque no se encontraron diferencias significativas en el consumo de energía y en la estimación del gasto energético entre los comedores tardíos y los tempranos. Dos limitaciones potenciales podrían estar implicadas en estos resultados, primero, que se trataba de un estudio observacional, y segundo, que se estimó el gasto de energía mediante la fórmula de Harris-Benedict y la actividad física mediante un cuestionario (MET) que completaban los sujetos. Por tanto, no se puede excluir la posibilidad de que los grupos tuvieran diferencias en el gasto energético en reposo debido a su peso, altura, sexo y edad o al gasto energético postprandial.

Con el fin de abordar estos aspectos, realizamos un estudio de intervención, en el que se midió el **gasto energético del individuo en reposo** antes y después de la comida principal del día (periodo postprandial), mediante calorimetría indirecta y bajo dos condiciones diferentes: comiendo temprano (EE) y comiendo tarde (LE), el diseño del estudio fue randomizado y cruzado, y se sirvieron a los sujetos comidas idénticas en ambas situaciones.

Descubrimos que, un retraso de tres horas y media en el momento del almuerzo (13:00-16:30 h) provoca una disminución del gasto energético en reposo antes de la comida. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en el gasto energético postprandial. Estos ligeros cambios en el gasto de energía antes de la comida no parecen ser suficientes para explicar las diferencias anteriormente descritas en relación a la pérdida de peso entre los comedores tempranos y comedores tardíos. Por tanto se requieren futuros estudios para medir el efecto de una alimentación temprana y tardía sobre el gasto de energía a lo largo de 24 horas y así poder evaluar si el horario de las comidas afecta al gasto de energía en otros momentos del día.

No obstante, los valores del **cociente respiratorio corregido con la proteína** estimada procedente del nitrógeno eliminado en la orina (CRQ) y la **oxidación de carbohidratos**, disminuyeron en la condición LE en comparación con la EE. Estudios previos, han demostrado que existe una correlación negativa entre los valores de RQ y la edad, porcentaje de grasa corporal, valores de glucemia, ácidos grasos libres e índice cintura-cadera (66).

En el estudio actual, la **tolerancia de la glucosa postprandial** se vio afectada por el horario de la comida. Después de la comida del día de la prueba, los valores de glucosa en sangre fueron significativamente mayores en la condición LE que

en la EE. De hecho, LE aumentó el AUC en un 46% en comparación con EE. Estos datos apuntan a una disminución de la tolerancia a la glucosa en LE. Estos resultados podrían estar relacionados con: a) el efecto Staub-Traugott que establece que las concentraciones de glucosa en plasma después de la ingestión de una carga oral de glucosa son más altas si se administra en ayunas en comparación con el estado postprandial (67). De hecho, una de las características de la condición LE es el estado en ayunas de los sujetos, ya que el intervalo de tiempo entre el desayuno y el momento de la comida principal fue 3,5 horas más largo en los sujetos bajo esta condición que en los EE.; b) la influencia del sistema circadiano en la regulación de la glucosa, independiente del ritmo sueño/vigilia y ayuno/alimentación (68). Estos efectos combinados pueden ayudar a explicar el por qué retrasar el momento de la ingesta de la comida principal del día provoca una disminución de la tolerancia a la glucosa.

A partir de estudios experimentales en animales, sabemos que cambios en el momento de la ingesta de alimentos hacia horas no habituales, puede alterar la relación de fase entre el marcapasos circadiano central y los osciladores periféricos situados en prácticamente todas las células del cuerpo, incluyendo los tejidos metabólicos tales como el hígado y el páncreas, y dar lugar a efectos metabólicos adversos como la intolerancia a la glucosa.

En los seres humanos, se ha demostrado que la desalineación entre el marcapasos circadiano central y el ritmo de ayuno/alimentación y sueño/vigilia da lugar a una disminución de la tolerancia a la glucosa (40, 69). Curiosamente, nuestros resultados son similares a los obtenidos por Gonnissen et al. (70), quien estudió el efecto de la desalineación circadiana, ya sea adelantando o retrasando el ciclo ayuno/alimentación y sueño/vigilia, sobre el gasto energético y el metabolismo de la glucosa.

Los autores encontraron una alteración del metabolismo de la glucosa y la oxidación del sustrato, mientras que el balance de energía se vio menos afectado por dicha desalineación, resultados que concuerdan con nuestro estudio actual sobre el horario de las comidas.

En este estudio, el perfil diario de las concentraciones de **cortisol libre** también se vio afectado por el horario de las comidas. La condición LE dio lugar a un perfil más aplanado, con valores más bajos en la mañana y la tarde en comparación con la EE, mientras que los valores nocturnos fueron similares en ambas condiciones.

Una alta variabilidad diaria de cortisol es una señal típica del ritmo diurno normal, caracterizado por un pico en la mañana, poco después de despertar, y valores bajos en la noche antes de acostarse. Baja variabilidad o aplanamiento del ritmo de cortisol se ha relacionado por una parte con estrés crónico emocional o físico (71, 72) y por otra con obesidad (44). De hecho, un aplanamiento similar del ritmo de cortisol diario como el observado en nuestra condición LE también se ha descrito en sujetos que sufren síndrome metabólico cuando se comparan con sujetos sanos (8).

Este aplanamiento de la variabilidad diaria del cortisol puede dar lugar a una desincronización circadiana de los genes reloj de los tejidos periféricos tal y como se ha propuesto con anterioridad mediante un modelo matemático (73): los autores sugirieron que, cuando la amplitud del ritmo de cortisol disminuye, las células de los tejidos periféricos se desincronizan respecto del reloj central, provocando un desplazamiento de fase en relación a las señales ambientales o sincronizadores externos(73).

Estudios en gemelos muestran que, mientras que el punto más bajo de la noche en los valores de cortisol tiene una alta influencia genética, la *acrofase* de la mañana está asociado principalmente con factores ambientales (74). Nuestros resultados, basados en comparaciones en un mismo sujeto, son consistentes con esta observación, el momento de la ingesta de la comida principal del día provoca un efecto en las concentraciones de cortisol en la mañana sin un efecto sobre el cortisol en la noche.

Se requieren más estudios para determinar los mecanismos subyacentes y poder averiguar si el ritmo circadiano endógeno de cortisol está influenciado por el horario de las comidas. Es de destacar, que el cambio en las concentraciones de cortisol de la mañana y de la tarde, que se produce dependiendo de la condición EE o LE, no se puede explicar por el efecto agudo de las comidas servidas, ya que los tiempos en los que se evaluó el cortisol (09:00 y 13:00 h) se produjeron antes de la ingesta de alimentos (13:00 y 16:30 h, respectivamente). Esto sugiere que hay un efecto a largo plazo de horario de las comidas en el control diario de cortisol.

Además, el hecho de retrasar el momento de la ingesta de la comida principal del día (controlada e idéntica en ambas condiciones), provoca cambios en el **patrón diario de temperatura de la muñeca**, cambio principalmente causado por la disminución del efecto térmico de los alimentos (pico postprandial) que se observa en la condición LE en comparación con EE. Se ha demostrado anteriormente, que la disminución del segundo armónico P2 (aplanamiento del pico postprandial), podría ser un marcador de alteraciones metabólicas (51) y además se ha relacionado con obesidad y menor pérdida de peso (27, 75). De hecho, en individuos sometidos a un programa de reducción de peso, los que presentan baja respuesta al tratamiento muestran un pico postprandial menos marcado, según la temperatura medida en la muñeca, que los que muestran elevada respuesta (75). Las diferencias en este pico postprandial en los

patrones diarios de temperatura de la muñeca observados actualmente, son también, los hallazgos más notables entre las condiciones EE y LE.

Estas diferencias en la temperatura de muñeca dependientes del horario de las comidas puede ser la base para explicar las dificultades de los sujetos LE, ya demostradas, para la pérdida de peso (52).

En resumen, retrasar la hora de la comida principal del día (almuerzo en España) afecta por un lado al gasto energético en reposo, tolerancia a la glucosa y a la oxidación de carbohidratos, y por otro lado a la variabilidad diaria de las concentraciones de cortisol libre y al efecto térmico de los alimentos según la temperatura de la muñeca. A pesar de que estos efectos parecen ser de una pequeña magnitud, esto puede ser debido al hecho de que la intervención del horario de las comidas es de sólo una semana.

Comer de forma continuada en un momento posterior del día respecto a la hora recomendada, pueden crear perturbaciones metabólicas de una magnitud más grande y puede estar implicado en las alteraciones metabólicas que caracterizan a los comedores tardíos.

2.3.-“Diferencias en la ritmicidad circadiana de la variante génica *CLOCK* 3111T/C en mujeres obesas moderadas, según la evaluación de la termometría, actimetría y posición del cuerpo”.

El objetivo de este estudio fue obtener un mayor conocimiento con respecto a la asociación demostrada anteriormente del SNP *CLOCK* 3111T/C con la obesidad y la pérdida de peso. Representa la primera evaluación de los ritmos circadianos en mujeres con sobrepeso portadoras del SNP *CLOCK* 3111T/C.

La determinación de los ritmos se llevó a cabo mediante el estudio de las variables de temperatura de la muñeca (T), actimetría (A), posición del cuerpo (P) y la variable integrada de las tres denominada TAP, todo ello bajo condiciones de vida ambulatoria.

Se reclutaron 85 mujeres con sobrepeso, de las cuales n=43 portaban el alelo menor C (CC y TC) del gen *CLOCK* 3111 y n=42 eran TT (no portadoras del alelo menor C), no existiendo diferencias significativamente entre ellas en cuanto a la edad, características relacionadas con la obesidad y en el consumo de energía.

Cuando comparamos ambos grupos observamos perfiles circadianos más saludables y más robustos en los sujetos TT que en los portadores C, estos últimos presentan anomalías circadianas importantes: menor amplitud y una mayor fragmentación del ritmo, un patrón circadiano significativamente menos estable y una función circadiana debilitada, según lo evaluado por el índice de CFI. Además los portadores C también eran menos activos que los TT, comenzando su actividad más tarde en la mañana y presentando estados de somnolencia durante el día, mostrando una *acrophase* retardada, que caracteriza a los sujetos con cronotipo vespertino.

La disminución de la *amplitud* del ritmo es un cambio que se produce con la edad por tanto es considerado como indicador de envejecimiento (76). Este parámetro tiende a ser alto en sujetos con un sistema circadiano saludable y que tienen estabilidad en su rutina diaria, mientras que las amplitudes bajas han sido descritos en ancianos (76) en enfermedades como Alzheimer (59, 76) y en obesidad (27).

En este estudio, las mujeres portadoras del alelo menor C mostraron amplitudes en la onda media semanal de temperatura de la muñeca más bajas en comparación con las mujeres TT, lo que sugiere un patrón circadiano más envejecido. Además, en los análisis de la onda media semanal de las variables de actimetría y posición, el índice de Rayleigh fue menor en las mujeres C que en las TT, lo que significa un ritmo circadiano menos estable.

En cuanto al análisis de la variable TAP, el parámetro IV fue significativamente mayor en las mujeres con la variante génica C en comparación con sus homólogas TT, esto indica una mayor fragmentación del ritmo de reposo-actividad. Esta medida de la fragmentación es dependiente de alteraciones circadianas endógenas y en trabajos anteriores se ha mostrado que el IV se asocia de forma moderada con bienestar funcional, social y emocional. Así, un incremento de este parámetro está asociado a demencia, deterioro cognitivo, etc. (62).

Además el aumento IV también se ha relacionado en otros trabajos con obesidad (27) y envejecimiento (76), probablemente debido a las siestas diurnas y despertares nocturnos de las personas mayores. Por otro lado este aumento de la IV se ha asociado con una disminución en la amplitud de la ritmicidad diaria de melatonina (27), una señal biológica de CD (8).

El valor mínimo de temperatura de la muñeca durante 10 horas consecutivas (L10) también fue significativamente mayor en los individuos C que en los TT. Un incremento de temperatura de la piel se ha relacionado con vasodilatación por activación parasimpática y con estados de somnolencia (60). Aunque las diferencias en los valores medios de temperatura entre los sujetos C y TT puedan parecer insignificantes (0,3 °C), esta pequeña diferencia parece ser suficiente para perturbar el ritmo circadiano. De hecho la inducción de un ligero aumento (0,4°C) en la temperatura de la piel suprime la vigilia nocturna e induce a etapas más profundas de sueño (77).

De todas las variables circadianas analizadas, el CFI es un índice muy adecuado porque integra tres parámetros circadianos, cada uno de los cuales suministra información complementaria sobre el sistema circadiano: IV, amplitud y estabilidad interdiaria (IS). Este índice nos permite clasificar a los sujetos en función de su salud circadiana (47) y su valor oscila entre 0 (ruido gaussiano) y 1 (onda sinusoidal). En general, el CFI de temperatura fue bajo en las mujeres C y TT de nuestro estudio y osciló entre 0,57 (mejor) y 0,33 (peor) (datos no presentados), lo que indica una menor robustez del ritmo circadiano en ambos grupos de mujeres si los comparamos con los sujetos sanos en los que el CFI del ritmo de temperatura de la muñeca osciló entre 0,73 a 0,43 (47). Estas diferencias entre los sujetos del estudio y los valores de referencia pueden ser debido a la obesidad moderada de las mujeres que participaron en nuestro estudio. Además, el CFI fue menor en las mujeres portadoras C que en sus homólogas TT.

Es de destacar que al realizar el análisis de la variable posición, la *acrophase* mostró un retraso de fase significativo en las portadoras del alelo menor C en comparación con las no portadoras (TT). Por otra parte, el momento medio obtenido de 5 horas consecutivas de valores más bajos (TL5) de la variable TAP fue también más

tardío en las mujeres C. Este retraso de fase también fue evidente cuando analizamos las diferentes ondas medias de las mujeres estudiadas. De hecho, los sujetos C tendieron a comenzar su actividad más tarde en la mañana, presentando además estados de somnolencia durante la mañana, mientras que los TT eran más activos tal y como se refleja consistentemente en los cronogramas obtenidos a partir de la temperatura, la actividad, la posición y el TAP.

Investigaciones previas muestran que sujetos sanos portadores del alelo 3111C presentan una preferencia significativa por la tarde-noche, según las puntuaciones obtenidas mediante el cuestionario de Horne-Ostberg, los portadores C mostraron un retraso de fase de 10 a 44 min respecto del momento de ir a dormir y de iniciar su actividad por la mañana (78). Resultados similares fueron encontrados por Benedetti et al (79) en sujetos deprimidos, donde midieron los niveles de actividad de los sujetos mediante actimetría, aunque sólo se registró durante un día y en condiciones de laboratorio, hecho que puede no reflejar su comportamiento habitual. En ese mismo estudio los sujetos homocigotos TT tendieron a disminuir su actividad después de la cena hasta el momento de acostarse, mientras que los portadores del alelo menor C tendieron a aumentarla. Una situación que no estaba presente en nuestro estudio. Sin embargo, no ha habido réplicas de su hallazgo (80, 81), lo que subraya la necesidad de una mayor investigación en relación con este SNP.

Nuestros datos confirman las preferencias por la tarde-noche de los portadores del alelo menor C, como lo demuestra (a) el cuestionario Horne-Ostberg, (b) la fase tardía de la actividad, posición y TAP presentes en sus ondas medias y (c) la tendencia a levantarse más tarde en la mañana (obtenida del registro diario de reposo/actividad).

Además, nuestros resultados muestran asociaciones significativas entre la disminución de la amplitud, vespertinidad (retraso de fase) y el aumento de la fragmentación de los ritmos, todos estos rasgos que caracterizan CD en individuos vespertinos.

Sin embargo, los resultados derivados de nuestro estudio, indican que el deterioro del sistema circadiano de las mujeres C no fue una consecuencia de cambios en la ingesta de alimentos o de una menor calidad del sueño, según se deduce de los registros de alimentos y los datos de polisomnografía domiciliaria.

Particularmente relevante fueron los datos derivados del TAP, tal y como mencionamos con anterioridad, integra las variables de temperatura, actividad y posición y además reduce la presencia de artefactos; por lo tanto, es considerado una herramienta adecuada para evaluar el estado del sistema circadiano en humanos. Los resultados obtenidos de la variable TAP indican que las mujeres portadoras del alelo menor presentan alteraciones en la ritmicidad circadiana que podrían explicar la predisposición de las portadoras C del gen *CLOCK* 3111 a sufrir obesidad (82) e incluso el cáncer, (83), así como menor éxito en la pérdida de peso (9, 81, 82).

En resumen, variantes genéticas en 3111T *CLOCK* T/C muestran unos ritmos circadianos menos robustos si los comparamos con sus homólogos TT y una acrofase retrasada, que caracteriza a los sujetos de tipo vespertino. Apoyamos la idea de que identificar genotipos *CLOCK* en los pacientes puede ayudar a los terapeutas en la caracterización de las raíces del problema metabólico.

*Pitágoras, cuando era preguntado
sobre que era el tiempo,
respondía que era el alma de este mundo.”*

Plutarco (46-120)

Conclusiones

V.-CONCLUSIONES.

- [1] Evidenciamos que las mujeres con peor repuesta a un tratamiento de pérdida de peso presentan un ritmo diario de temperatura periférica fragmentado y aplanado, con un pico postprandial atenuado y una función circadiana debilitada. Estas perturbaciones encontradas en estos individuos son características de un sistema circadiano envejecido. Proponemos el estudio de la salud circadiana al inicio de un tratamiento de pérdida de peso como un buen indicador del éxito de la intervención.
- [2] Un retraso de tres horas y media en la hora de la comida principal del día (almuerzo en España) provoca alteraciones metabólicas, tales como, disminución de la tolerancia a la glucosa durante el periodo postprandial y una disminución del gasto energético en reposo antes de la comida. Hechos que podrían ayudar a explicar el efecto diferencial de una alimentación temprana y tardía.
- [3] Confirmamos que alteraciones en los sincronizadores del marcapasos central, como cambios en el horario de la comida principal del día, provoca alteraciones en los ritmos de salida de dicho marcapasos, dando lugar a perturbaciones circadianas en los ritmos diarios de temperatura periférica y cortisol, que pueden contribuir a explicar la menor pérdida de peso encontrada en los comedores tardíos.
- [4] Demostramos que individuos portadores del SNP *CLOCK* 311T/C presentan ritmos circadianos menos robustos en comparación con sus homólogos TT, mostrando además una *acrophase* retrasada, característica de los sujetos de tipo vespertino. Estos hechos podría ayudar a explicar la peor respuesta de los portadores C a los tratamientos de pérdida de peso. Apoyamos la idea de que identificar genotipos *CLOCK* en los pacientes puede ayudar a los terapeutas en la caracterización de las raíces del problema metabólico y a su posterior tratamiento.

[5] El uso de la nutrigenética, junto con técnicas cronobiológicas tales como análisis de temperatura, actividad motora, posición del cuerpo y sueño, pueden ser de gran utilidad en la predicción del éxito de los tratamientos de pérdida de peso.

Conclusión General.

La evaluación de la salud circadiana del individuo es una herramienta útil en el diagnóstico y tratamiento de la obesidad. El estudio de los ritmos circadianos al inicio de un tratamiento de pérdida de peso y la detección precoz de alteraciones tanto en el marcapasos central debidas al genotipo, así como en los sincronizadores externos de relojes periféricos como es el horario de comida, proporcionan valiosa información sobre la capacidad de respuesta del individuo a un tratamiento de pérdida de peso.

En este sentido, la caracterización cronobiológica del individuo, mediante genotipado, y técnicas de medición de ritmos circadianos tales como la temperatura periférica, la actimetría y la posición se muestra como una estrategia novedosa, coadyuvante tanto para el diagnóstico de la obesidad como para la eficacia de la intervención.

Bibliografía

VI.-BIBLIOGRAFIA.

1. Belmonte S. Importancia de la nutrición y hábitos de vida en la prevención. Estrategias de educación nutricional en la Comunidad de Madrid. In: S.A. EM, editor. Genética, Nutrición y Enfermedad. Madrid: M^aPilar Vaquero; 2008. p. 33-49.
2. Hainer V, Zamrazilova H, Spalova J, Hainerova I, Kunesova M, Aldhoon B, et al. Role of hereditary factors in weight loss and its maintenance. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. 2008;57 Suppl 1:S1-15.
3. Ordovas JM, CARMENA R. Nutrigenética. Nutrigenética y nutrigenómica Humanitas, Monografía. 2004(9):4-19.
4. Corella D. Avances en el conocimiento de las bases genéticas de la obesidad In: SA EM, editor. Genética, Nutrición y Enfermedad. Madrid: M^aPilar Vaquero; 2008. p. 51-66.
5. Smith CE, Ordovas JM, Sanchez-Moreno C, Lee YC, Garaulet M. Apolipoprotein A-II polymorphism: relationships to behavioural and hormonal mediators of obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2012;36(1):130-6.
6. Sanchez-Moreno C, Ordovas JM, Smith CE, Baraza JC, Lee YC, Garaulet M. APOA5 gene variation interacts with dietary fat intake to modulate obesity and circulating triglycerides in a Mediterranean population. *The Journal of nutrition*. 2011;141(3):380-5.
7. Gómez-Abellán P, Madrid JA, Ordovás JM, Garaulet M. Aspectos cronobiológicos de la obesidad y el síndrome metabólico. *Endocrinología y Nutrición*. 2012;59(1):50-61.
8. Corbalan-Tutau D, Madrid JA, Nicolas F, Garaulet M. Daily profile in two circadian markers "melatonin and cortisol" and associations with metabolic syndrome components. *Physiology & behavior*. 2014;123:231-5.
9. Garaulet M, Sanchez-Moreno C, Smith CE, Lee YC, Nicolas F, Ordovas JM. Ghrelin, sleep reduction and evening preference: relationships to CLOCK 3111 T/C SNP and weight loss. *PloS one*. 2011;6(2):e17435.

10. Gomez-Abellan P, Hernandez-Morante JJ, Lujan JA, Madrid JA, Garaulet M. Clock genes are implicated in the human metabolic syndrome. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32(1):121-8.
11. Garaulet M, Gómez-Abellán P, Madrid JA. Chronobiology and obesity: the orchestra out of tune. *Clinical Lipidology*. 2010;5(2):181-8.
12. Lopez-Mínguez J, Ordonana JR, Sanchez-Romera JF, Madrid JA, Garaulet M. Circadian system heritability as assessed by wrist temperature: A twin study. *Chronobiol Int*. 2014;1-10..
13. Buijs RM, Kreier F. The metabolic syndrome: a brain disease? *Journal of neuroendocrinology*. 2006;18(9):715-6.
14. Barness LA, Opitz JM, Gilbert-Barness E. Obesity: genetic, molecular, and environmental aspects. *American journal of medical genetics Part A*. 2007;143A(24):3016-34.
15. Garaulet M, Madrid JA. Chronobiology, genetics and metabolic syndrome. *Current opinion in lipidology*. 2009;20(2):127-34.
16. Albrecht U, Eichele G. The mammalian circadian clock. *Current opinion in genetics & development*. 2003;13(3):271-7.
17. Kohsaka A, Bass J. A sense of time: how molecular clocks organize metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2007;18(1):4-11.
18. Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*. 2002;418(6901):935-41.
19. Ando H, Yanagihara H, Hayashi Y, Obi Y, Tsuruoka S, Takamura T, et al. Rhythmic messenger ribonucleic acid expression of clock genes and adipocytokines in mouse visceral adipose tissue. *Endocrinology*. 2005;146(12):5631-6.
20. Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, et al. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science (New York, NY)*. 2005;308(5724):1043-5.
21. Jebb SA. Aetiology of obesity. *British Medical Bulletin*. 1997;53(2):264-85.

22. Poppitt SD, Swann DL. Dietary manipulation and energy compensation: does the intermittent use of low-fat items in the diet reduce total energy intake in free-feeding lean men? *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 1998;22(10):1024-31.
23. Garaulet M, Corbalan MD, Madrid JA, Morales E, Baraza JC, Lee YC, et al. CLOCK gene is implicated in weight reduction in obese patients participating in a dietary programme based on the Mediterranean diet. *Int J Obes (Lond)*. 2010;34(3):516-23.
24. Scott EM, Carter AM, Grant PJ. Association between polymorphisms in the Clock gene, obesity and the metabolic syndrome in man. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32(4):658-62.
25. Woon PY, Kaisaki PJ, Braganca J, Bihoreau MT, Levy JC, Farrall M, et al. Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (BMAL1) is associated with susceptibility to hypertension and type 2 diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(36):14412-7.
26. Garaulet M, Lee YC, Shen J, Parnell LD, Arnett DK, Tsai MY, et al. Genetic variants in human CLOCK associate with total energy intake and cytokine sleep factors in overweight subjects (GOLDN population). *European journal of human genetics : EJHG*. 2010;18(3):364-9.
27. Corbalan-Tutau MD, Madrid JA, Ordovas JM, Smith CE, Nicolas F, Garaulet M. Differences in daily rhythms of wrist temperature between obese and normal-weight women: associations with metabolic syndrome features. *Chronobiol Int*. 2011;28(5):425-33.
28. Partonen T, Treutlein J, Alpman A, Frank J, Johansson C, Depner M, et al. Three circadian clock genes *Per2*, *Arntl*, and *Npas2* contribute to winter depression. *Annals of medicine*. 2007;39(3):229-38.
29. Dunlap JC, Loros JJ, DeCoursey PJ. *Chronobiology: biological timekeeping*: Sinauer Associates; 2004.

30. Guido MDII, H. . Bases Bioquímicas y Moleculares de los Relojes Biológicos en Cronobiología Humana. 2 ed: D. Golombek UNQ; 2007.
31. Karlsson B, Knutsson A, Lindahl B. Is there an association between shift work and having a metabolic syndrome? Results from a population based study of 27,485 people. *Occupational and environmental medicine*. 2001;58(11):747-52.
32. Lund J, Arendt J, Hampton SM, English J, Morgan LM. Postprandial hormone and metabolic responses amongst shift workers in Antarctica. *The Journal of endocrinology*. 2001;171(3):557-64.
33. Van Cauter E, Knutson KL. Sleep and the epidemic of obesity in children and adults. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2008;159 Suppl 1:S59-66.
34. Taheri S, Lin L, Austin D, Young T, Mignot E. Short sleep duration is associated with reduced leptin, elevated ghrelin, and increased body mass index. *PLoS medicine*. 2004;1(3):e62.
35. Rubio-Sastre P, Gomez-Abellan P, Martinez-Nicolas A, Ordovas JM, Madrid JA, Garaulet M. Evening physical activity alters wrist temperature circadian rhythmicity. *Chronobiol Int*. 2014;31(2):276-82.
36. Guido M. De Relojes y Ritmos Biológicos. *Bitácora Digital*. 2013;1(2).
37. Rubio-Sastre P, Scheer FA, Gomez-Abellan P, Madrid JA, Garaulet M. Acute melatonin administration in humans impairs glucose tolerance in both the morning and evening. *Sleep*. 2014;37(10).
38. Haines PS, Guilkey DK, Popkin BM. Trends in breakfast consumption of US adults between 1965 and 1991. *Journal of the American Dietetic Association*. 1996;96(5):464-70.
39. Arble DM, Bass J, Laposky AD, Vitaterna MH, Turek FW. Circadian timing of food intake contributes to weight gain. *Obesity (Silver Spring)*. 2009;17(11):2100-2.

40. Scheer FA, Hilton MF, Mantzoros CS, Shea SA. Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(11):4453-8.
41. Minors DS, Waterhouse JM. Mathematical and statistical analysis of circadian rhythms. *Psychoneuroendocrinology*. 1988;13(6):443-64.
42. Klerman EB, Lee Y, Czeisler CA, Kronauer RE. Linear demasking techniques are unreliable for estimating the circadian phase of ambulatory temperature data. *Journal of biological rhythms*. 1999;14(4):260-74.
43. Sarabia JA, Rol MA, Mendiola P, Madrid JA. Circadian rhythm of wrist temperature in normal-living subjects A candidate of new index of the circadian system. *Physiology & behavior*. 2008;95(4):570-80.
44. Garcia-Prieto MD, Tebar FJ, Nicolas F, Larque E, Zamora S, Garaulet M. Cortisol secretary pattern and glucocorticoid feedback sensitivity in women from a Mediterranean area: relationship with anthropometric characteristics, dietary intake and plasma fatty acid profile. *Clinical endocrinology*. 2007;66(2):185-91.
45. Wust S, Wolf J, Hellhammer DH, Federenko I, Schommer N, Kirschbaum C. The cortisol awakening response - normal values and confounds. *Noise & health*. 2000;2(7):79-88.
46. Steptoe A, Kunz-Ebrecht SR, Brydon L, Wardle J. Central adiposity and cortisol responses to waking in middle-aged men and women. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2004;28(9):1168-73.
47. Ortiz-Tudela E, Martinez-Nicolas A, Campos M, Rol MA, Madrid JA. A new integrated variable based on thermometry, actimetry and body position (TAP) to evaluate circadian system status in humans. *PLoS Comput Biol*. 2010;6(11):e1000996.
48. Ortiz-Tudela E, Martinez-Nicolas A, Albares J, Segarra F, Campos M, Estivill E, et al. Ambulatory circadian monitoring (ACM) based on thermometry, motor activity and

body position (TAP): a comparison with polysomnography. *Physiology & behavior*. 2014;126:30-8.

49. Staessen JA, Fagard R, Thijs L, Celis H, Arabidze GG, Birkenhager WH, et al. Randomised double-blind comparison of placebo and active treatment for older patients with isolated systolic hypertension. The Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) Trial Investigators. *Lancet*. 1997;350(9080):757-64.

50. Messina G, De Luca V, Viggiano A, Ascione A, Iannaccone T, Chieffi S, et al. Autonomic nervous system in the control of energy balance and body weight: personal contributions. *Neurology research international*. 2013;2013:639280. Epub 2013/05/22.

51. Corbalan-Tutau MD, Gomez-Abellan P, Madrid JA, Canteras M, Ordovas JM, Garaulet M. Toward a chronobiological characterization of obesity and metabolic syndrome in clinical practice. *Clin Nutr*. 2014.

52. Garaulet M, Gomez-Abellan P, Alburquerque-Bejar JJ, Lee YC, Ordovas JM, Scheer FA. Timing of food intake predicts weight loss effectiveness. *Int J Obes (Lond)*. 2013;37(4):604-11.

53. Jakubowicz D, Barnea M, Wainstein J, Froy O. High caloric intake at breakfast vs. dinner differentially influences weight loss of overweight and obese women. *Obesity (Silver Spring)*. 2013;21(12):2504-12.

54. Pinheiro AC, Canaan FA, Gonçalves RdC. Insulemia, ingesta alimentaria y metabolismo energético. *Revista chilena de nutrición*. 2008;35(1):18-24.

55. Stokkan KA, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, Menaker M. Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science (New York, NY)*. 2001;291(5503):490-3.

56. Patton DF, Mistlberger RE. Circadian adaptations to meal timing: neuroendocrine mechanisms. *Frontiers in neuroscience*. 2013;7:185.

57. Benitez-Paez A, Belda-Ferre P, Simon-Soro A, Mira A. Microbiota diversity and gene expression dynamics in human oral biofilms. *BMC genomics*. 2014;15:311.

-
58. Lopez-Guimera G, Dashti HS, Smith CE, Sanchez-Carracedo D, Ordovas JM, Garaulet M. CLOCK 3111 T/C SNP interacts with emotional eating behavior for weight-loss in a Mediterranean population. *PLoS one*. 2014;9(6):e99152.
59. van Someren EJ, Mirmiran M, Swaab DF. Non-pharmacological treatment of sleep and wake disturbances in aging and Alzheimer's disease: chronobiological perspectives. *Behav Brain Res*. 1993;57(2):235-53.
60. Kistler A, Mariauzouls C, von Berlepsch K. Fingertip temperature as an indicator for sympathetic responses. *International journal of psychophysiology : official journal of the International Organization of Psychophysiology*. 1998;29(1):35-41.
61. Van Someren EJ, Swaab DF, Colenda CC, Cohen W, McCall WV, Rosenquist PB. Bright light therapy: improved sensitivity to its effects on rest-activity rhythms in Alzheimer patients by application of nonparametric methods. *Chronobiol Int*. 1999;16(4):505-18.
62. Carvalho-Bos SS, Riemersma-van der Lek RF, Waterhouse J, Reilly T, Van Someren EJ. Strong association of the rest-activity rhythm with well-being in demented elderly women. *The American journal of geriatric psychiatry : official journal of the American Association for Geriatric Psychiatry*. 2007;15(2):92-100.
63. Huang W, Ramsey KM, Marcheva B, Bass J. Circadian rhythms, sleep, and metabolism. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(6):2133-41.
64. Bandin C, Martinez-Nicolas A, Ordovas JM, Ros Lucas JA, Castell P, Silvente T, et al. Differences in circadian rhythmicity in CLOCK 3111T/C genetic variants in moderate obese women as assessed by thermometry, actimetry and body position. *Int J Obes (Lond)*. 2013;37(8):1044-50.
65. Gallant AR, Lundgren J, Drapeau V. The night-eating syndrome and obesity. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2012;13(6):528-36.

66. Rizzo MR, Mari D, Barbieri M, Ragno E, Grella R, Provenzano R, et al. Resting metabolic rate and respiratory quotient in human longevity. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005;90(1):409-13.
67. Lewis GF, McNally C, Blackman JD, Polonsky KS, Barron WM. Prior feeding alters the response to the 50-g glucose challenge test in pregnancy. The Staub-Traugott effect revisited. *Diabetes care*. 1993;16(12):1551-6.
68. Van Cauter E, Blackman JD, Roland D, Spire JP, Refetoff S, Polonsky KS. Modulation of glucose regulation and insulin secretion by circadian rhythmicity and sleep. *The Journal of clinical investigation*. 1991;88(3):934-42.
69. Leproult R, Holmback U, Van Cauter E. Circadian misalignment augments markers of insulin resistance and inflammation, independently of sleep loss. *Diabetes*. 2014;63(6):1860-9.
70. Gonnissen HK, Rutters F, Mazuy C, Martens EA, Adam TC, Westerterp-Plantenga MS. Effect of a phase advance and phase delay of the 24-h cycle on energy metabolism, appetite, and related hormones. *The American journal of clinical nutrition*. 2012;96(4):689-97.
71. Chrousos GP, Gold PW. A healthy body in a healthy mind--and vice versa--the damaging power of "uncontrollable" stress. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1998;83(6):1842-5.
72. Lipiner-Friedman D, Sprung CL, Laterre PF, Weiss Y, Goodman SV, Vogeser M, et al. Adrenal function in sepsis: the retrospective Corticus cohort study. *Critical care medicine*. 2007;35(4):1012-8.
73. Mavroudis PD, Scheff JD, Calvano SE, Lowry SF, Androulakis IP. Entrainment of peripheral clock genes by cortisol. *Physiological genomics*. 2012;44(11):607-21.
74. Linkowski P, Van Onderbergen A, Kerkhofs M, Bosson D, Mendlewicz J, Van Cauter E. Twin study of the 24-h cortisol profile: evidence for genetic control of the human circadian clock. *The American journal of physiology*. 1993;264(2 Pt 1):E173-81.

-
75. Bandin C, Martinez-Nicolas A, Ordovas JM, Madrid JA, Garaulet M. Circadian rhythmicity as a predictor of weight-loss effectiveness. *Int J Obes (Lond)*. 2014;38(8):1083-8.
76. Huang YL, Liu RY, Wang QS, Van Someren EJ, Xu H, Zhou JN. Age-associated difference in circadian sleep-wake and rest-activity rhythms. *Physiology & behavior*. 2002;76(4-5):597-603.
77. Raymann RJ, Swaab DF, Van Someren EJ. Skin temperature and sleep-onset latency: changes with age and insomnia. *Physiology & behavior*. 2007;90(2-3):257-66.
78. Katzenberg D, Young T, Finn L, Lin L, King DP, Takahashi JS, et al. A CLOCK polymorphism associated with human diurnal preference. *Sleep*. 1998;21(6):569-76.
79. Benedetti F, Radaelli D, Bernasconi A, Dallspezia S, Falini A, Scotti G, et al. Clock genes beyond the clock: CLOCK genotype biases neural correlates of moral valence decision in depressed patients. *Genes, brain, and behavior*. 2008;7(1):20-5.
80. Robilliard DL, Archer SN, Arendt J, Lockley SW, Hack LM, English J, et al. The 3111 Clock gene polymorphism is not associated with sleep and circadian rhythmicity in phenotypically characterized human subjects. *Journal of sleep research*. 2002;11(4):305-12.
81. Barclay NL, Eley TC, Mill J, Wong CC, Zavos HM, Archer SN, et al. Sleep quality and diurnal preference in a sample of young adults: associations with 5HTTLPR, PER3, and CLOCK 3111. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*. 2011;156B(6):681-90.
82. Garaulet M, Lee YC, Shen J, Parnell LD, Arnett DK, Tsai MY, et al. CLOCK genetic variation and metabolic syndrome risk: modulation by monounsaturated fatty acids. *The American journal of clinical nutrition*. 2009;90(6):1466-75.
83. Zhou F, He X, Liu H, Zhu Y, Jin T, Chen C, et al. Functional polymorphisms of circadian positive feedback regulation genes and clinical outcome of Chinese patients with resected colorectal cancer. *Cancer*. 2012;118(4):937-46.

Anexos

VII.-ANEXOS.

ANEXO I

1.-Cartas de aceptación de los trabajos publicados.

1.1.-ARTÍCULO 1:

“Circadian rhythmicity as a predictor of weight loss effectiveness”.

Asunto: 2013IJO01120R Decision Letter

Fecha: Mon, 4 Nov 2013 07:12:22 -0500

De: ijo@nature.com

Responder a: ijo@nature.com

Para: garaulet@um.es

Manuscript Number: 2013IJO01120R

Title: CIRCADIAN RHYTHMICITY AS A PREDICTOR OF WEIGHT LOSS
EFFECTIVENESS.

Authors: Cristina Bandín, Antonio Martinez-Nicolas, Jose Ordovas, Juan Madrid, and
Marta Garaulet

Dear Prof Garaulet,

I am very pleased to inform you that your above mentioned manuscript has now been
accepted for publication in the International Journal of Obesity.

Thank you for submitting your work to the International Journal of Obesity.

Yours sincerely

Richard L. Atkinson, M.D.

Editor, International Journal of Obesity

1.2.-ARTÍCULO 2:

“Meal timing affects glucose tolerance, substrate oxidation and circadian-related variables: a randomized, crossover trial”.

Subject: 2014IJO01274R Decision Letter

Fecha:03/10/2014 17:07 (GMT+01:00)

De: ijo@nature.com

Para: garaulet@um.es

Manuscript Number: 2014IJO01274R

Title: Meal timing affects glucose tolerance, substrate oxidation and circadian-related variables: a randomized, crossover trial.

Authors: M Cristina Bandín Saura, Frank Scheer, Antonio Luque, Vicente Ávila-Gandía, Salvador Zamora, Juan Madrid, Purificación Gómez-Abellán, and Marta Garaulet

Dear Prof Garaulet,

I am very pleased to inform you that your above mentioned manuscript has now been accepted for publication in the International Journal of Obesity.

Thank you for submitting your work to the International Journal of Obesity.

Yours sincerely

Richard L. Atkinson, M.D.

Editor, International Journal of Obesity

1.3.-ARTÍCULO 3:

”Differences in circadian rhythmicity in CLOCK 3111T/C genetic variants in moderate obese women as assessed by Thermometry, Actimetry and Body Position (TAP)”.

Asunto: 2012IJO00991R Decision Letter

Fecha: Mon, 8 Oct 2012 04:50:55 -0400

De: ijo@nature.com

Para: garaulet@um.es

Manuscript Number: 2012IJO00991R

Title: Differences in circadian rhythmicity in CLOCK 3111T/C genetic variants in moderate obese women as assessed by Thermometry, Actimetry and Body Position (TAP).

Corresponding Author: Prof Garaulet

Dear Prof Garaulet,

I am very pleased to inform you that your above mentioned manuscript has now been accepted for publication in the International Journal of Obesity.

Thank you for submitting your work to the International Journal of Obesity.

Yours sincerely

Richard L. Atkinson, M.D.

Editor, International Journal of Obesity

2.-Indice de Impacto de las revistas

International Journal of Obesity. Factor de impacto 5.386 , situada como la principal revista de obesidad en la categoría Nutrición y Dietética

ANEXO II

1.-Cuestionarios**1.1.-Cuestionario Internacional de Actividad Física**

Nombre y apellidos:

Código:

Fecha:

CUESTIONARIO INTERNACIONAL DE ACTIVIDAD FÍSICA

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

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

PARTE 1: ACTIVIDAD FÍSICA RELACIONADA CON EL TRABAJO

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

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

Sí

No

**Pase a la PARTE 2: TRANSPORTE**

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

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

_____ días por semana

Ninguna actividad física vigorosa relacionada con el trabajo
Pase a la pregunta 4

No sabe/No está seguro(a)

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

_____ **horas por día**
 _____ **minutos por día**

No sabe/No está seguro(a)

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

_____ **días por semana**

No actividad física moderada relacionada con el trabajo
Pase a la pregunta 6



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

_____ **horas por día**
 _____ **minutos por día**

No sabe/No está seguro(a)

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

_____ **días por semana**

Ninguna caminata relacionada con trabajo
Pase a la PARTE 2: TRANSPORTE



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

_____ **horas por día**
 _____ **minutos por día**

No sabe/No está seguro(a)

PARTE 2: ACTIVIDAD FÍSICA RELACIONADA CON TRANSPORTE

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

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

_____ **días por semana**

No viajó en vehículo de motor → **Pase a la pregunta 10**

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

_____ **horas por día**
_____ **minutos por día**

No sabe/No está seguro(a)

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

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

_____ **días por semana**

No montó en bicicleta de un sitio a otro → **Pase a la pregunta 12**

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

_____ **horas por día**
_____ **minutos por día**

No sabe/No está seguro(a)

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

_____ **días por semana**

No caminatas de un sitio a otro → **Pase a la PARTE 3:
TRABAJO DE LA
CASA,
MANTENIMIENTO DE
LA CASA, Y CUIDADO
DE LA FAMILIA**

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

_____ **horas por día**
_____ **minutos por día**

No sabe/No está seguro(a)

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

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

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

_____ **días por semana**

Ninguna actividad física vigorosa en el jardín o patio

Pase a la pregunta 16



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

_____ **horas por día**
_____ **minutos por día**

No sabe/No está seguro(a)

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

_____ **días por semana**

Ninguna actividad física moderada en el jardín o patio

Pase a la pregunta 18



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

_____ **horas por día**
_____ **minutos por día**

No sabe/No está seguro(a)

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

_____ **días por semana**

Ninguna actividad física moderada dentro de la casa



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

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

_____ **horas por día**
 _____ **minutos por día**

No sabe/No está seguro(a)

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

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

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

_____ **días por semana**

Ninguna caminata en tiempo libre → **Pase a la pregunta 22**

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

_____ **horas por día**
 _____ **minutos por día**

No sabe/No está seguro(a)

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

_____ **días por semana**

Ninguna actividad física vigorosa en tiempo libre → **Pase a la pregunta 24**

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

_____ **horas por día**
 _____ **minutos por día**

No sabe/No está seguro(a)

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

_____ **días por semana**

Ninguna actividad física moderada en tiempo libre →

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

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

_____ **horas por día**
_____ **minutos por día**

No sabe/No está seguro(a)

1.2.-Cuestionario de matutinidad-vespertinidad

VERSIÓN CASTELLANA DEL CUESTIONARIO DE MATUTINIDAD-VESPERTINIDAD DE HORNE Y OTSBERG

Nombre y apellidos:

Código:

Fecha:

PROCEDIMIENTO.

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

INSTRUCCIONES.

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

 2. Si sólo pensaras en cuando te sentirías mejor y fueras totalmente libre de planificarte el día. ¿A qué hora te acostarías?
 - 5 A las 8 - 9p.m.
 - 4 A las 9-10:30 p.m.
 - 3 A las 10:30-12:30 p.m.
 - 2 A las 12:30 1:30 p.m.
 - 1 A las 1:30-3 p.m.

3. Para levantarte por la mañana a una hora específica. ¿Hasta qué punto necesitas que te avise el despertador?
- 4 No lo necesito.
 - 3 Lo necesito poco.
 - 2 Lo necesito bastante.
 - 1 Lo necesito mucho.
4. En circunstancias ambientales normales. ¿Qué tal te resulta levantarte por las mañanas?
- 1 Nada fácil.
 - 2 No muy fácil.
 - 3 Bastante fácil.
 - 4 Muy fácil.
5. Una vez levantado por las mañanas. ¿Qué tal te encuentras durante la primera media hora?
- 1 Nada alerta.
 - 2 Poco alerta.
 - 3 Bastante alerta.
 - 4 Muy alerta.
6. Una vez levantado por las mañanas. ¿Cómo es tu apetito durante la primera media hora?
- 1 Muy escaso.
 - 2 Bastante escaso.
 - 3 Bastante bueno.
 - 4 Muy bueno.
7. Una vez levantado por las mañanas. ¿Qué tal te sientes durante la primera media hora?
- 1 Muy cansado.
 - 2 Bastante cansado.
 - 3 Bastante descansado.
 - 4 Muy descansado.
8. Cuando no tienes compromisos al día siguiente. ¿A qué hora te acuestas en relación con tu hora habitual?
- 4 Raramente o nunca más tarde.
 - 3 Menos de 1 hora más tarde.
 - 2 De 1 a 2 horas más tarde.
 - 1 Más de 2 horas más tarde.
9. Has decidido hacer un poco de ejercicio físico. Un amigo te propone hacerlo una hora dos veces por semana y según él la mejor hora sería de 7 a 8 de la mañana. ¿Cómo crees que te encontrarías?
- 4 Estaría en buena forma.

- 3 Estaría en una forma aceptable.
2 Me resultaría difícil.
1 Me resultaría muy difícil.
10. ¿A qué hora de la noche te sientes cansado y como consecuencia necesitas dormir?
- 5 A las 8-9 p.m.
4 A las 9-10:30 p.m.
3 A las 10:30 pm -12:30 am
2 A la 1-2 am.
1 A las 2-3 am.
11. Quieres estar en tu punto máximo de rendimiento para una prueba de dos horas que va a ser mentalmente agotadora. Siendo totalmente libre de planificar el día y pensando sólo en cuando te sentirías mejor. ¿Qué horario elegirías?
- 6 De 8 a 10 de la mañana.
4 De 11 de la mañana a 1 del mediodía.
2 De 3 a 5 de la tarde.
1 De 7 de la tarde a 9 de la noche.
12. Si te acostaras a las 11 de la noche. ¿Qué nivel de cansancio notarías?
- 0 Ningún cansancio.
2 Algún cansancio.
3 Bastante cansancio.
5 Mucho cansancio.
13. Por algún motivo te has acostado varias horas más tarde de lo habitual, aunque al día siguiente no has de levantarte a ninguna hora en particular. ¿Cuándo crees que te despertarías?
- 4 A la hora habitual y ya no dormiría más.
3 A la hora habitual y luego dormiría.
2 A la hora habitual y volvería a dormirme.
1 Más tarde de lo habitual.
14. Una noche tienes que permanecer despierto de 4 a 6 de la madrugada debido a una guardia nocturna. Sin tener ningún compromiso al día siguiente, ¿qué preferirías?
- 1 No acostarme hasta pasada la guardia.
2 Echar un sueñecito antes y dormir después.
3 Echar un buen sueño antes y un sueñecito después.
4 Hacer toda la dormida antes de la guardia.
15. Tienes que hacer dos horas de trabajo físico pesado. Eres totalmente libre para planificarte el día. Pensando sólo en cuando te sentirías mejor, ¿qué horario escogerías?

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.-Registro diario de sueño

Nombre y apellidos:

Código:

Fecha:

DÍA	SUEÑO NOCTURNO			SIESTA			HORARIO DE COMIDAS		OBSERVACIONES
	H. INIC	H. FINAL	DURAC	H. INIC	H. FINAL	DURAC	HORARIO INICIO	DE	
							DES COMIDA CENA		
							DES COMIDA CENA		
							DES COMIDA CENA		
							DES COMIDA CENA		
							DES COMIDA CENA		
							DES COMIDA CENA		
							DES COMIDA CENA		
							DES COMIDA CENA		
							DES COMIDA CENA		

3.-Registro diario de consumo de alimentos.

Día 1	Alimentos	Cantidad (g)
Desayuno Hora inicio Hora final Número Comensales Lugar		
Almuerzo Hora inicio Hora final Número Comensales Lugar		
Comida Hora inicio Hora final Número Comensales Lugar		
Merienda Hora inicio Hora final Número Comensales Lugar		
Cena Hora inicio Hora final Número Comensales Lugar		

4.- Ficha de paciente

Datos del paciente

edad	Código de paciente
------	--------------------

1- Antropometría:

Altura (m)	Peso 1º día (Kg)	Peso 4º día (kg)	Fecha de la última menstruación

	1º medida	2º medida	3º medida	media
cintura (cm) (nivel del ombligo)				
cadera (cm) (perímetro gluteofemoral)				

2- Composición corporal: Multifrequency bioimpedance

% masa grasa	Kg masa grasa	% Masa Magra	Kg Masa Magra	% Agua total	Kg Agua total

3.-Momento (hh:mm) de las mediciones:

Orina	12:00 Envase 1	16:00 Envase 2	20:00 Envase 3
Calorimetría			

Glucosa (mg/dl)					
G0	G1	G2	G3	G4	G5

5.-Toma de muestras de saliva

MUESTRAS DE SALIVA

Las muestras de saliva hay que tomarlas solamente 1 día. Para ello se utiliza un salivete. Un salivete consta de 4 partes:



1) **Tapón:** Se debe de cerrar bien, es decir que quede herméticamente cerrado evitando así las pérdidas de la muestra recogida por evaporación.

2) **Torunda:** Es un cilindro de algodón compacto, el cual debe ser introducido en la boca y humedecido con saliva.

3) **Tubo de plástico pequeño:** La primera funda de plástico que nos encontramos, y es en esta donde se debe introducir el algodón.

4) **Tubo de plástico grande:** Es el contenedor de plástico donde se introduce el tubo de plástico 3.

Para recoger la muestra basta con introducir la torunda (2) en la boca, entre la encía y la mejilla durante unos 30 segundos. Lo suficiente como para que quede empapado de saliva.

Una vez humedecido se introduce la torunda en el tubo pequeño (3) y se pone el tapón (1), **asegurándonos de cerrarlo bien**. Después se introduce todo en el tubo grande (4) y se guarda en la nevera (NO EN EL CONGELADOR), envuelto en papel de plata.

La toma debe ser antes de las comidas o una hora después de haber comido. Para facilitar la toma enjuagar con agua fría antes de la toma.

Recogida de muestras de saliva:

HORA	MUESTRA
 01:00h	Tomar la muestra en oscuridad si es posible o con luz de baja intensidad (No blanca). Mejor si estamos separados de la fuente de luz.
 9:00h	Haber comido y bebido al menos una hora antes de la toma
 13:00	Antes de comer
 23:00	Haber comido y bebido al menos una hora antes de la toma

ENVOLVER EN PAPEL DE ALUMINIO Y GUARDAR EN FRIGORÍFICO EN POSICIÓN VERTICAL HASTA EL DÍA DE ENTREGA.