



LA CRONOBIOLOGÍA, LA ALIMENTACIÓN Y LA SALUD

Marta Garaulet Aza
Universidad de Murcia

Resumen

Los ritmos circadianos (del latín *circa diem*, 'aproximadamente un día') son una parte tan innata de nuestras vidas que raramente le prestamos atención. 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. En humanos, los hábitos sociales actuales, tales como la reducción del tiempo de sueño, la irregularidad interdiaria del sueño-vigilia causado por el *jet-lag*, el trabajo por turnos, el aumento de la exposición a la luz brillante durante la noche, o el elevado consumo de *snacks*, son todos ellos factores que actúan sobre el cerebro induciendo una pérdida de la «percepción» de los ritmos internos y externos.

Actualmente, existen estudios que sugieren que la interrupción o desincronización interna del sistema circadiano, llamada *cronodisrupción* (CD), puede contribuir a las complicaciones que aparecen con la obesidad, tales como dislipidemia, intolerancia a la glucosa, disfunción endotelial, hipertensión, diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad cardiovascular, entre otras. La cronobiología (ciencia que estudia los cambios que presenta el individuo a lo largo del tiempo) está implicada en la mayoría de estas alteraciones. De hecho, es bastante conocido el control circadiano de la función cardiovascular, de las hormonas involucradas en el metabolismo tales como la insulina, el glucagón, la hormona del crecimiento y el cortisol, de aquellas implicadas en la obesidad, tales como la leptina y la ghrelina. Todos estos ritmos diarios pueden estar implicados en las señales de hambre y saciedad, los horarios de comidas y finalmente en el grado de obesidad.

Quizás en un futuro no muy lejano, las recomendaciones dietéticas incluirán no solo «qué» y «cómo» comer sino también «cuándo» debemos hacerlo. A lo largo de estas líneas trataremos de resumir los recientes descubrimientos en la cronobiología, y fisiopatología de la obesidad, realizados por nuestro grupo de investigación.

Abstract

Circadian rhythms (from the Latin circa 'around' and dies 'day') are such an innate part of our lives that we rarely take any notice of them. The correct functioning of these endogenous circadian rhythms allows organisms to anticipate changes in their environment and temporarily adapt their behavioural and physiological functions to these changes. In humans contemporary social habits, such as a reduction in the time spent sleeping, the inter-day irregularity of sleep-wakefulness caused by jet lag, shift work, increased exposure to bright light at night, or frequent snacking, are all factors that act on the brain, reducing our perception of internal and external rhythms.

Currently there are studies that suggest that chronodisruption (CD), i.e. interrupting or desynchronising the circadian system, can contribute to complications which appear with obesity, such as dyslipidemia, intolerance to glucose, endothelial dysfunction, hypertension, diabetes mellitus type 2 and cardiovascular disease, among others. Chronobiology (the science which studies the changes exhibited by the individual over time) deals with many of these alterations. The circadian control of cardiovascular functions is quite well known, as is that of the hormones involved in the metabolism, such as insulin, glucagon, the growth hormone and cortisol, and those involved in obesity, such as leptin and ghrelin. All these daily rhythms can be involved in sensations of hunger and satiety, meal times and ultimately the degree of obesity.

We may find that in the not so distant future dietary recommendations will include not only «what» and «how» we should eat but also «when» we should do it. In this article we will try to summarise recent discoveries by our research group in chronobiology and the physiopathology of obesity.

Introducción

¿Qué es la cronobiología?

Una de las características más evidentes de los seres vivos es la existencia de cambios rítmicos en su fisiología. En general, los organismos presentan un gran número de procesos que se producen de una manera periódica y previsible y que se pueden denominar «ritmos

biológicos». Las primeras evidencias científicas de un ritmo biológico fueron proporcionadas por el astrónomo francés Jean Jacques d'Ortous DeMarian en 1729 (JJ, 1972), que informó de los movimientos foliculares de la planta *Mimosa púdica*. Este investigador demostró que los movimientos de apertura y cierre de las hojas de esta planta se mantenían en condiciones de oscuridad constante durante varios días consecutivos. Pero no fue hasta la primera mitad del siglo XX, cuando se creó un nuevo campo de la ciencia: la llamada «Cronobiología». Algunos de los primeros estudios se realizaron por un ecologista Colin S. Pittendrigh (Pittendrigh, 1967) en la mosca de la fruta *Drosophila*. Este científico, gracias al estudio de los ritmos biológicos de este insecto, descubrió los principios básicos en los que se basa la cronobiología moderna.

La *cronobiología* es una palabra derivada de tres términos griegos: *kronos* de 'tiempo', *bio* de 'vida' y *logos* de 'estudio'. Se trata de un campo científico que estudia los procesos de sincronización que se producen en los organismos vivos en sus diferentes niveles de organización.

Así mismo, los *ritmos circadianos* se definen como los ritmos biológicos cuya frecuencia está «alrededor» (*circa*) de un día (24 h). Un ejemplo de estos ritmos circadianos lo constituyen las secreciones de algunas hormonas (cortisol, melatonina, etc.). Por otro lado los ritmos *ultradianos* se refieren a aquellos ritmos cuya frecuencia es mayor de un ciclo por día (periodo de menos de 20 h), tales como la respiración, latidos del corazón, movimientos intestinales, etc., mientras que, los ritmos *infradianos* son aquellos cuya frecuencia es inferior a un ciclo por día (periodo de más de 28 h), tales como los ritmos circalunares o el ciclo menstrual en los seres humanos. Todos estos tipos de ritmos caracterizan la función biológica de las diferentes especies de animales incluyendo a los seres humanos.

Organización del sistema circadiano

El sistema circadiano de los humanos está compuesto por una red de estructuras jerárquicamente organizadas responsables de la generación de ritmos circadianos y de su sincronización con el entorno. Este sistema circadiano está formado principalmente por un marcapasos central, o «reloj central» localizado una región del hipotálamo denominada el núcleo supraquiasmático (NSQ). En condiciones ambientales naturales, el NSQ se «reajusta» cada día mediante una señal periódica de luz/oscuridad que a través de los ojos, activa unas células ganglionares «no visuales» provistas de un pigmento llamado melanopsina. Aunque la luz (cambios luz/oscuridad) sea la principal señal entrante al NSQ, existen otras entradas periódicas, como son el horario de las comidas (ingesta/ayuno) y el ejercicio programado (actividad/reposo), capaces de poner en hora el sistema circadiano. Estos dos sincronizadores externos, la hora de la comida y del ejercicio, parecen influir principalmente a otros relojes que se encuentran en otros órganos de nuestro cuerpo. Y es que desde el año 2001 conocemos que el marcapasos central, a su vez, sincroniza la actividad de varios relojes periféricos presentes en la mayor parte de nuestros órganos y tejidos tales como en el corazón, el pulmón, el páncreas y el tejido adiposo, entre otros, mediante la secreción cíclica de hormonas y la actividad del sistema nervioso vegetativo.

Hoy en día se sabe que los ritmos circadianos no son resultado únicamente de la alternancia entre luz y oscuridad, sino que siguen oscilando cuando el organismo se encuentra aislado completamente de los ciclos externos, es decir, persisten incluso en condiciones ambientales constantes; estos ritmos son por tanto de origen endógeno. Recientes estudios moleculares del sistema del reloj biológico circadiano han revelado oscilaciones en la transcripción de genes reloj específicos que juegan un papel central en la generación de los ritmos circadianos. Muchos de estos genes reloj funcionan como agentes transcripcionales que en última instancia activan o inhiben su propia expresión en una serie de cascadas retroalimentadas (Dunlap, 1999). Entre estos *genes reloj* se encuentran los conocidos como elementos positivos, *CLOCK-BMAL1*, que forman heterodímeros y activan la transcripción de otros genes o elementos negativos, *PER* (Periodo 1, 2 y 3) y *CRY* (Criptocromo 1 y 2). Las proteínas resultantes *PER* y *CRY* se translocan de nuevo al núcleo e inhiben la actividad de *CLOCK-BMAL1*, por lo que presentan una función reguladora negativa (Shearman *et al.*, 2000). Además, estos relojes circadianos celulares son capaces de modular la expresión de múltiples genes dando lugar a importantes variaciones en la fisiología de la célula a lo largo de 24 h.

Cuando el sistema circadiano funciona mal: cronodisrupción

Durante estos últimos años en la ciencia de la cronobiología se ha introducido un nuevo término la «cronodisrupción (CD)» o interrupción circadiana que puede ser definida como una importante perturbación del orden temporal interno de los ritmos circadianos fisiológicos, bioquímicos y de comportamiento. También podría definirse como la ruptura de la sincronización entre los ritmos circadianos internos y los ciclos de 24 horas medioambientales (Erren y Reiter, 2009).

En nuestra sociedad moderna (24 h/7 días), la CD se produce por varias situaciones como el *jet-lag* y el trabajo por turnos, pero también por otras como la contaminación lumínica nocturna o la realización de actividades lúdicas preferentemente durante la noche. Hoy en día es evidente el efecto de la CD sobre la salud humana.

Causas de la cronodisrupción

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

- *Entradas*. Se ha observado que la deficiencia de luz o el hecho de presentar una intensidad y espectro de luz por debajo de los rangos óptimos pueden contribuir a la aparición de manifestaciones patológicas relacionadas con la CD. Los cambios en

horarios de las comidas, considerado uno de los más importantes sincronizadores externos, es también un importante factor de CD y que veremos en más detalle a lo largo de este artículo.

- *Oscilador central.* La CD también se puede producir por una alteración de la maquinaria molecular del reloj central, como es el caso de la alteración de sus propios genes reloj o incluso por una desincronización de este reloj central con los relojes periféricos situados en otros tejidos.
- *Salidas.* En este apartado se incluyen fallos en la secreción de la melatonina y el cortisol, que son las hormonas que van a comunicar el reloj central con los tejidos periféricos.

Cronodisrupción y enfermedad

La evidencia actual sugiere que la cronodisrupción está estrechamente asociada con un aumento del riesgo de desarrollar ciertas enfermedades o un empeoramiento de patologías preexistentes, como el envejecimiento prematuro, el cáncer, las enfermedades cardiovasculares o la obesidad (Garaulet *et al.*, 2010d).

Envejecimiento prematuro. El funcionamiento del sistema circadiano se ve afectado por la edad. Se ha demostrado que en edades avanzadas los ritmos circadianos se caracterizan por poseer la fase anticipada, una amplitud reducida, un empeoramiento de la habilidad de resincronización después de un cambio horario y una desincronización interna entre diferentes ritmos. Además, determinados estudios indican que la cronodisrupción tiene un efecto directo sobre la aceleración del envejecimiento.

Es por ello que la interrupción de los ritmos circadianos parece reducir las expectativas de vida, mientras que su apropiado funcionamiento permite un aumento de la longevidad.

Cáncer. Estudios realizados tanto en animales como en seres humanos han documentado que una de las consecuencias de la cronodisrupción es la iniciación y el desarrollo de cáncer. De hecho, se ha estudiado en humanos una relación entre la cronodisrupción y el diagnóstico del cáncer. En pacientes con cáncer colorrectal, se ha asociado el hecho de poseer ritmos bien marcados con una mejor calidad de vida, mejor respuesta a la quimioterapia y mayor supervivencia.

Enfermedades cardiovasculares. El patrón circadiano normal de presión arterial (*dipper*) se caracteriza por presentar los valores más bajos durante la noche y un máximo por la mañana coincidiendo con la hora del despertar de los individuos. Así, hoy en día se sabe que el mejor indicador para predecir el riesgo de infarto de miocardio es la presencia de valores de presión arterial elevados durante la noche. Existen casos en los que los valores de presión arterial no se reducen por la noche todo lo esperado y son similares a los valores diurnos. Se ha observado que este patrón de presión arterial, denominado *no dipper*, es característico de trabajadores por turnos o personas ancianas que presentan una alteración de los ritmos circadianos.

Obesidad. Recientes estudios han mostrado que uno de los efectos que tiene la cronodisrupción sobre la salud humana es el desarrollo de obesidad y síndrome metabólico. Muchas de las funciones del sistema circadiano relacionadas con el metabolismo –como la regulación metabólica de lípidos y glucosa o la respuesta a la insulina– pueden verse perjudicadas por la cronodisrupción, contribuyendo a la fisiopatología de la obesidad.

Alimentos, patrones y horarios de comida como sincronizador del reloj circadiano

El conocimiento del horario de comidas y su relación con la obesidad es un tema de actualidad en la ciencia y en la sociedad del momento. Es interesante observar la persistencia de un patrón básico de «tres comidas al día» a través de diferentes culturas y diferentes épocas. Este patrón consiste en hacer tres tomas, una por la mañana, desayuno; otra al mediodía, comida; y otra por la noche, cena, aunque en ocasiones se incorporen otras dos tomas a media mañana y a media tarde. Es de destacar que este patrón se ha observado incluso en humanos completamente aislados del exterior a quienes se les permitía comer cuánto y cuándo quisieran. Así, prácticamente todos los sujetos estudiados eligieron comer tres veces al día a intervalos comparables a las que siguen en su vida cotidiana. De hecho, es bien sabido que un horario regular de comidas ayuda a mantener el orden temporal interno del sistema circadiano, pero la sociedad actual de 24 h en la que vivimos hace que con frecuencia abandonemos estos patrones, no solo por el trabajo a turnos y el *jet-lag*, sino también y sobre todo en jóvenes, debido las horas de estudio, de ocio y de placer, lo que se conoce como el «*jet-lag* social».

Desde el punto de vista fisiológico, una de las principales señales de apetito es el horario de la comida. A veces comemos en ciertos momentos del día simplemente porque es la hora de comer, sin sentir verdaderamente apetito. Además, algunas obesidades se relacionan con ingestas específicas a ciertas horas del día. Así, nuestro grupo de investigación ha demostrado una asociación entre la acumulación de grasa, en especial en el abdomen y la ingesta de grasas saturadas y azúcares simples, específicamente por la noche. Además este comportamiento alimentario se asocia con la variabilidad diaria del cortisol plasmático y con el grado de obesidad.

Paralelamente al incremento de la obesidad en los últimos años la proporción de adultos en EEUU que se salta el desayuno ha aumentado de un 14 a un 25 % en el periodo de 26 años transcurrido entre 1965 y 1991 (Haines *et al.*, 1996), lo cual plantea la cuestión de si podría haber una relación causal del horario de la comida en la obesidad. Así, durante años ha habido una creencia popular que defendía que saltarse el desayuno y trasladar la ingesta energética hacia la tarde-noche, suponía un aumento de la obesidad. Sin embargo, no ha sido hasta estos últimos años cuando la ciencia ha empezado a demostrar que el momento de la ingesta es un factor clave en la obesidad, independientemente de la ingesta calórica diaria.

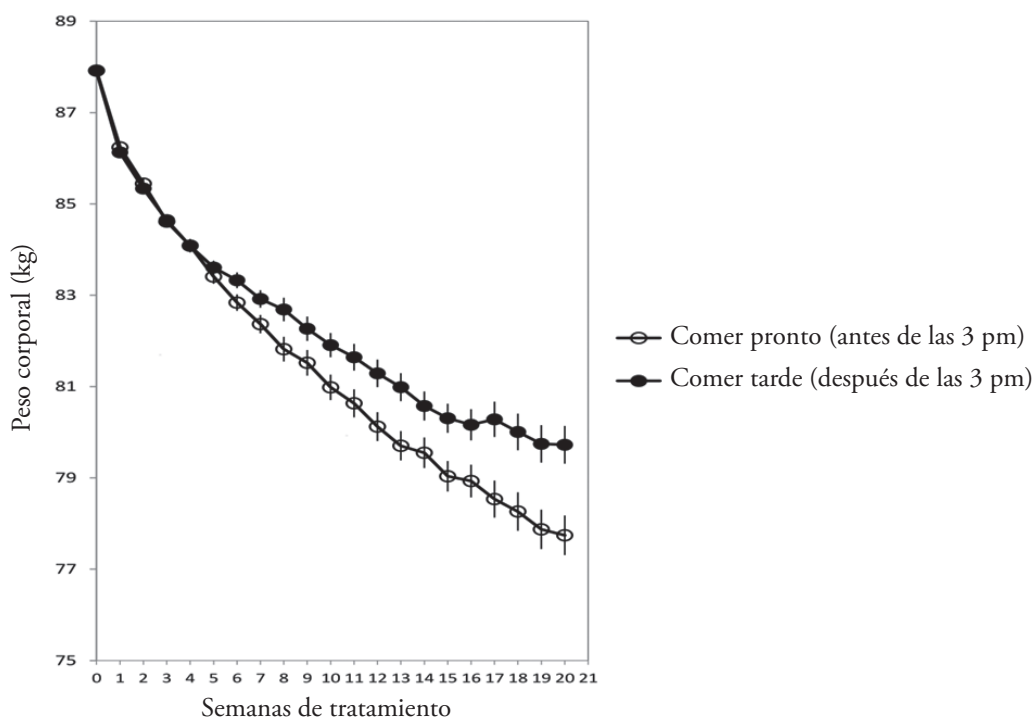
Así, en el año 2009, los datos experimentales en animales mostraron que la inversión del ciclo de alimentación/ayuno, sin cambios en la ingesta calórica total, provocaba un aumento dramático de la ganancia de peso con una dieta de alto contenido graso, resultados que fueron confirmados en estudios posteriores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

Por otro lado, también cambios más sutiles en el horario de las comidas, es decir, en la distribución de la ingesta calórica durante un periodo normal de vigilia, parece 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) (Jakubowicz *et al.*, 2013).

Un estudio que ha resultado de relevancia en este campo ha sido el estudio longitudinal realizado por nuestro grupo de investigación en colaboración con el grupo de sueño de la Universidad de Harvard y la Universidad de Tufts, y publicado en 2013 en la revista *International Journal of Obesity* (Garaulet *et al.*, 2013). En él hemos demostrado que en España, el momento de la comida principal del día era predictivo de la pérdida de peso. En esta población, comer después de las tres de la tarde, resultaba en una pérdida de peso menor que la de aquellos que comían antes de las tres. 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 1).

La importancia de este trabajo radica en que es el primero en demostrar que no solo «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 tres) como los tardíos (después) presentaron ingestas y gastos energéticos semejantes, lo que hace necesario encontrar una explicación metabólica a estos resultados, así como tratar de explicar su conexión con el horario del tejido adiposo, órgano a partir del cual se moviliza la grasa corporal en la pérdida de peso. El hecho de haber demostrado previamente la existencia de un reloj periférico en el tejido adiposo (Garaulet *et al.*, 2011a), en el que el horario de máxima expresión de los genes más relevantes difiere en los distintos momentos del día nos hace pensar que el horario de comida pueda afectar a la diferente movilización o acúmulo de grasa en el tejido adiposo, y como consecuencia a la eficacia en la pérdida de peso.

Figura 1. Diferencias en la pérdida de peso durante 20 semanas de tratamiento entre comedores tempranos (antes de las 3 pm) y comedores tardíos (después de las 3 pm)



Fuente: Garaulet *et al.* (2013).

Con el fin de profundizar en el mecanismo implicado en estos resultados, nuestro grupo de investigación ha llevado a cabo un estudio en mujeres sanas (Bandin *et al.*, 2014) en el que se las sometía a dos condiciones: a) comer a las 13:00 h y b) comer a las 16:30 h, en ambas situaciones la dieta ingerida fue la misma. Nuestros resultados mostraron la existencia de cambios en el patrón circadiano de la temperatura corporal medida en la muñeca, con un aplanamiento del segundo armónico correspondiente a la hora de la siesta (previamente asociado con la obesidad) y también un aplanamiento del patrón de secreción de cortisol para la condición de comer tarde (previamente asociado con situaciones de estrés). Respecto a la tolerancia a la glucosa, comer tarde en la comida principal resultó en un aumento del área bajo la curva en un 46 % en comparación con aquellos que comían temprano, mostrando una menor tolerancia a la glucosa. Además, comer tarde dio lugar a un cociente respiratorio menor, lo que indica una menor utilización de hidratos de carbono y también un menor gasto de energía basal que cuando se comía temprano (Figura 2). Todos estos resultados podrían explicar en parte por qué comer tarde se asocia con alteraciones metabólicas propias de la obesidad con una menor pérdida de peso corporal (Bandin *et al.*, 2014).

Figura 2. Alteraciones metabólicas producidas tras una semana de comer tarde



Fuente: Bandin *et al.* (2014).

Horario de la actividad física como sincronizador del reloj circadiano

Durante décadas se ha investigado el papel de la actividad física como sincronizador externo de nuestro sistema circadiano, así diversos trabajos realizados en los años 70 del pasado siglo, vinculaban la variación diurna de la presión arterial con la actividad física en humanos. Sin embargo, hasta hace poco se desconocía qué momento del día era el más adecuado para realizar actividad física con el fin de mantener una buena salud del sistema circadiano. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha estudiado la influencia de la actividad física realizada por la mañana o por la tarde sobre la ritmicidad circadiana, mediante el estudio de la temperatura corporal, considerada un marcador para evaluar el ritmo circadiano y para identificar sus posibles trastornos.

Los participantes realizaron actividad física controlada (45 minutos de carrera continua) durante 7 días por la mañana y otra semana por la tarde (los resultados se compararon con una semana control en la que no se realizó actividad). El trabajo mostró que, en base a los efectos observados en el ritmo circadiano, la realización de la actividad física intensa durante la noche podría no ser tan beneficioso como la actividad realizada durante la mañana (Rubio-Sastre *et al.*, 2014).

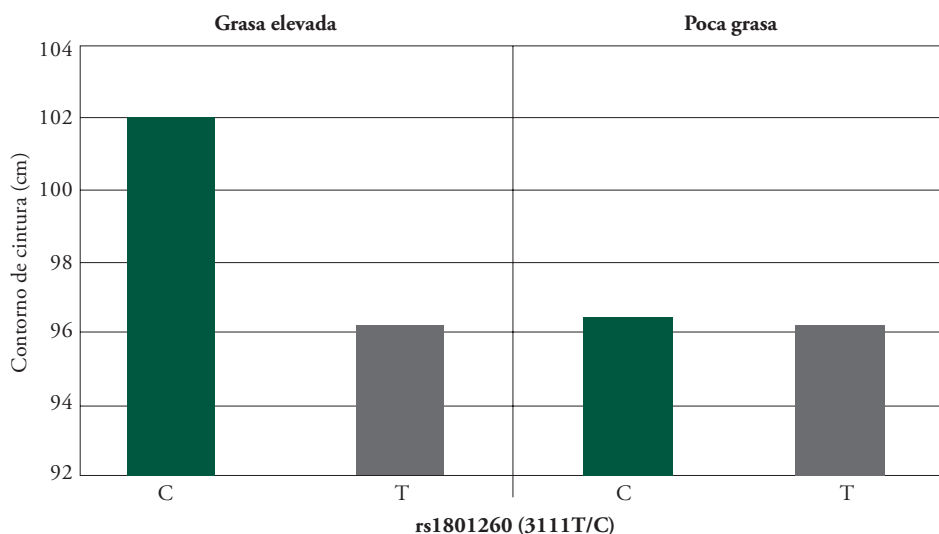
Nutrigenética y cronobiología

La nutrigenética es una ciencia actual que se basa en la posible interacción entre genes y medioambiente en relación a la obesidad u otras patologías asociadas a la nutrición. En general se acepta que las variantes comunes en genes candidatos para el metabolismo de lípidos, inflamación y obesidad se asocian con valores plasmáticos alterados de biomarcadores clásicos y nuevos del síndrome metabólico.

En lo que se refiere al sistema circadiano, fue en 2008 cuando Sookoian *et al.* (2008) publicaron por vez primera que las diferentes variantes del gen *CLOCK* se asociaban con obesidad, especialmente con la obesidad abdominal. Además, Scott *et al.* (2008) confirmaron esta hipótesis al demostrar que la variante génica *CLOCK* podría desempeñar un papel en el desarrollo del síndrome metabólico, diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares.

Más tarde, nuestro propio grupo de investigación de la Universidad de Murcia en colaboración con la Universidad de Tufts (EEUU) replicó estos datos en una población de norteamericana (GOLDN) y en una población mediterránea del Sudeste de España (*Spanish Weight Loss Population*) (SWLP). En ambas poblaciones, cuatro de los cinco polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) estudiados en el gen *CLOCK* se relacionaron con la obesidad, la obesidad abdominal y una mayor ingesta de energía (Garaulet *et al.*, 2009; Garaulet *et al.*, 2010c). Por otra parte, los portadores del alelo menor (A) del SNP rs4580704 mostraron un riesgo disminuido (31 % menor) de desarrollar diabetes y de padecer hipertensión (46 % menor) que los no portadores (Garaulet *et al.*, 2009). En el estudio realizado en la población mediterránea española, la variación genética (C) en el *CLOCK* rs1801260, también llamado *CLOCK* 3111 T>C, se asoció con un aumento de obesidad y con una menor pérdida de peso (Garaulet *et al.*, 2010b). Además, la proporción de sujetos que dormía menos de 6 horas al día, fue mayor entre los sujetos portadores de la variante menor C de este polimorfismo que los no portadores (59 % *versus* 41 %)(Garaulet *et al.*, 2011b). Es interesante la interacción observada entre las variantes del *CLOCK* y la composición en ácidos grasos de la dieta y de las membranas celulares (Garaulet *et al.*, 2009). De hecho, se identificaron interacciones gen-dieta asociados al síndrome metabólico en el locus *CLOCK*. Por ejemplo la asociación entre la variante génica de riesgo y la obesidad en *CLOCK* 3111TC solo estuvo presente cuando los individuos ingerían un exceso de grasa (Figura 3). Por otro lado, el efecto protector del alelo menor hacia la sensibilidad a la insulina solo estaba presente cuando la ingesta de de ácidos grasos monoinsaturados presentes en el aceite de oliva fue elevada (Garaulet *et al.*, 2009). Estos resultados sugieren que la fuente dietética y el contenido graso de las membranas celulares están implicados en las alteraciones del sistema circadiano y síndrome metabólico.

Figura 3. Ejemplo de interacción gen nutriente



* El efecto negativo de la variante genética sobre la obesidad solo se presenta cuando se come en exceso.

Fuente: Garaulet *et al.* (2009).

Otros polimorfismos del reloj circadiano

Otros polimorfismos de genes reloj asociados con obesidad y con la conducta alimentaria son los descritos en el gen *PERIOD 2 (PER2)* (Garaulet *et al.*, 2010a). Diversos estudios han demostrado que los SNPS del *PER2* rs2304672C > G y rs4663302C > T se asocian con trastornos psicológicos, en especial depresión estacional y trastorno bipolar. Esto nos llevó a estudiar si las conductas obesogénicas en pacientes con sobrepeso u obesidad se asociaban de igual manera con estas variantes génicas del *PER2*. Así, nuestros resultados mostraron que aquellos portadores del alelo menor del *PER2* rs2304672 presentaban una mayor obesidad abdominal, y comportamientos obesogénicos, con mayores tasas de abandono del tratamiento, de picoteo, de estrés por la dieta, se saltaban el desayuno y tendían a comer más cuando estaban aburridos, que los portadores del alelo mayor (Garaulet *et al.*, 2010a).

Por otro lado estas variantes genéticas en los genes reloj *CLOCK* y *PER2*, se asocian a su vez con la ingesta de energía. Aunque su relación con la obesidad está modulada por la cantidad y tipo de grasa en la dieta. Solo aquellos sujetos portadores del alelo de riesgo y que además ingerían una dieta alta en grasas saturadas presentaron obesidad. Sin embargo, cuando la ingesta de grasa era baja, tanto los portadores del alelo mayoritario, como los portadores del alelo de riesgo estaban delgados. Lo que demuestra que el efecto «negativo» de la variante genética solo está presente cuando los hábitos alimentarios son inadecuados.

Nuestros resultados en *CLOCK* mostraron además que la variante rs1801260 (3111T > C) puede predecir el resultado de estrategias de reducción de peso basadas en dietas baja en energía. Así, los portadores del alelo C pueden presentar mayor grado de obesidad y más dificultad para perder peso con una dieta baja en energía. Esta dificultad para bajar de peso se observó a lo largo de todo el tratamiento, aunque fue más evidente a partir del tercer mes de tratamiento (Garaulet *et al.*, 2010b). Por último, en una publicación muy reciente hemos demostrado que la reducción del sueño, preferencias por la noche (cronotipo vespertino) y la ritmicidad circadiana de la temperatura corporal podrían estar implicados en la dificultad de pérdida de peso para el SNP *CLOCK* 3111T/C. De hecho, la cronodisrupción se ha relacionado con una baja efectividad en los tratamientos de pérdida de peso (Bandin *et al.*, 2013a).

Otros resultados de nuestro grupo y el grupo de Nutrición de la Universidad de Murcia y el grupo de Nutrición y Genética de Tufts muestran como una variante génica en *REV-ERB α* rs2071427 se asocia con obesidad en dos poblaciones diferentes, una norteamericana y otra mediterránea (Garaulet *et al.*, 2014). Este gen es considerado el nexo molecular entre el elemento positivo del reloj, que aumenta su actividad y que está constituido por el dímero *CLOCK* y *BMAL1*; y el elemento negativo (*PER* y *CRY*), que enlentece el funcionamiento del reloj. El interés de en *REV-ERB α* rs2071427 radica en que su asociación con la obesidad se debe a una disminución de la actividad física, y no a un aumento de la ingesta como sucede con la mayoría de los genes reloj (Garaulet *et al.*, 2014). De hecho nuestros resultados son semejantes a los obtenidos en animales de experimentación que muestran que aquellos ratones que presentan una mutación en este gen, presentan una disminución en la movilidad locomotora espontánea. Otros resultados interesantes son los encontrados en *CRY1* rs2287161, elemento negativo del reloj central, cuyos ratones *knock-out* muestran alteraciones en la ritmicidad circadiana de este gen reloj en el hígado y como consecuencia fallos en el proceso de gluconeogénesis y en el metabolismo de glucosa.

Nosotros en humanos hemos demostrado en dos poblaciones independientes una interacción entre este polimorfismo *CRY1* rs2287161 y la ingesta de carbohidratos, para la resistencia a la insulina HOMA-IR (Dashti *et al.*, 2014). De hecho solo aquellos individuos portadores del alelo de riesgo y que además toman exceso de carbohidratos presentan resistencia a la insulina. Mientras que si la ingesta de carbohidratos es baja, desaparece el riesgo en estos sujetos. Lo que demuestra la importancia de una dieta saludable, en especial en individuos con variantes génicas de riesgo.

Un reloj periférico en el tejido adiposo

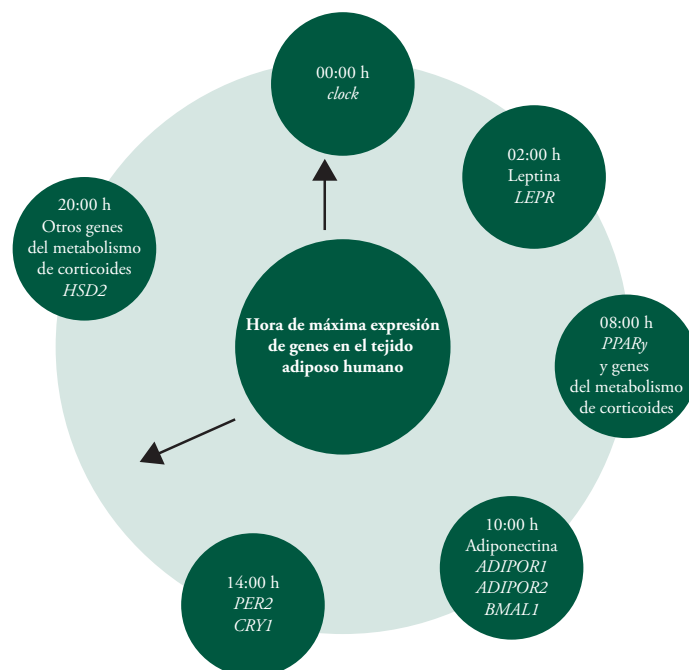
En obesidad, el tejido protagonista es el tejido adiposo. El exceso de energía se acumula en este tejido, y cuando se produce una acumulación excesiva de grasa, hablamos de obesidad. Desde el punto de vista cronobiológico, el tejido adiposo es un tejido periférico en el que se expresan genes reloj que juegan un papel fundamental en la fisiología del propio tejido, y en

la fisiopatología de la obesidad. Estos genes reloj son capaces de regular la expresión rítmica de diversas sustancias bioactivas secretadas por el tejido adiposo como es la adiponectina, la leptina y la resistina, entre otras, y que afectan el metabolismo sistémico. Investigaciones recientes muestran la importancia que tiene el funcionamiento correcto de los genes reloj del tejido adiposo y el efecto de su desincronización en el desarrollo de ciertas enfermedades como es la obesidad.

En este contexto, la literatura científica actual abunda en trabajos que proporcionan una revolución en el estudio de la biología del tejido adiposo. De hecho, muchos de los genes en el tejido adiposo muestran ritmicidad circadiana. Según estudios de *microarrays* aproximadamente el 25 % en los seres humanos y el 50 % en modelos animales de genes expresados en el tejido adiposo sigue un patrón diario rítmico y dependiendo del tejido, entre el 10-30 % del total de genes, está controlado por el reloj circadiano molecular. Así, en un estudio realizado en plasma sanguíneo y saliva de humanos, se ha demostrado que aproximadamente el 15 % de todos los metabolitos identificados están controlados por el sistema circadiano y este control es independiente del sueño y la alimentación.

En lo que se refiere a la obesidad es de crucial importancia la existencia de un reloj periférico en el tejido adiposo humano. En este sentido nuestro equipo de investigación ha descubierto que los genes reloj se expresan en diferentes localizaciones adiposas (visceral y subcutánea) en un momento determinado del día (Gómez-Santos *et al.*, 2009) y que además esta expresión es dependiente del sexo (Gómez-Abellán *et al.*, 2012). Además hemos demostrado que tanto los elementos negativos del reloj, *PER2* y *CRY1*, como los positivos, *CLOCK* y *BMAL1*, muestran ritmicidad circadiana en su expresión y oscilan independientemente del reloj central del organismo, del NSQ. De hecho, cuando se estudió la expresión de estos genes reloj del tejido adiposo en cultivo, es decir *ex vivo*, la ritmicidad circadiana perduró al menos durante dos ciclos circadianos después de la cirugía, lo que demuestra la existencia de un reloj periférico independiente del reloj central y capaz de actuar fuera del organismo, sin la influencia del NSQ (Gómez-Santos *et al.*, 2009). Los genes reloj en el tejido adiposo también pueden modular la expresión de otros genes, los denominados genes controlados por el reloj (CCG: del inglés «Clock Controlled Genes»), que no están directamente implicados en la maquinaria del reloj, pero son capaces de inducir la expresión de muchos genes diana. En este sentido nuestro propio grupo de investigación ha publicado que existen diferentes genes implicados en el metabolismo del tejido adiposo que muestran expresión circadiana (Hernández-Morante *et al.*, 2009; Gómez-Abellán *et al.*, 2010; Gómez-Santos *et al.*, 2011). La Figura 4 representa la hora de máxima expresión de diferentes genes implicados en el metabolismo del tejido adiposo.

Figura 4. Orden temporal en el tejido adiposo humano, donde se muestra la hora máxima de expresión de los diferentes genes importantes en el metabolismo del tejido adiposo



Fuente: Garaulet *et al.* (2011a).

Ritmos circadianos y predicción de la pérdida de peso

Actualmente uno de los mayores retos en los tratamientos de pérdida de peso es poder detectar factores predictivos de éxito. El análisis de la interacción entre los genes, la dieta y los factores de comportamiento son actualmente algunas sugerencias tentadoras sobre la posibilidad de utilizar este enfoque como una herramienta para el éxito de dichos tratamientos. Debemos de ir hacia tratamientos personalizados. Por otro lado está descrito que la genética está detrás de nuestra maquinaria circadiana. El polimorfismo del *CLOCK* 3111T/C se ha relacionado con anterioridad con obesidad y pérdida peso.

Con el fin de tener un mayor conocimiento sobre la relación entre los ritmos circadianos y la obesidad, nuestro grupo de investigación llevó a cabo los siguientes estudios: se determinó las posibles diferencias en la ritmicidad circadiana del polimorfismo *CLOCK* 3111T/C en mujeres con sobrepeso, mediante la evaluación de la temperatura periférica, actimetría y posición (Bandin *et al.*, 2013b). Nuestros resultados mostraron que los pacientes con el alelo menor C presentaban alteraciones circadianas: menor amplitud y una mayor fragmentación del ritmo, un patrón circadiano menos estable, y una función circadiana debilitada significativamente, según la evaluación del índice de funcionalidad circadiana (CIF), en comparación con los

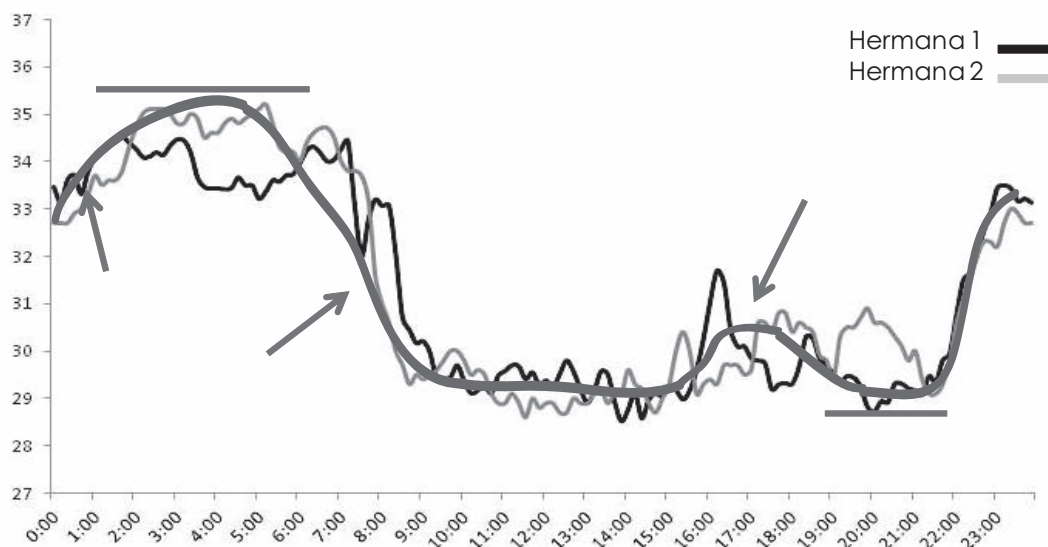
sujetos TT, que mostraron perfiles del ritmo circadiano más robustos. Además los portadores C eran menos activos, iniciando sus actividades más tarde en la mañana y presentando mayor somnolencia durante el día, mostrando una acrophase retrasada característica de los individuos vespertinos (Bandin *et al.*, 2013b).

Posteriormente, nos planteamos si los ritmos circadianos podrían ser factores predictivos de la efectividad de los tratamientos de pérdida de peso (Bandin *et al.*, 2013a). Nuestros resultados mostraron que aquellos individuos menos respondedores a un tratamiento de pérdida de peso presentaban un patrón circadiano de temperatura periférica más aplanado, caracterizado por una menor amplitud, una mayor variabilidad intradiaria, y un índice de funcionalidad circadiana deteriorado, si los comparábamos con los individuos que presentaron una mayor respuesta al tratamiento. Además se encontraron diferencias significativas para los valores medios de la posición del cuerpo, presentando los bajos respondedores posiciones más tumbadas en comparación con aquellos individuos que presentaron una mayor respuesta al tratamiento (Bandin *et al.*, 2013a).

Hereditabilidad del sistema circadiano

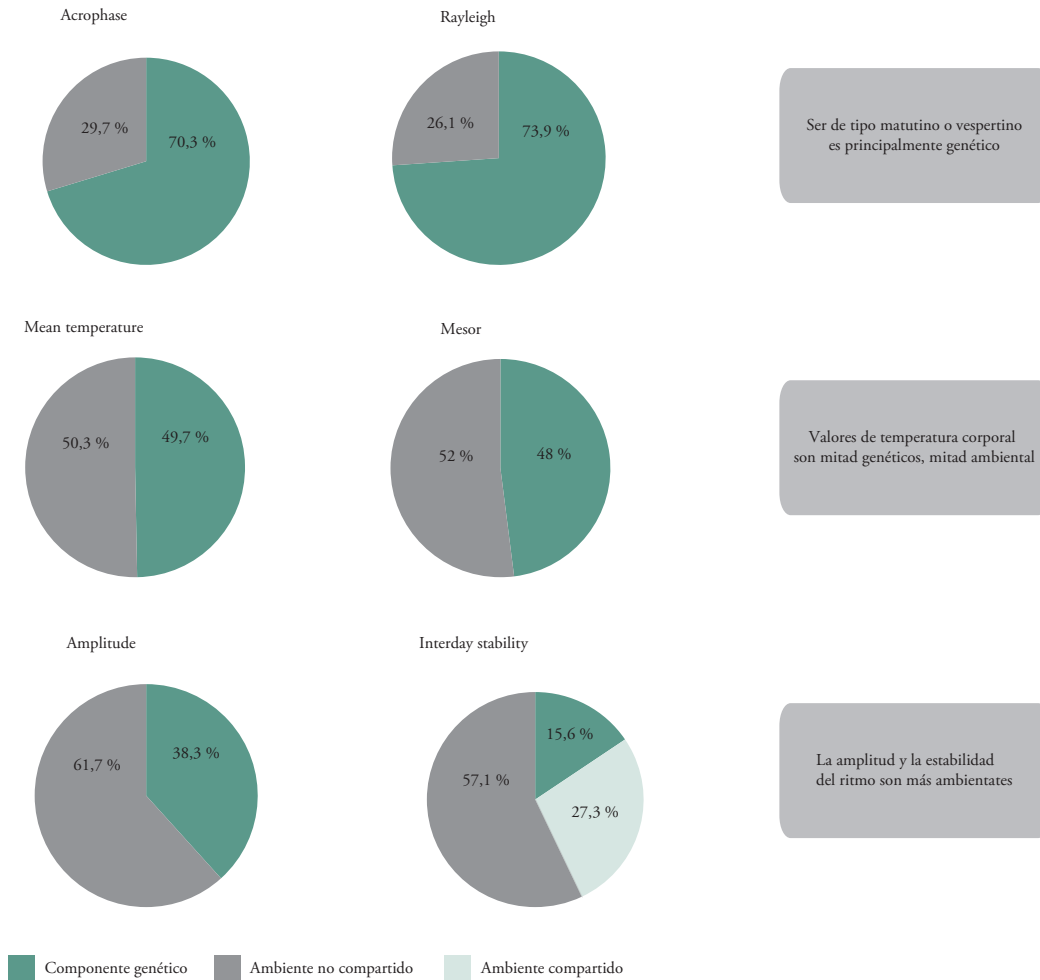
Una vez demostrada la existencia de la asociación entre obesidad y diversas variantes de genes reloj, nos planteamos la pregunta de cuál sería la magnitud en la hereditabilidad del sistema circadiano. De hecho, la alteración del sistema circadiano y su efecto sobre la salud humana es un tema emergente. Muchos estudios enlazan la cronodisrupción con patologías tales como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y la obesidad. En este sentido, el uso de modelos basados en gemelos para la evaluación de la hereditabilidad del sistema circadiano es relevante para la investigación de la salud humana. La contribución genética relativa, aditiva y no aditiva, y la de los factores ambientales compartidos y no compartidos, se puede estimar mediante modelos clásicos genéticos tales como el «modelo de ecuación estructural genético» (SEM). Para responder a nuestra pregunta, estudiamos 53 pares de gemelas, 28 pares de monocigóticas y 25 dicigóticas (mellizas), y evaluamos su temperatura corporal mediante un registro continuo durante 7 días de su vida habitual (López-Mínguez *et al.*, 2014) (Figura 5). Los modelos genéticos apuntaron a una moderada a alta hereditabilidad para la mayoría de los parámetros analizados, lo que sugiere una influencia genética relevante en los patrones circadianos. Esta hereditabilidad fue especialmente alta del 50 hasta un 74 % en la acrofase y la estabilidad de la fase, lo que se puede traducir en que el hecho de ser matutino o vespertino, presenta un componente eminentemente genético. Sin embargo, otras características del ritmo de temperatura tales como la amplitud y la potencia del primer armónico, mostraron una tendencia no significativa a un efecto genético, siendo este de menor magnitud, de entre el 33 y 40 % (López-Mínguez *et al.*, 2014). Otros factores como la estabilidad del ritmo entre los diferentes días de la semana (estabilidad interdiaria) presentaban un componente eminentemente ambiental. En la Figura 6 se representan las estimaciones generales de hereditabilidad y el efecto ambiental de las diferentes variables estudiadas de la temperatura.

Figura 5. Patrón diario (de normalidad) de temperatura periférica en dos hermanas gemelas monocigóticas



- 1) Incremento de temperatura después del apagado de luces al acostarse.
- 2) Etapa nocturna de elevadas temperaturas.
- 3) Una caída pronunciada después del despertar.
- 4) Un pico secundario en la tarde, posradial asociado con la siesta.
- 5) Una caída entre las 8 pm y las 10 pm, un período conocido como «zona de mantenimiento del despertar».

Figura 6. Estimaciones generales de heredabilidad y el efectos ambiental de las diferentes variables estudiadas de temperatura periférica



Ser de tipo matutino o vespertino es principalmente genético

Valores de temperatura corporal son mitad genéticos, mitad ambiental

La amplitud y la estabilidad del ritmo son más ambientales

Con estos resultados podemos deducir que en la práctica clínica podría ser útil centrar esfuerzos en la modificación de los parámetros que dependen principalmente de las condiciones ambientales tales como la amplitud y la estabilidad interdiaria con el fin de mejorar la salud circadiana del paciente. Sin embargo, es importante observar que parámetros de temperatura relevantes tales como la fase, la estabilidad de fase del ritmo, la temperatura media y la variabilidad dentro de cada día (intradía) muestran influencias genéticas, aunque siguen siendo dependientes del medio ambiente y, por lo tanto, susceptibles de cambio a través de intervenciones externas. La presencia de estos factores genéticos apunta hacia la endogenidad como la causa principal de la coincidencia de los ritmos de temperatura entre las hermanas monocigóticas. Por lo que investigaciones futuras deberían basarse en estas conclusiones para identificar bases genéticas y tipos de intervención relacionadas con la salud cronobiológica.

La epigenética y los ritmos circadianos

La epigenética defiende que el código genético no es el único determinante del fenotipo del individuo, sino que es la disposición en el espacio del ADN lo que hace que se expresen o no ciertos genes. Metilaciones en citosina en ciertas regiones del gen llamadas CpG (regiones del ADN donde el nucleótido de citosina se encuentra próximo al de guanina unidos por un fosfato), dan lugar a una especie de «gorros químicos» que la mayoría de las veces impiden la expresión del gen. Lo interesante de estas metilaciones es que se producen incluso en la edad adulta, y que son consecuencia de la dieta y otras conductas. Luego si hacemos cambios en estas conductas podemos desmetilar/metilar ciertos genes y modular su expresión. La conexión entre la epigenética y la maquinaria del reloj surgió por primera vez con el estudio de (Crosio *et al.*, 2000) quienes demostraron que la remodelación de la cromatina estaba involucrada en la expresión de los genes reloj. Estos autores mostraron que un pulso de luz, cuando se aplica a los ratones durante la noche, induce a la fosforilación de histonas en NSQ lo que implica una inducción de la traducción del gen *PER1*. Posteriormente, se ha indicado que las modificaciones de histonas en los promotores de genes controlados por el reloj ocurren de manera circadiana.

En este sentido, nuestro grupo de investigación ha demostrado por primera vez (Milagro *et al.*, 2012) que el estado de metilación de sitios CpG localizados en los genes del reloj (*CLOCK*, *BMAL1* y *PER2*) se asocia con el grado de obesidad, con las alteraciones propias del síndrome metabólico y con la pérdida de peso. Por ello, proponemos que el estado de metilación de los distintos sitios CpG en *CLOCK* y *PER2* podría ser utilizado como biomarcador de éxito de pérdida de peso (Milagro *et al.*, 2012).

Detección de la cronodisrupción en la práctica clínica

A diferencia de lo que sucede en otras ciencias, en cronobiología el tiempo es la clave. Por tanto, es necesario determinar las variables fisiológicas clásicas desde una nueva perspectiva. En este sentido, no basta con la determinación basal en ayunas, sino que se hace necesario realizar distintas determinaciones a lo largo de las 24 horas, y por ello ante una variable rítmica la influencia de los intervalos de muestreo es crucial. Entre las variables utilizadas para determinar la cronobiología de un individuo, destacan la temperatura corporal (tanto central como periférica), la presión arterial y la secreción de la mayoría de hormonas, en especial la melatonina y el cortisol. Todas estas variables presentan ritmos robustos y precisos, y constituyen buenos indicadores del funcionamiento del sistema circadiano. Si es técnicamente posible, lo ideal es que se registren simultáneamente dos o más ritmos marcadores de un mismo organismo.

Nuestro grupo de investigación ha ensayado técnicas no invasivas y fáciles de medir para tratar de detectar la cronodisrupción en los pacientes con obesidad. Nuestros resultados muestran que un registro de la temperatura periférica junto con dos cuestiones de inicio y final del sueño y una medida de cortisol salival por la mañana, podrían ser suficientes para caracterizar la cronobiología de la obesidad (Corbalan-Tutau *et al.*, 2014b).

Determinación de la temperatura periférica

Para medir la temperatura periférica se utilizan los *iButton*[®] (*Thermochron*[®]). Básicamente se trata de un *chip* encapsulado en acero inoxidable que se coloca en la muñeca del paciente y se sujeta con una muñequera. La memoria de este chip admite hasta 2.500 datos.

Tras esta determinación, se detecta la variación circadiana de la temperatura periférica y mediante el análisis del ritmo (amplitud, acrofase, mesor, variabilidad intradiaria, etc.) se puede estudiar si este es saludable o no.

Medición del cortisol salival

Estudios previos indican que la medición de cortisol salival es una alternativa válida a las mediciones de cortisol en plasma. Además, las muestras salivales se obtienen mediante un procedimiento no invasivo, libre de estrés, y son más fáciles de recoger con *salivettes*, incluso en casa, lo que evita muchos problemas, tales como la falta de personal cualificado. Los resultados previos de nuestro grupo han demostrado un aplanamiento de los ritmos circadianos del cortisol con la obesidad (García-Prieto *et al.*, 2007). Junto a estas ventajas, las muestras salivales son particularmente convenientes para los estudios de cronobiología, ya que pueden ser recogidas muchas veces al día y pueden proporcionar importante información sobre el sistema circadiano.

En cronobiología se suelen tomar al menos tres muestras de saliva para la determinación del cortisol: por la mañana, después de comer y por la noche (Corbalan-Tutau *et al.*, 2014a). Sin embargo, los resultados obtenidos por nuestro equipo indican que la muestra de cortisol tomada por la mañana presenta una mayor importancia estadística, lo que sugiere que en la práctica clínica esta primera muestra tomada por la mañana podría ser la más útil (Corbalan-Tutau *et al.*, 2014b).

Registro del sueño

Nuestra experiencia muestra que en la práctica clínica, en lugar de tener que completar complicados diarios de sueño, solo sería necesario que el paciente registrara la hora de inicio del sueño y la hora de despertar (Corbalan-Tutau *et al.*, 2014b). Un retraso en la hora habitual de irse a dormir se considera un importante cronodisruptor.

Desarrollo de un índice de cronodisrupción

Con todos estos datos, se calcula un índice de cronodisrupción según el cual los pacientes se podrían dividir en dos poblaciones en función de sus alteraciones circadianas (Corbalan-Tutau *et al.*, 2014b).

Así, aquellos individuos que tienen este valor por encima de 40,3 presentan cronodisrupción, mientras que los que lo tienen por debajo no presentan alteraciones cronobiológicas. Además, aquellos individuos que tienen cronodisrupción son también los que presentan un aumento de los diversos componentes del síndrome metabólico. Es importante resaltar que este índice se ha desarrollado en personas normopeso o con obesidad moderada, por lo que serían necesarios nuevos estudios sobre la aplicación de este índice en el caso de obesidad mórbida y la predicción de la respuesta a la dieta o al tratamiento de cirugía mórbida

En conclusión

Los resultados de nuestro grupo muestran la asociación existente entre alteraciones del sistema circadiano y la obesidad. Cambios en los horarios de sincronizadores externos del reloj circadiano, tales como el horario de comida y de actividad física, pueden mejorar nuestra salud circadiana. De hecho los horarios de comida pueden ser factores predictivos de éxito en los tratamientos dietéticos de la obesidad. Una causa posible de cronodisrupción es el fallo en los genes reloj, la presencia de ciertas variantes génicas en nuestro reloj circadiano se asocian con la obesidad o con la resistencia a la pérdida de peso.

De hecho los modelos genéticos en gemelas muestran que la salud del sistema circadiano presenta un componente genético relevante (40-70 %), aunque algunos parámetros están asociados con factores ambientales por lo que pueden ser modificados en la práctica clínica. Las nuevas ideas de nutrigenética muestran que aunque el código genético no es susceptible de ser modificado, el seguimiento de unas pautas dietéticas saludables puede conseguir que los efectos negativos de ciertas variantes génicas no afecten a nuestra salud. Más aún, las también nuevas ideas de epigenética muestran que podemos modificar la expresión de nuestros genes con la conducta. En definitiva, aunque ciertas personas pueden presentar una predisposición genética a la cronodisrupción y a la obesidad, es importante resaltar que estas personas no están predestinadas, que si conseguimos que realicen ciertos cambios en su conducta podrán cambiar su destino, lo que abre una nueva y esperanzadora vía en el tratamiento de la obesidad.

Referencias bibliográficas

- BANDIN, C.; MARTÍNEZ-NICOLÁS, A.; ORDOVÁS, J. M.; MADRID, J. A. y GARAULET, M. (2013a): «Circadian rhythmicity as a predictor of weight-loss effectiveness»; *Int. J. Obes. (Lond)*.
- BANDIN, C.; MARTÍNEZ-NICOLÁS, A.; ORDOVÁS, J. M.; ROS LUCAS, J. A.; CASTELL, P.; SILVENTE, T.; MADRID, J. A. y GARAULET, M. (2013b): «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)* 37(8); pp. 1044-50.

- BANDIN, C.; SCHEER, F. A.; LUQUE, A. J.; AVILA-GANDIA, V.; ZAMORA, S.; MADRID, J. A.; GÓMEZ-ABELLÁN, P. y GARAULET, M. (2014): «Meal timing affects glucose tolerance, substrate oxidation and circadian-related variables: A randomized, crossover trial»; *Int. J. Obes. (Lond)*.
- CORBALAN-TUTAU, D.; MADRID, J. A.; NICOLÁS, F. y GARAULET, M. (2014a): «Daily profile in two circadian markers 'melatonin and cortisol' and associations with metabolic syndrome components»; *Physiol. Behav.* 123; pp. 231-5.
- CORBALAN-TUTAU, M. D.; GÓMEZ-ABELLÁN, P.; MADRID, J. A.; CANTERAS, M.; ORDOVÁS, J. M. y Garaulet, M. (2014b): «Toward a chronobiological characterization of obesity and metabolic syndrome in clinical practice»; *Clin Nutr.*
- CROSIO, C.; CERMAKIAN, N.; ALLIS, C. D. y SASSONE-CORSI, P. (2000): «Light induces chromatin modification in cells of the mammalian circadian clock»; *Nat. Neurosci* 3(12); pp. 1241-7.
- DASHTI, H. S.; SMITH, C. E.; LEE, Y. C.; PARNELL, L. D.; LAI, C. Q.; ARNETT, D. K.; ORDOVÁS, J. M. y GARAULET, M. (2014): «CRY1 circadian gene variant interacts with carbohydrate intake for insulin resistance in two independent populations: Mediterranean and North American»; *Chronobiol Int.*
- DUNLAP, J. C. (1999): «Molecular bases for circadian clocks»; *Cell* 96(2); pp. 271-90.
- ERREN, T. C. y REITER, R. J. (2009): «Defining chronodisruption»; *J Pineal Res* 46(3); pp. 245-7.
- GARAULET, M.; CORBALAN-TUTAU, M. D.; MADRID, J. A.; BARAZA, J. C.; PARNELL, L. D.; LEE, Y. C. y ORDOVÁS, J. M. (2010a): «PERIOD2 variants are associated with abdominal obesity, psycho-behavioral factors, and attrition in the dietary treatment of obesity»; *J. Am Diet Assoc.* 110(6); pp. 917-21.
- GARAULET, M.; CORBALAN, M. D.; MADRID, J. A.; MORALES, E.; BARAZA, J. C.; LEE, Y. C. y ORDOVÁS, J. M. (2010b): «CLOCK gene is implicated in weight reduction in obese patients participating in a dietary programme based on the Mediterranean diet»; *Int. J. Obes. (Lond)* 34(3); pp. 516-23.
- GARAULET, M.; GÓMEZ-ABELLÁN, P.; ALBURQUERQUE-BEJAR, J. J.; LEE, Y. C.; ORDOVÁS, J. M. y SCHEER, F. A. (2013): «Timing of food intake predicts weight loss effectiveness»; *Int. J. Obes. (Lond)* 37(4); pp. 604-11.
- GARAULET, M.; LEE, Y. C.; SHEN, J.; PARNELL, L. D.; ARNETT, D. K.; TSAI, M. Y.; LAI, C. Q. y ORDOVÁS, J. M. (2009): «CLOCK genetic variation and metabolic syndrome risk: modulation by monounsaturated fatty acids»; *Am J. Clin. Nutr.* 90(6); pp. 1466-75.
- GARAULET, M.; LEE, Y. C.; SHEN, J.; PARNELL, L. D.; ARNETT, D. K.; TSAI, M. Y.; LAI, C. Q. y ORDOVÁS, J. M. (2010c): «Genetic variants in human CLOCK associate with total energy intake and cytokine sleep factors in overweight subjects (GOLDN population)»; *Eur. J. Hum. Genet.* 18(3); pp. 364-9.

- GARAULET, M.; ORDOVÁS, J. M.; GÓMEZ-ABELLÁN, P.; MARTÍNEZ, J. A. y MADRID, J. A. (2011a): «An approximation to the temporal order in endogenous circadian rhythms of genes implicated in human adipose tissue metabolism»; *J. Cell Physiol.* 226(8); pp. 2075-80.
- GARAULET, M.; ORDOVÁS, J. M. y MADRID, J. A. (2010d): «The chronobiology, etiology and pathophysiology of obesity»; *Int. J. Obes. (Lond)* 34(12); pp.1667-83.
- GARAULET, M.; SANCHEZ-MORENO, C.; SMITH, C. E.; LEE, Y. C.; NICOLÁS, F. y ORDOVÁS, J. M. (2011b): «Ghrelin, sleep reduction and evening preference: relationships to CLOCK 3111 T/C SNP and weight loss»; *PLoS One* 6(2); pp. e17435.
- GARAULET, M.; SMITH, C. E.; GÓMEZ-ABELLÁN, P.; ORDOVÁS-MONTANES, M.; LEE, Y. C.; PARNELL, L. D.; ARNETT, D. K. y ORDOVÁS, J. M. (2014): «REV-ERB-ALPHA circadian gene variant associates with obesity in two independent populations: Mediterranean and North American»; *Mol. Nutr. Food Res.* 58(4); pp.821-9.
- GARCÍA-PRIETO, M. D.; TEBAR, F. J.; NICOLÁS, F.; LARQUE, E.; ZAMORA, S. y GARAULET, M. (2007): «Cortisol secretary pattern and glucocorticoid feedback sensitivity in women from a Mediterranean area: relationship with anthropometric characteristics, dietary intake and plasma fatty acid profile»; *Clin Endocrinol. (Oxf)* 66(2); pp.185-91.
- GÓMEZ-ABELLÁN, P.; GÓMEZ-SANTOS, C.; MADRID, J. A.; MILAGRO, F. I.; CAMPION, J.; MARTÍNEZ, J. A.; ORDOVÁS, J. M. y GARAULET, M. (2010): «Circadian expression of adiponectin and its receptors in human adipose tissue»; *Endocrinology* 151(1); pp.115-22.
- GÓMEZ-ABELLÁN, P.; MADRID, J. A.; LUJÁN, J. A.; FRUTOS, M. D.; GONZÁLEZ, R.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; DE MEDINA, F. S.; ORDOVÁS, J. M. y GARAULET, M. (2012): «Sexual dimorphism in clock genes expression in human adipose tissue»; *Obes Surg.* 22(1); pp.105-12.
- GÓMEZ-SANTOS, C.; GÓMEZ-ABELLÁN, P.; MADRID, J. A.; HERNÁNDEZ-MORANTE, J. J.; LUJÁN, J. A.; ORDOVÁS, J. M. y GARAULET, M. (2009): «Circadian rhythm of clock genes in human adipose explants»; *Obesity (Silver Spring)* 17(8); pp.1481-5.
- GÓMEZ-SANTOS, C.; HERNÁNDEZ-MORANTE, J. J.; MARGARETO, J.; LARRARTE, E.; FORMIGUERA, X.; MARTÍNEZ, C. M. y GARAULET, M. (2011): «Profile of adipose tissue gene expression in premenopausal and postmenopausal women: site-specific differences»; *Menopause* 18(6); pp. 675-84.
- HAINES, P. S.; GUILKEY, D. K. y POPKIN, B. M. (1996): «Trends in breakfast consumption of US adults between 1965 and 1991»; *J. Am Diet Assoc.* 96(5); pp. 464-70.
- HERNÁNDEZ-MORANTE, J. J.; GÓMEZ-SANTOS, C.; MILAGRO, F.; CAMPION, J.; MARTÍNEZ, J. A.; ZAMORA, S. y GARAULET, M. (2009): «Expression of cortisol metabolism-related genes shows circadian rhythmic patterns in human adipose tissue»; *Int. J. Obes. (Lond)* 33(4); pp.473-80.

- JAKUBOWICZ, D.; BARNEA, M.; WAINSTEIN, J. y FROY, O. (2013): «High Caloric intake at breakfast vs. dinner differentially influences weight loss of overweight and obese women»; *Obesity (Silver Spring)*.
- JJ, D. O. D. (1972): «Observation botanique»; *Historire de L'Academie Royale des Sciences*; pp. 35-6.
- LÓPEZ-MÍNGUEZ, J.; ORDONANA, J. R.; SANCHEZ-ROMERA, J. F.; MADRID, J. A. y GARAULET, M. (2014): «Circadian system heritability as assessed by wrist temperature: A twin study»; *Chronobiol. Int.*; pp. 1-10.
- MILAGRO, F. I.; GÓMEZ-ABELLÁN, P.; CAMPION, J.; MARTÍNEZ, J. A.; ORDOVÁS, J. M. y GARAULET, M. (2012): «CLOCK, PER2 and BMAL1 DNA methylation: association with obesity and metabolic syndrome characteristics and monounsaturated fat intake»; *Chronobiol. Int.* 29(9); pp. 1180-94.
- PITTENDRIGH, C. S. (1967): «Circadian systems. I. The driving oscillation and its assay in *Drosophila pseudoobscura*»; *Proc. Natl. Acad. Sci U S A* 58(4); pp.1762-7.
- RUBIO-SASTRE, P., GÓMEZ-ABELLÁN, P., MARTÍNEZ-NICOLÁS, A., ORDOVÁS, J. M., MADRID, J. A. y GARAULET, M. (2014): «Evening physical activity alters wrist temperature circadian rhythmicity»; *Chronobiol. Int.* 31(2); pp. 276-82.
- SCOTT, E. M.; CARTER, A. M. y GRANT, P. J. (2008): «Association between polymorphisms in the Clock gene, obesity and the metabolic syndrome in man»; *Int. J. Obes. (Lond)* 32(4); pp. 658-62.
- SHEARMAN, L. P.; SRIRAM, S.; WEAVER, D. R.; MAYWOOD, E. S.; CHAVES, I.; ZHENG, B.; KUME, K.; LEE, C. C.; VAN DER HORST, G. T.; HASTINGS, M. H. *Et al.* (2000): «Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock»; *Science* 288(5468); pp. 1013-9.
- SOOKOIAN, S.; GEMMA, C., GIANOTTI, T. F.; BURGUENO, A.; CASTANO, G. y PIROLA, C. J. (2008): «Genetic variants of Clock transcription factor are associated with individual susceptibility to obesity»; *Am. J. Clin. Nutr.* 87(6); pp.1606-15.