

Métodos cronobiológicos en las encuestas alimentarias: criterios de aplicación e interpretación de resultados

Marta Garaulet, Purificación Gómez-Abellán, Juan Antonio Madrid

Departamento de Fisiología. Universidad de Murcia. IMIB. Murcia. España.

Resumen

En 1996, la Cumbre Mundial sobre la Alimentación reafirmó el derecho inalienable de los habitantes del mundo a tener acceso a una alimentación adecuada, inocua y nutritiva, y se planteó como meta disminuir a la mitad el número de personas subnutridas en el mundo para el año 2015, es decir, este año que iniciamos. Diversos países y organizaciones se plantean la necesidad de consensuar y desarrollar indicadores para la medición de la inseguridad alimentaria en los hogares. Disponer de un método de medición simple pero con base científica para identificar los grupos de población de mayor vulnerabilidad nutricional, se considera una herramienta básica para poder implementar estrategias que permitan afrontar el problema de un forma efectiva.

Palabras clave: Ritmos circadianos. Cronodisrupción. Hora de la comida. Análisis de cosinor. Temperatura corporal.

METHODS FOR MONITORING THE FUNCTIONAL STATUS OF THE CIRCADIAN SYSTEM IN DIETARY SURVEYS STUDIES: APPLICATION CRITERIA AND INTERPRETATION OF RESULTS

Abstract

To evaluate the circadian system status of the subject may be of special interest in nutrition. Particularly for those studies related to the assessment of diseases related to malnutrition, as it is the case of most of the degenerative diseases such as obesity, cancer, or cardiovascular diseases. For this purpose, one of the approaches consists to measure a) the external synchronizers of the internal clock, such as light intensity, and changes from fasting to eating and from resting to activity. Indeed, "chronodisruptors" have been defined as "exogenous and endogenous exposures or effectors which are chronobiologically active and can thus disrupt the timing and order.

Another approach to assess the circadian system health is to measure the b) outputs of the internal clock (circadian marker rhythms). Among such outputs, the rhythm of body temperature, motor activity, melatonin, cortisol and clock gene expression are the most commonly used. From the genetic perspective, we are now able to measure failures in the internal clock, in order to assess c) the genetics of the molecular clock. Indeed, new nutrigenetics techniques are giving us the opportunity to measure the association between different genetic variants of our clock genes and several illnesses such as obesity, cardiovascular diseases, diabetes or cancer. In addition to these techniques, self-reported questionnaires based in the morning-evening preferences have been developed as complementary procedures to assess human chronotypes.

Key words: Circadian rhythm. Circadian dysregulation. Meal timing. Cosinor analyses. Body temperature.

Introducción

Evaluar el estado del sistema circadiano de un sujeto puede ser de especial interés en la nutrición. En particular, en aquellos estudios relacionados con la evaluación de

enfermedades que implican malnutrición, como es el caso de la mayoría de las enfermedades degenerativas tales como la obesidad, cáncer, o enfermedades cardiovasculares. Recientes estudios epidemiológicos han demostrado que diversas situaciones en la vida como el trabajo por turnos, comer durante la noche, el "jet lag" y dormir poco, se asocian a una alteración de los ritmos circadianos individuales. La Cronodisrupción (CD) es una perturbación de la organización circadiana de nuestra fisiología, endocrinología, metabolismo y comportamiento, que une la luz y los ritmos biológicos al desarrollo de varias enfermedades.

Correspondencia: Marta Garaulet.
Departamento de Fisiología.
Universidad de Murcia.
Campus de Espinardo, s/n.
30100 Murcia. España.
E-mail: garaulet@um.es

La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) clasificó en 2007 al "trabajo por turnos" que conlleva la interrupción del sistema circadiano como posible factor cancerígeno para los seres humanos, siendo este el preludio de una amplia investigación experimental y epidemiológica que se realizó en años consecutivos¹. Por otra parte, en la revista "The Lancet Oncology" se puntualizó que entre los distintos patrones existentes del trabajo por turnos, aquellos que incluyen el trabajo nocturno fueron los más perjudiciales para el reloj circadiano. De hecho, en el mundo un 20% de las personas se dedica a algún trabajo en horas inusuales, incluyendo la noche. Por ello, es necesario en la ciencia actual el estudio de los vínculos biológicos que existen entre la interrupción circadiana y la aparición del cáncer.

El efecto de la CD en la salud humana es un tema emergente. Muchos estudios muestran el vínculo de CD no sólo con cáncer, sino también con el deterioro cognitivo cardiovascular y la obesidad, señales todas ellas de envejecimiento prematuro. Los mecanismos precisos que relacionan la obesidad con la CD no son muy conocidos. Se ha planteado la hipótesis de que los hábitos actuales, tales como el elevado consumo de "snacks", la reducción de la duración del sueño, la mayor exposición a la luz brillante durante la noche, junto con un horario "inadecuado" de comidas, inducen al cerebro a perder su capacidad de coordinar los ritmos internos y externos. La falta de contraste ambiental del día a la noche puede dar lugar a la CD y a la aparición de diversos trastornos metabólicos, incluyendo la obesidad. Por otro lado, los estudios realizados utilizando modelos experimentales han demostrado que el desarrollo de la obesidad y la diabetes en sí interrumpen el reloj molecular. Tanto, como causa o como consecuencia, la CD está estrechamente vinculada a la obesidad.

Métodos para monitorizar el estado funcional del sistema circadiano

El papel que ocupa el sistema circadiano en el mantenimiento de la salud pone de manifiesto la importancia de desarrollar técnicas para su evaluación objetiva, así como existen técnicas para evaluar otros sistemas fisiológicos más estudiados como son los sistemas respiratorio y cardiovascular. El principal reto es el ser capaces de medir un proceso que se desarrolla durante largos períodos de tiempo, que implica múltiples mediciones, y es necesario el uso de técnicas no invasivas que además no interfieran con la rutina diaria del sujeto².

Uno de los enfoques consiste en medir a) los sincronizadores externos del reloj interno, como la intensidad de la luz, y los cambios de ayuno/ingesta y de reposo/actividad. De hecho, los "cronodisruptores" se han definido como "efectores exógenos o endógenos que son cronobiológicamente activos y por lo tanto pueden interrumpir el horario y el orden, es decir, la organización temporal de las funciones fisiológicas y sus jerarquías"¹. En principio, lo que permite el establecimiento del orden en

la organización temporal en los organismos también debe ser capaz de interrumpir tal fin cuando están presentes o se aplica en exceso o déficit y, lo más importante, en horarios inusuales e inapropiados. En este sentido, además de la luz, otros cronodisruptores externos son los horarios inadecuados de comidas y de actividad física³.

Otro enfoque para evaluar la salud del sistema circadiano es medir b) las salidas del reloj interno (ritmos circadianos marcadores). Entre esas salidas, el ritmo de la temperatura corporal, la actividad motora, la melatonina, cortisol y la expresión de genes del reloj son los más comúnmente utilizados⁴. Desde la perspectiva genética, ahora somos capaces de medir c) los fallos en el reloj interno, es decir la genética del reloj molecular. De hecho, las nuevas técnicas en nutrigenética nos están dando la oportunidad de medir la asociación entre diferentes variantes de nuestros genes reloj y varias enfermedades como la obesidad, enfermedades cardiovasculares, la diabetes o el cáncer. Además de estas técnicas, los cuestionarios basados en estudiar las preferencias por la mañana o por la tarde (test de matutinidad-vespertinidad) se han desarrollado como procedimientos complementarios para evaluar los diferentes cronotipos humanos⁵⁻⁷.

Métodos para medir sincronizadores externos

Exposición a la luz

El sistema circadiano está regulado por señales externas, que son responsables del restablecimiento del reloj cada día. Teniendo en cuenta que el ciclo luz-oscuridad es el sincronizador más importante, es de gran interés poder cuantificar la exposición a la luz de los individuos. Una baja iluminación durante el día disminuye la temperatura central y el estado de alerta en comparación con lo observado en condiciones de alta iluminación (8). Sin embargo, durante la noche, se debe evitar la exposición a la luz, sobre todo a la luz azul, a fin de mantener la secreción de melatonina.

De hecho, uno cronodisruptor externo clave es la luz durante la noche. En condiciones naturales, los ritmos biológicos circadianos y estacionales están sincronizados las 24 horas del día y en este sentido, los ciclos de luz-oscuridad, el núcleo supraquiasmático y la melatonina tienen un papel fundamental en estos procesos. De hecho, la luz es un "Zeitgeber" clave que afecta a los ritmos de melatonina y a su vez, los ritmos circadianos de melatonina pueden proporcionar información al reloj (24 horas) y al calendario (estacional y anual) en muchas especies, incluidos los seres humanos¹.

El ciclo de luz-oscuridad a la que están expuestos los sujetos se puede cuantificar mediante pequeños registradores de datos que contienen una célula fotosensible, que registran periódicamente la intensidad de la luz recibida por el individuo. Recientemente, están disponibles los sensores que diferencian entre las longitudes de

onda de luz (azul, rojo y verde), lo que significa que la luz azul, que es la que tiene mayor capacidad para sincronizar el marcapasos circadiano, puede ser evaluada con precisión. La combinación de estos sensores con sensores de temperatura ambientales proporciona una información completa relativa a la calidad de los sincronizadores ambientales que actúan sobre el sistema circadiano⁸. También permiten identificar malos hábitos en la higiene del sueño; por ejemplo, dormir en condiciones ambientales de iluminación o en temperaturas demasiado altas.

Horarios de comida (cambios de ayuno e ingesta)

Los horarios de comida (y número de comidas) difieren de una cultura a otra y a lo largo del tiempo. De hecho, el momento de la ingesta de alimentos es un comportamiento modificable que puede influir en la regulación de energía y en consecuencia el riesgo de obesidad. Varios estudios realizados en animales de experimentación han demostrado que cuando los animales comen en un "horario erróneo" tienden a ser obesos, a pesar de que aparentemente comen y gastan la misma cantidad de energía³.

Nuestro grupo de investigación ha demostrado que el horario de la comida principal (almuerzo) en una población mediterránea de España, es predictivo de la pérdida de peso durante una intervención dietética de 20 semanas realizada en 420 personas obesas y con sobrepeso⁹. Otro resultado relevante de este estudio fue que la sensibilidad a la insulina fue menor en los "comedores tardíos" en comparación con los "comedores tempranos". Sin embargo, aún se desconoce la explicación fisiológica

de este descubrimiento. Para profundizar en estos resultados desarrollamos un protocolo cruzado aleatorio en el que se estudiaron las mismas mujeres (n = 32) en dos condiciones: una semana almorzaron a las 13:00 h y otra semana a las 16:30 h. Con este estudio demostramos que comer tarde se asocia con una disminución del gasto energético, una disminución de la oxidación de carbohidratos en ayunas, una disminución de la tolerancia a la glucosa, un perfil diario aplanado en las concentraciones de cortisol, propio de las situaciones de estrés y una disminución del efecto térmico de los alimentos sobre la temperatura periférica. Estos resultados parecen estar implicados en los efectos diferenciales de horario de las comidas sobre la salud metabólica (fig. 1).

Existen diferentes métodos para evaluar la ingesta habitual y los horarios de las comidas: Por ejemplo, para evaluar los hábitos alimentarios, suele usarse un registro dietético 7 días. Cada día los sujetos deben registrar todo lo que comen y también las horas en que comienzan o terminan cada comida. Además los pacientes también pueden registrar durante una semana, la hora del día en la que comienzan cada comida mediante un cuestionario desarrollado por Bertéus y cols.¹⁰ (fig. 2).

Otro cuestionario usado para evaluar los cambios circadianos sobre el hambre y el apetito es el desarrollado por Flint y cols., basado en unas escalas analógicas visuales (EAV) para la medición de las sensaciones del apetito. Estas escalas se utilizan para registrar aspectos como el hambre, la saciedad, el consumo de alimentos prospectivo, el deseo de comer alimentos grasos, salados, dulces, y la palatabilidad de los alimentos¹¹. Estos cuestionarios pueden ser completados antes y después de cada comida todos los días durante una semana.

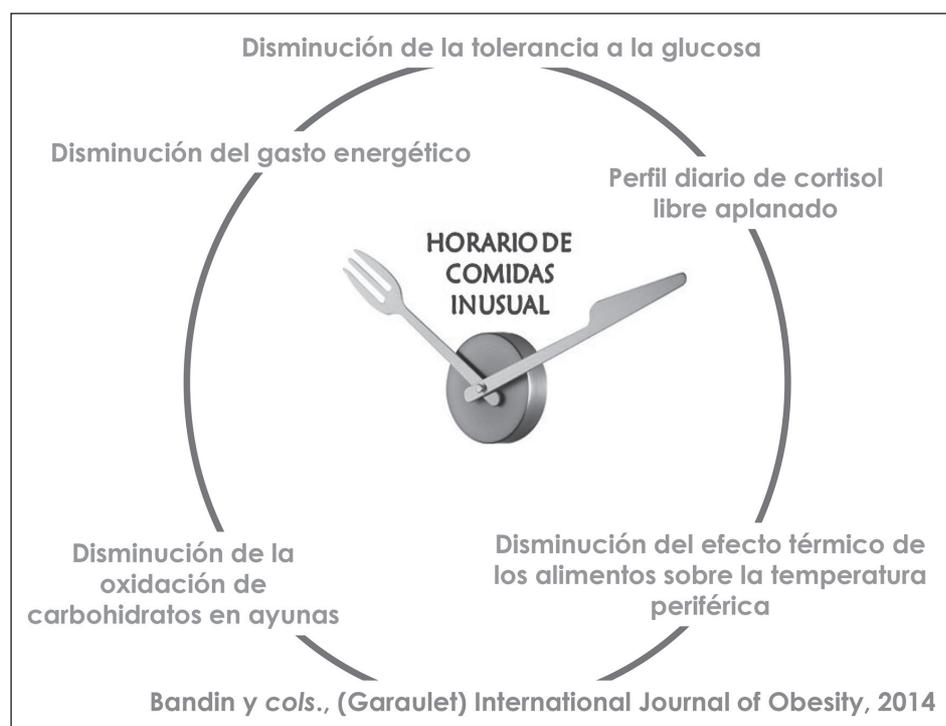


Fig. 1.—Efectos del horario de las comidas en la salud metabólica²⁴.

Describa cómo comió durante un periodo habitual de 24 horas. Indique la hora para cada episodio de consumo y marque con una cruz el tipo de ingesta que mejor se ajusta.

No olvide los aperitivos y otras “comidas ligeras” o tentempié y bebidas.

Nota, puede realizar varias comidas principales en un día.

Tipo de comida				
Hora	Comida principal: eg. plato cocinado. sopa con pan. ensalada con pan pizza	Comida ligera / Desayuno eg. Cereales desayuno, bocadillos, sopa, ensalada, tortilla	Aperitivo eg. bocadillo, galleta, bollo, pastel, fruta, dulces, helado (agua o bebida)	Sólo bebidas eg. Café, té, refresco, zumo, leche, cerveza, vino
Ejemplo: 23:00				X

Fig. 2.—Cuestionario de Bertéus y cols.¹⁰ en horario de las comidas.

Horarios de ejercicio (cambios de actividad y reposo)

La actigrafía es un método no invasivo útil para medir el ciclo de actividad-reposo en los seres humanos. Se basa en el principio de que durante los periodos en los que el individuo se despierta, el grado de actividad es elevado en comparación con aquellos en los que el individuo está dormido. Para su medición, se coloca un sensor de actividad (actímetro) en la muñeca de la mano no dominante durante unos 5 días, siendo éste el período mínimo para obtener datos fiables que reflejen las características del sujeto¹².

La actigrafía se ha utilizado para estudiar los patrones de sueño/vigilia durante más de 20 años. La ventaja de la actigrafía ante la polisomnografía tradicional (PSG) es que actigrafía puede registrar datos de forma continua durante las 24 horas del día, durante días, semanas o incluso más tiempo¹³. También se considera el método de elección para la evaluación y diagnóstico de los trastornos circadianos como la cronodisrupción producida en el trabajo a turnos, el síndrome de fase de sueño avanzada o retrasada, el síndrome de funcionamiento libre y ritmos circadianos irregulares¹⁴.

Sin embargo, como con cualquier otra medida, la actigrafía está sujeta a artefactos, por ejemplo, la dificultad para diferenciar entre el comienzo del descanso nocturno y el hecho de quitarse el sensor cuando tomamos una ducha justo antes de irse a la cama, los movimientos de la pareja en la cama o cuando dormimos en un coche o en tren, etc.¹⁵.

Otros métodos son los registros de actividad de 7 días, en los que el sujeto anota el horario, tipo e intensidad de actividad física diaria realizada durante una semana, incluyendo los días de semana y fines de semana.

Métodos para medir “las salidas del reloj”

Termometría central y periférica

Uno de los ritmos marcadores más comúnmente usado es el ritmo de la temperatura central, cuyo perfil se ha descrito desde hace años^{16,17} siendo sus valores más altos durante el día y los más bajos en la noche.

En los seres humanos, la temperatura central se mide generalmente por medio de sondas rectales usadas durante varios días, lo cual es obviamente incómodo. Recientemente el ritmo de la temperatura periférica de la piel se ha propuesto como un ritmo marcador y como alternativa a la medición de la temperatura central¹⁸⁻²¹. Este ritmo se produce por la alternancia entre la vasodilatación y vasoconstricción generada por el equilibrio parasimpático-simpático. El predominio de la actividad simpática durante el día se asocia con temperaturas más bajas, mientras que su inhibición y la activación simultánea del sistema parasimpático se asocian con una mayor temperatura. Por otra parte, el aumento de temperatura de la piel constituye una señal que favorece el comienzo del sueño nocturno a través de la estimulación de las áreas hipotálamicas²².

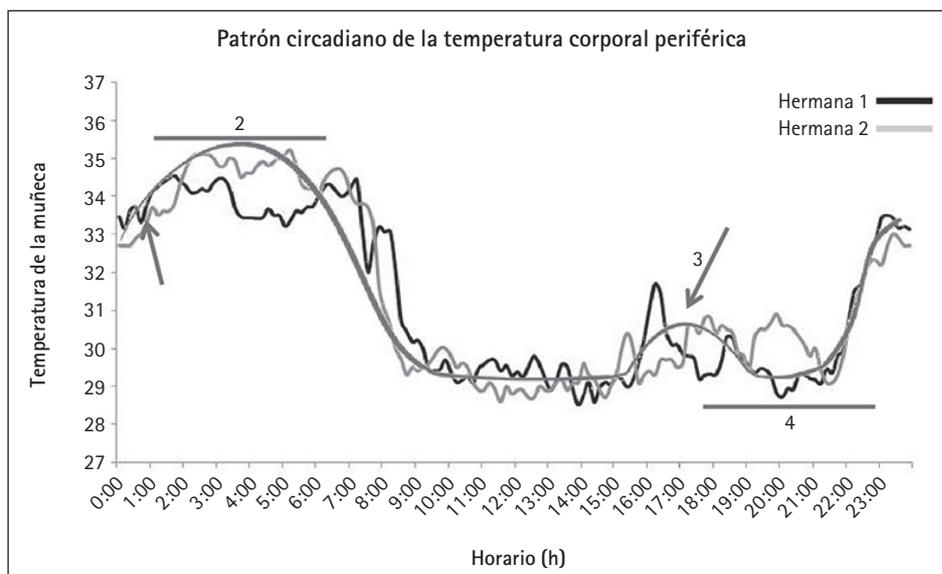


Fig. 3.—Onda de temperatura de la piel de la muñeca (WT) de 24 h de dos hermanas monocigóticas registrada de forma continua durante siete días⁵⁹. el ritmo de temperatura de la piel normal experimenta un fuerte aumento justo al inicio del sueño, mantiene niveles altos durante el sueño nocturno y muestra un segundo pico de la tarde.

El patrón circadiano de la temperatura periférica de la piel presenta algunas fases características (fig. 3)¹⁸. Aumenta antes de dormir y permanece elevado durante la noche. Al despertar, la temperatura desciende bruscamente y se mantiene baja durante el día. Es alrededor de las 20–21h, cuando la temperatura periférica alcanza su valor más bajo es lo que normalmente hace difícil el ir a dormir, fase conocida como zona del máximo despertar.

El procedimiento más utilizado para registrar la temperatura de la piel consiste en un pequeño sensor, colocado en la superficie interna de la muñeca de la mano no dominante mediante un brazalete o reloj. El sensor también puede colocarse en cualquier otra región periférica como el brazo, tobillo o un dedo^{18,19}. Esta medida permite obtener fácilmente los datos para caracterizar los biorritmos en una gran variedad de grupos de población incluyendo bebés²³ o jóvenes^{8,19}, así como para identificar la CD asociada a diferentes patologías como la hipertensión²⁴, síndrome metabólico y la obesidad^{20,21,25,26}. Por otra parte, se ha demostrado que el ritmo de temperatura de la piel de la muñeca (Wrist Temperature: WT) presenta un componente endógeno incluso en la presencia de diversas influencias externas. Por lo tanto, WT se ha propuesto como una técnica informativa y mínimamente invasiva para medir el ritmo circadiano en los sujetos en condiciones de vida habitual²⁷.

Melatonina

La melatonina es considerada la hormona de la noche, y se considera como el mejor "marcador de fase" del sistema circadiano. Sin embargo, su perfil de expresión está muy influenciado por exposición a la luz y, en menor medida, por la posición del cuerpo, la actividad física, el sueño, la cafeína y determinados medicamentos como los betabloqueantes^{28–31}. Los valores

plasmáticos de melatonina muestran un perfil circadiano, con valores bajos durante el día y altos durante la noche, alcanzando los valores más elevados alrededor de las 02:00–04:00 AM, lo que suele coincidir con el centro del sueño. En los seres humanos, la melatonina contribuye al ritmo de la temperatura corporal, ya que es responsable de la vasodilatación de la piel de las extremidades a través de la activación de las neuronas termosensibles presentes en las zonas del cerebro implicadas en la regulación del sueño. El horario de secreción de la melatonina está estrechamente relacionado con la propensión a dormir y coincide con una caída en la temperatura corporal central, con el grado de excitación y con el rendimiento (32). De hecho, desde 1992 sabemos que los ritmos circadianos de melatonina y la temperatura corporal se acoplan a la inversa.

Las propiedades hipotérmicas de la melatonina son las responsables de la generación de al menos un 40% de la amplitud del ritmo circadiano de la temperatura corporal. La manipulación de melatonina podría ser clínicamente útil para volver a sincronizar el ritmo de la temperatura corporal en condiciones de desincronización.

Los valores de melatonina pueden medirse de forma fiable en el plasma, saliva y orina (en este último caso como su metabolito, 6-sulfatoximelatonin). El mejor horario para medir la melatonina como marcador del ritmo circadiano coincide con su rápido aumento al anochecer. Sus valores se alteran por la exposición a la luz de una intensidad y espectro determinado, en general se acepta que las muestras de melatonina se tomen durante un período de oscuridad bajo una luz tenue (< 50 lux), protocolo conocido como DLMO (Dim Light Melatonin Onset)³³. Para iniciar el muestreo es suficiente hacerlo de 2 a 3 horas antes de la hora normal de acostarse del sujeto (alrededor de 19:30–22:00h), suponiendo que el individuo no muestra alteraciones de fase.

Cortisol

El cortisol es un corticosteroide que muestra un perfil circadiano robusto caracterizado por un pico máximo al despertar, cuyos valores van disminuyendo a lo largo del día y alcanzando su valor más bajo aproximadamente 2 horas después de irnos a dormir. La importancia fisiológica de este aumento consiste en la preparación del cuerpo para afrontar el día en cuanto al aumento de la presión arterial, las concentraciones plasmáticas de glucosa, el gasto cardiaco, etc. Debido a su robustez, este ritmo también se considera un buen marcador del sistema circadiano.

Al igual que otras variables mencionadas anteriormente, los valores de cortisol pueden verse afectados por factores externos, como la sincronización de los alimentos³⁴, situaciones de estrés, exposición a la luz en momentos determinados del día³⁵, comidas hiperproteicas o la obesidad³⁶. Otras situaciones no patológicas tales como el envejecimiento también afectan a los valores de cortisol. El perfil de sueño-vigilia puede también modificar el ritmo de cortisol. La privación del sueño, el predominio de un sueño ligero, y un cierto número de despertares nocturnos aumentará los niveles de cortisol³⁷.

El cortisol puede medirse en suero o saliva, siendo los momentos más idóneos para la medición de su perfil circadiano aquellos que se encuentran justo antes del despertar, coincidiendo con sus valores máximos, y al final de la día/comienzo de la noche, cuando su alcanza su mínimo en sangre.

Patrones de sueño y vigilia (variables integradas)

El sueño no está claramente definido como una "salida" de nuestro reloj interno. Sin embargo, es modificable por el sujeto, y también puede cambiar la exposición a determinados sincronizadores externos como la luz, siendo capaz de influir en la función del reloj interno. Por otra parte, es evidente que la sincronización del ciclo sueño/vigilia y el reloj interno es esencial para que un individuo sea capaz de mantener su sueño/vigilia cuando desee. Por ejemplo, viajar a través de zonas horarias o trabajar por turnos durante la noche, desincroniza los patrones de sueño/vigilia y la reactivación de los ritmos circadianos del reloj interno dando lugar a una señal de alerta muy baja cuando un individuo desea estar despierto y demasiado alta para permitir un sueño consolidado.

Por todo esto, puede ser relevante en los estudios cronobiológicos y nutricionales medir el patrón circadiano de sueño/vigilia. Para conseguir este objetivo se utiliza la polisomnografía (PSG). Consiste en la grabación completa de los cambios biofisiológicos que se producen durante el sueño. La PSG mide muchas funciones del cuerpo incluyendo el cerebro (EEG), los movimientos oculares (EOG), la actividad muscular o la activación del músculo esquelético (EMG) y el ritmo del corazón (ECG) durante el sueño.

A pesar de que la PSG es la medida más idónea para medir objetivamente el sueño, no es práctica a largo plazo y su realización en el hogar es muy complicada. Por ello, se han desarrollado técnicas alternativas. La actigrafía es hoy en día una excelente herramienta para la recopilación de datos referentes a la actividad del ciclo sueño/vigilia en los individuos normales. Sin embargo, existen una serie de cuestiones metodológicas que aún no se han resuelto para justificar su uso en la investigación clínica.

Con el fin de aumentar la fiabilidad de la monitorización de los ritmos circadianos, se han propuesto recientemente variables integradas procedentes de la transformación de variables individuales. Por ejemplo, el algoritmo de TAP (Temperatura-Actividad-Posición), propuesto por Ortiz-Tudela y cols.¹⁹, basado en la integración, después de la normalización de las siguientes variables: temperatura de la piel, la actividad motora y la posición del cuerpo (fig. 4). La primera de estas variables, temperatura de la piel, es de origen endógeno, mientras que la actividad motora se modifica voluntariamente pero también está bajo control endógeno. Por último, de las tres variables usadas en la integración, la posición del cuerpo es la variable que más estrechamente depende del control voluntario. TAP se puede modular y puede amplificarse mediante la incorporación de nuevas variables que complementan aún más la información. TAP nos permite no sólo determinar cómo funciona el sistema circadiano del individuo, sino también deducir el ritmo de sueño-vigilia con una precisión superior al 90% de acuerdo con registro el polisomnográfico. Esta técnica constituye la base del procedimiento del control circadiano ambulatorio (CCA), recientemente aplicado en la evaluación de la madurez circadiana en recién nacidos²³, y en patologías como el síndrome metabólico²¹.

Métodos para medir "fallos en el reloj interno"

Genética del reloj molecular

La capacidad de experimentar oscilaciones rítmicas es una característica intrínseca de la materia viva. Una declaración fundamental de la cronobiología es "muchos ritmos persisten incluso en completo aislamiento de los principales ciclos ambientales conocidos". Según este concepto pueden existir ritmos naturales independientes de los períodos definidos por ciclos geofísicos; esto significa que la materia viva tiene su propio tiempo, es decir, el "tiempo biológico". En este sentido, se ha planteado la hipótesis de la existencia de un *Cronoma* dentro del Genoma.

En las últimas dos décadas, los estudios bioquímicos, genéticos y moleculares han experimentado avances importantes hacia la elucidación de las bases moleculares de la ritmicidad en los seres vivos. A través de estudios realizados en la década de 1970 centrados en la variabilidad circadiana de hormonas como el cortisol, la melatonina o la hormona del crecimiento (GH), o los

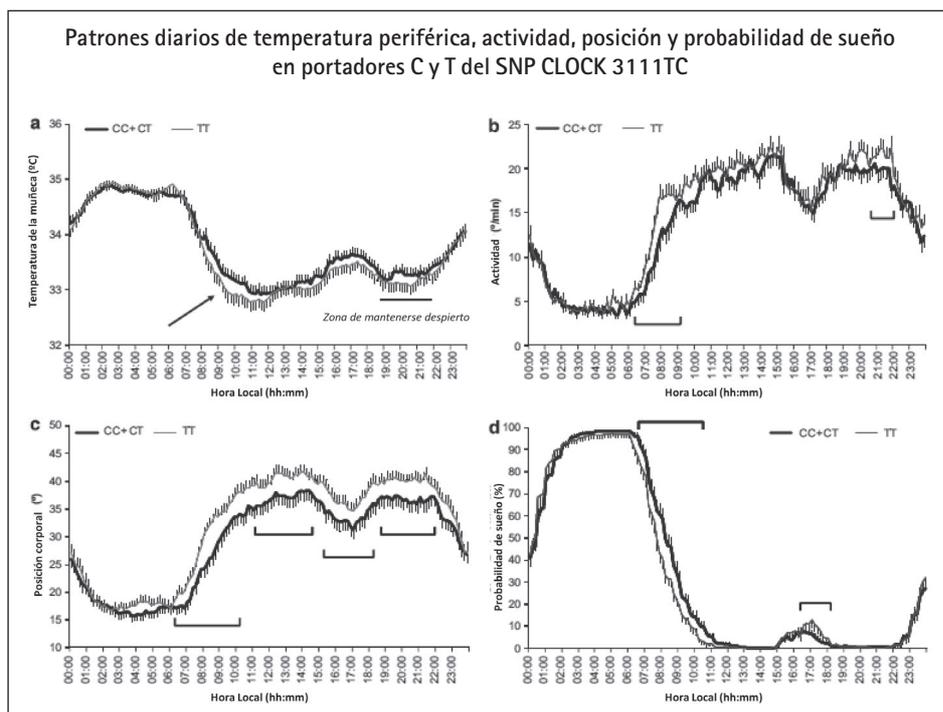


Fig. 4.—Temperatura de la piel, actividad motora y posición del cuerpo en CLOCK 3111TC⁶⁰.

relacionados con el descubrimiento y descripción de las bases fisiológicas del núcleo supraquiasmático (NSQ), la cronobiología actual ha evolucionado de forma espectacular gracias a las nuevas técnicas de biología genética y molecular.

Un gran avance en la comprensión de la base molecular de los ritmos circadianos fue la identificación por Konopa y Benzer en 1971³⁸ de una región cromosómica encargada de controlar el momento del período de eclosión en *Drosophila*, seguido por la clonación de los primeros genes reloj en *Drosophila melanogaster* en 1984³⁹. Hoy, gracias a estas técnicas moleculares, somos capaces de estudiar la expresión de los conocidos genes reloj implicados en la maquinaria circadiana. Además sabemos que, en los mamíferos, los componentes básicos de la maquinaria molecular del reloj operan en casi todas las células del cuerpo a través de una compleja red de ciclos de transcripción-traducción y modulan la expresión de genes específicos y sus productos metabólicos para que oscilen en un ritmo de 24 horas.

Hoy en día, los modelos experimentales nos permiten evaluar la expresión de los genes reloj no sólo en el animal vivo, sino también fuera del cuerpo (técnicas *in vitro*), siendo además capaces de analizar las fluctuaciones de 24h en la expresión génica y evaluar la presencia o ausencia de relojes periféricos en los diferentes órganos y tejidos. Por otra parte, podemos utilizar modelos experimentales para encender y apagar los componentes específicos de la maquinaria del reloj, para identificar sus efectos sobre fenotipos metabólicos y enfermedades. Desde el punto de vista de la epidemiología genética, el estudio de polimorfismos de nucleótido simple (SNP), está contribuyendo a la identificación de los anteceden-

tes genéticos de cronotipos (matutinidad o vespertinidad), alteraciones del sueño o trastornos del estado de ánimo estacionales.

Más recientemente, los enfoques epigenéticos y nutrigenéticos también nos permiten estudiar nuevas interacciones y capas de complejidad que pueden tener un impacto significativo en la cronobiología, así como la fisiopatología. La epigenética es el estudio de los cambios heredables en la expresión génica o en el fenotipo celular causado por mecanismos distintos de los cambios en la secuencia de ADN subyacente. Es por tanto la regulación heredable de la expresión génica sin cambio en la secuencia de nucleótidos. Se ha observado que tanto *CLOCK* como *SIRT* tienen efectos epigenéticos en la acetilación y desacetilación de las histonas, respectivamente. Los microARNs pueden convertirse en nuevas dianas terapéuticas para los desórdenes en el reloj circadiano. El conocimiento del epigenoma circadiano podría darnos nuevas respuestas a las conexiones entre la genética, la ritmicidad circadiana y la obesidad.

Por otra parte, el poder tecnológico de otras "ómicas" (por ejemplo, la metabolómica, proteómica) se está convirtiendo en esencial para desarrollar nuestra capacidad de "ponerlo-todo-junto" y además estamos aprendiendo muy rápido sobre el horario de diferentes metabolitos como los aminoácidos, lípidos, xenobióticos, etc. en el hígado en ratones, y en el plasma y saliva de los seres humanos, lo que nos permite alcanzar un conocimiento más completo y refinado del ritmo circadiano y sus efectos fisiológicos. Estos avances han dado a la ciencia de la cronobiología un estímulo renovado que hace que esta ciencia sea cada vez más firme y atractiva.

Variantes génicas asociadas a la cronodisrupción

Algunos ejemplos de los SNPs en cronobiología son *CLOCK* 3111TC que se ha asociado con la vespertinidad y diferentes rasgos de la personalidad; el polimorfismo *PERIOD2* (*PER2 rs2304672*) que modera el circuito circadiano; *CRY1* (*rs8192440*) relacionado con la efectividad del tratamiento psicológico; *CRY2* asociado con la depresión del invierno y *SIRT1 rs10997875*, gen candidato para la fisiopatología de los trastornos del estado de ánimo.

Otros SNPs relacionados con la obesidad podrían ser los asociados a los trastornos del sueño. Algunos ejemplos son los receptores de serotonina, prepro-orexina o determinados SNPs de IL-6 que se asocian con el síndrome de apnea obstructiva del sueño. Otros SNPs son los que residen en *ROR1* y *PLCB1* los cuales se asocian con el insomnio.

Los trastornos del sueño o una duración del sueño corta, se asocian a varios polimorfismos relacionados con la obesidad. En este sentido, uno de los SNPs más estudiados es el del gen *CLOCK* (3111TC) el cual se asocia significativamente con una corta duración del sueño, con la vespertinidad, con varios rasgos psicológicos, con la pérdida de peso⁴⁰ y la obesidad^{41,42}.

Expresión de genes reloj en leucocitos y mucosa oral

Las neuronas que constituyen el núcleo supraquiasmático (NSQ) y las células de los osciladores periféricos muestran una ritmicidad autónoma que está controlada por la expresión cíclica de los genes reloj (*CLOCK*, *BMAL1*, *PER 1*, *PER 2*, *PER 3*, *CRY1* y *CRY 2*). La implicación de estos genes en numerosos procesos fisiológicos (regulación del ciclo celular, adipogénesis, síntesis de glucocorticoides, la maduración de células B, etc.) y su probable desajuste en ciertas patologías aumentar el interés por cuantificar su expresión. Para ello, generalmente se utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)⁴³. La más sencilla es la PCR en tiempo real (RT-PCR), que nos permite evaluar cualitativamente qué genes se están expresando en el momento del muestreo. Para saber qué genes se expresan y su cuantificación, normalmente se usa una PCR cuantitativa (PCR-Q) o una RT-PCR.

Debido a que no es posible evaluar la expresión de genes reloj en el NSQ *in vivo*, normalmente se usan muestras obtenidas de tejidos periféricos. En este caso, hay dos opciones primordiales: evaluar la expresión génica en los leucocitos o en la mucosa oral. En el primer caso, se toman periódicamente muestras de sangre, los leucocitos se aíslan del resto de las células de la sangre y entonces se aplica una de las técnicas anteriormente mencionadas. En el caso de la mucosa oral, lo más común es tomar pequeñas biopsias usando anestesia local⁴⁴, aunque, actualmente, se usan puntas de pipeta para raspar una pequeña cantidad de la mucosa, que proporciona suficiente tejido para analizar la expresión génica⁴⁵.

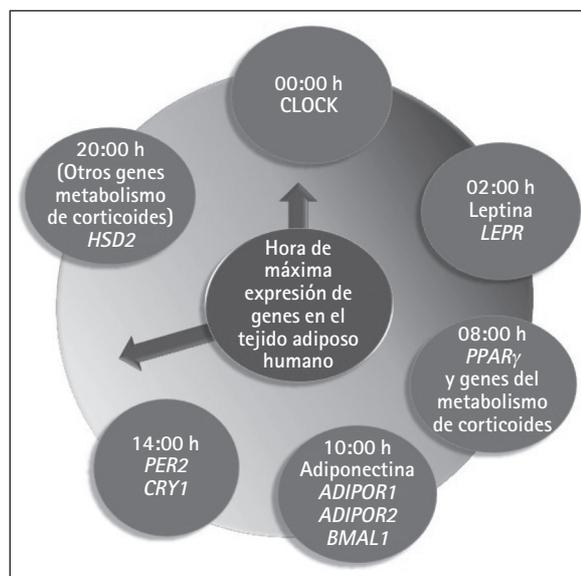


Fig. 5.—Presencia de un reloj circadiano activo en el tejido adiposo⁴⁷.

Expresión de genes reloj en el tejido adiposo (reloj periférico)

En los últimos años, uno de los descubrimientos más influyentes y relevantes para esta área de investigación es la presencia de un reloj circadiano activo en el tejido adiposo (fig. 5). En este sentido, nuestro grupo de investigación ha demostrado recientemente que el reloj circadiano puede oscilar con precisión y de forma independiente del NSQ en explantes de tejido adiposo (TA)⁴⁶. Por otra parte, hemos proporcionado una visión global del orden temporal interno de los ritmos circadianos del TA de humanos incluidos genes implicados en los procesos tanto metabólicos como energéticos⁴⁷. Por ello, la existencia de un orden temporal específico en los patrones diarios de estos genes parece ser crucial para el tejido adiposo para acumular o movilizar la grasa en el momento adecuado, un fenómeno conocido como compartimentación temporal.

Protocolos para medir los ritmos circadianos

Para evaluar el sistema circadiano, se usan técnicas que eliminen o reduzcan al mínimo la influencia de factores externos (denominados factores de enmascaramiento). Por esta razón, las mediciones se hacen normalmente en los sujetos en condiciones de rutina constante, por ejemplo, en la cama, sin dormir, bajo una constante luz tenue y los alimentos se ingieren en intervalos regulares en 24 horas⁴⁸. Esta situación de rutina constante por lo general se mantiene durante 24, 36 o 48 horas, aunque esto, en sí mismo, puede introducir sus propios factores de enmascaramiento. Uno de esos factores es que el sujeto debe estar sin dormir y luchar para no dormirse. Para evitar esto, se han introducido en los protocolos múltiples siestas. Se trata de un protocolo de

rutina constante con múltiples siestas regulares durante un periodo de 24 horas o más.

En un intento de diferenciar los ciclos ambientales y ritmos endógenos, se han desarrollado protocolos alternativos (conocidos como desincronización forzada) en los que el sujeto vive 28 horas (o, menos frecuentemente, 20 horas) al día^{48,49}. Realizando estos protocolos, se han observado episodios de sueño en todas las fases de los periodos endógenos. De esta manera se pueden distinguir muy bien los componentes circadianos (propios del reloj interno) de los derivados del efecto del sueño.

Análisis del ritmo circadiano

El análisis de los datos rítmicos requiere una metodología propia y diferente de las técnicas estadísticas y matemáticas convencionales. Para este propósito se utilizan dos procedimientos básicamente, uno basado en el ajuste a funciones sinusoidales (el método cosinor) y la otra basada en un análisis no paramétrico.

El análisis Cosinor es un procedimiento matemático basado en el ajuste de mínimos cuadrados de una función coseno a los datos originales. A partir del ajuste cosinor se definen tres parámetros principales: mesor, amplitud y acrofase⁵⁰. El mesor es el valor medio del ritmo ajustado a la función sinusoidal. La amplitud es la diferencia entre el mesor y el máximo o el valor mínimo de la función cosenoidal. La acrofase es la localización temporal del valor máximo de la función. Teniendo en cuenta que el ritmo reposo-actividad del ser humano tiene una distribución asimétrica en las 24 horas (alrededor de 8 h reposo vs. 16 h actividad) y una forma que se parece más a una onda cuadrada que un cosinusoide puro, el método cosinor sólo proporciona una descripción aproximada y general del ritmo de reposo-actividad. Sin embargo, es un método relativamente sencillo que proporciona una gran cantidad de información cuantitativa.

Para facilitar una estimación más precisa de los parámetros rítmicos de las funciones fisiológicas que no muestran una forma de onda simétrica, cada vez se utilizan más los procedimientos no paramétricos. Aunque estos procedimientos se desarrollaron inicialmente para datos de actimetría⁵¹, también son útiles para analizar otras variables biológicas. Los parámetros más frecuentes son la estabilidad interdiaria (ES), la variabilidad intradiaria (VI), las 5 horas consecutivas de menor actividad (L5), las 10 horas consecutivas de mayor actividad (M10), el inicio y punto medio de L5 y M10, la amplitud (AMP) y la amplitud relativa (AR). ES cuantifica la regularidad del ritmo, es decir, el grado de semejanza entre los patrones rítmicos en días individuales. Su rango comprende valores de 0 a 1, siendo alrededor de 0,6 el valor típico para los adultos sanos. VI determina la fragmentación del ritmo. Comprende valores de 0 a 2, y los valores típicos en sujetos sanos están por debajo de 1. L5 es el valor mínimo de actividad de una onda media durante 5

horas consecutivas dentro de un día completo de 24 h. M10 es el valor máximo de actividad durante 10 horas consecutivas dentro del ciclo de 24 h. El punto medio de L5 y M10 proporciona información fiable sobre la fase del ritmo, similar a la proporcionada por la acrofase y el nadir del método cosinor. AMP es la diferencia entre M10 y L5, mientras que RA se calcula dividiendo AMP por la suma de L5 y M10. Sus valores oscilan entre 0-1, y los valores más altos indican mayor amplitud del ritmo.

Scores y biomarcadores de cronodisrupción

Dada la importancia de un ritmo circadiano normal en el mantenimiento de peso corporal, podría ser de gran utilidad en la práctica clínica definir un biomarcador de la desregulación circadiana. Este biomarcador también podría utilizarse como herramienta para el seguimiento de los efectos producidos al realizar cambios en el estilo de vida con el fin de reducir el riesgo de la obesidad⁵². Con este propósito y para detectar el mejor biomarcador para evaluar la CD en la obesidad, nuestro grupo de investigación probó en una población femenina varios biomarcadores del sistema circadiano utilizados previamente en diferentes tipos de población. En este sentido, utilizamos técnicas fácilmente medibles y no invasivas, tales como (a) registro de sueño, para estudiar el ciclo sueño/vigilia, los cuales son una herramienta adecuada para evaluar la calidad y duración del sueño⁵³; (b) un registro de alimentos, herramienta idónea para analizar el horario y la duración de la ingesta de alimentos⁵⁴; (c) el cuestionario Horne-Ostberg, recomendado para definir la matutinidad-vespertinidad del sujeto^{55,56}; (d) el análisis de la melatonina y cortisol salivar, definidos como buenos marcadores para evaluar la CD⁵⁷; y finalmente (e) la medición de la ritmicidad de la temperatura de la piel, particularmente la temperatura de la muñeca (WT)²⁴.

Nuestros resultados muestran que de los diferentes biomarcadores estudiados, la medición de la ritmicidad de la temperatura de la piel, dos preguntas del registro del sueño (horarios de inicio y fin del sueño), junto con la determinación del cortisol salivar de la mañana podría ser suficiente para caracterizar la cronobiología de la obesidad.

Después de incluir los diversos factores estudiados en un análisis factorial fuimos capaces de definir un Score o Puntuación de Cronodisrupción (CD). Los resultados obtenidos mostraron que los pacientes podían dividirse en dos poblaciones. De hecho, el punto de corte para dividir la población fue el valor de 40,3 puntos. Una puntuación más alta de este valor o punto de corte indicó mayor riesgo de CD. El análisis de correlación mostró que los pacientes con mayores puntuaciones CD tuvieron mayor riesgo de obesidad y síndrome metabólico. De hecho, el porcentaje de grasa corporal, los valores de glucosa en plasma y la presión arterial se correlacionaron positivamente con la puntuación final. Respecto a los triglicéridos, el colesterol total y el LDL colesterol se correlacionaron con las puntuaciones más altas, mien-

tras que el HDL colesterol se correlacionó con las puntuaciones más bajas.

Cuestionarios de matutinidad-vespertinidad

El cuestionario de matutinidad-vespertinidad (MEQ) es un cuestionario de autoevaluación desarrollado por Horne y Östberg en 1976⁵⁸. Su objetivo principal es medir si el estado de alerta máximo de una persona es en la mañana, por la tarde o en medio de ambos. El estudio original mostró que el momento en que se da el máximo estado de alerta se correlaciona con momento de mayor pico de temperatura central corporal; los sujetos de tipo matutinos tienen un pico de temperatura anterior que los de tipo vespertino, mientras que los sujetos de tipo intermedio tienen los picos de temperatura entre los dos grupos. El MEQ se usa ampliamente en muchas áreas de la investigación psicológica y médica.

Más recientemente, se han desarrollado también nuevos cuestionarios. Es el caso del Cuestionario de Cronotipo de Munich (MCTQ)⁷. Éste incluye preguntas sobre la jornada de trabajo y horarios de sueño, detalles del trabajo y estilo de vida, etc. que proporcionan datos para ayudar a la comprensión de cómo los relojes biológicos funcionan en la vida social. El MCTQ categoriza cada participante en siete cronotipos, y utiliza datos referentes a la fase de sueño de los participantes y la falta de sueño de los mismos para estudiar qué cronotipo tiene cada participante.

References

1. Erren TC, Reiter RJ. Defining chronodisruption. *Journal of Pineal Research* 2009; 46:245-247
2. Touitou Y, Haus E. Aging of the human endocrine and neuroendocrine time structure. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1994; 719: 378-97.
3. Garaulet M, Gomez-Abellan P. Timing of food intake and obesity: A novel association. *Physiology & behavior* 2014.
4. Hofstra WA, de Weerd AW. How to assess circadian rhythm in humans: a review of literature. *Epilepsy & behavior: E&B* 2008; 13: 438-444.
5. Horne JA, Ostberg O. A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. *International Journal of Chronobiology* 1976; 4: 97-110.
6. Smith CS, Reilly C, Midkiff K. Evaluation of three circadian rhythm questionnaires with suggestions for an improved measure of morningness. *The Journal of Applied Psychology* 1989; 74: 728-38.
7. Roenneberg T, Wirz-Justice A, Merrow M. Life between clocks: daily temporal patterns of human chronotypes. *J Biol Rhythms* 2003; 18: 80-90.
8. Martinez-Nicolas A, Ortiz-Tudela E, Madrid JA, Rol MA. Crosstalk between environmental light and internal time in humans. *Chronobiology International* 2011; 28: 617-29.
9. 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: 604-11.
10. Berteus Forslund H, Lindroos AK, Sjostrom L, Lissner L. Meal patterns and obesity in Swedish women—a simple instrument describing usual meal types, frequency and temporal distribution. *European Journal of Clinical Nutrition* 2002; 56: 740-7.
11. Flint A, Raben A, Blundell JE, Astrup A. Reproducibility, power and validity of visual analogue scales in assessment of appetite sensa-

tions in single test meal studies. *International journal of obesity and related metabolic disorders. Journal of the International Association for the Study of Obesity* 2000; 24: 38-48.

12. Acebo C, Sadeh A, Seifer R, Tzischinsky O, Wolfson AR, Hafer A, Carskadon MA. Estimating sleep patterns with activity monitoring in children and adolescents: how many nights are necessary for reliable measures? *Sleep* 1999; 22: 95-103.
13. Ancoli-Israel S, Cole R, Alessi C, Chambers M, Moorcroft W, Pollak CP. The role of actigraphy in the study of sleep and circadian rhythms. *Sleep* 2003; 26: 342-92.
14. Morgenthaler TI, Lee-Chiong T, Alessi C, Friedman L, Aurora RN, Boehlecke B, Brown T, Chesson AL, Jr., Kapur V, Maganti R, Owens J, Pancer J, Swick TJ, Zak R. Practice parameters for the clinical evaluation and treatment of circadian rhythm sleep disorders. An American Academy of Sleep Medicine report. *Sleep* 2007; 30: 1445-59.
15. Sadeh A, Acebo C. The role of actigraphy in sleep medicine. *Sleep Medicine Reviews* 2002; 6: 113-24.
16. Krauchi K. How is the circadian rhythm of core body temperature regulated? Clinical autonomic research. *Official Journal of the Clinical Autonomic Research Society* 2002; 12: 147-9.
17. Waterhouse J, Drust B, Weinert D, Edwards B, Gregson W, Atkinson G, Kao S, Aizawa S, Reilly T. The circadian rhythm of core temperature: origin and some implications for exercise performance. *Chronobiology International* 2005; 22: 207-25.
18. 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: 570-80.
19. 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: e1000996.
20. Corbalan-Tutau MD, Madrid JA, Ordovas JM, Smith CE, Nicolas F, Garaulet M. Differences in daily rhythms of wrist temperature between obese and normal-weight women: associations with metabolic syndrome features. *Chronobiology International* 2011; 28: 425-33.
21. 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.
22. Raymann RJ, Swaab DF, Van Someren EJ. Skin deep: enhanced sleep depth by cutaneous temperature manipulation. *Brain. A Journal of Neurology* 2008; 131: 500-13.
23. Zornoza-Moreno M, Fuentes-Hernandez S, Sanchez-Solis M, Rol MA, Larque E, Madrid JA. Assessment of circadian rhythms of both skin temperature and motor activity in infants during the first 6 months of life. *Chronobiology International* 2011; 28: 330-7.
24. Blazquez A, Martinez-Nicolas A, Salazar FJ, Rol MA, Madrid JA. Wrist skin temperature, motor activity, and body position as determinants of the circadian pattern of blood pressure. *Chronobiology International* 2012; 29: 747-56.
25. Bandin C, Martinez-Nicolas A, Ordovas JM, Madrid JA, Garaulet M. Circadian rhythmicity as a predictor of weight-loss effectiveness. *Int J Obes (Lond)* 2013.
26. Corbalán-Tutau MD G-AP, Madrid JA, Canteras M, Ordovás JM and Garaulet M. Toward a chronobiological characterization of obesity and metabolic syndrome in clinical practice. *Clinical Nutrition* In Press.
27. Martinez-Nicolas A, Ortiz-Tudela E, Rol MA, Madrid JA. Uncovering different masking factors on wrist skin temperature rhythm in free-living subjects. *PLoS One* 2013; 8: e61142.
28. Monteleone P, Maj M, Fusco M, Orazzo C, Kemali D. Physical exercise at night blunts the nocturnal increase of plasma melatonin levels in healthy humans. *Life Sciences* 1990; 47: 1989-95.
29. Shilo L, Sabbah H, Hadari R, Kovatz S, Weinberg U, Dolev S, Dagan Y, Shenkman L. The effects of coffee consumption on sleep and melatonin secretion. *Sleep Medicine* 2002; 3: 271-3.
30. Zeitzer JM, Duffy JF, Lockley SW, Dijk DJ, Czeisler CA. Plasma melatonin rhythms in young and older humans during sleep, sleep deprivation, and wake. *Sleep* 2007; 30: 1437-43.
31. Cardinali DP, Pevet P. Basic aspects of melatonin action. *Sleep Medicine Reviews* 1998; 2: 175-90.

32. Dijk DJ, Cajochen C. Melatonin and the circadian regulation of sleep initiation, consolidation, structure, and the sleep EEG. *J Biol Rhythms* 1997; 12: 627-35.
33. Van Someren EJ, Nagtegaal E. Improving melatonin circadian phase estimates. *Sleep Medicine* 2007; 8: 590-601.
34. Bandin C, Scheer FA, Luque AJ, Avila-Gandia V, Zamora S, Madrid JA, Gomez-Abellan P, Garaulet M. Meal timing affects glucose tolerance, substrate oxidation and circadian-related variables: A randomized, crossover trial. *Int J Obes (Lond)* 2014.
35. Scheer FA, Buijs RM. Light affects morning salivary cortisol in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999; 84: 3395-8.
36. Garcia-Prieto MD, Tebar FJ, Nicolas F, Larque E, Zamora S, Garaulet M. Cortisol secretory pattern and glucocorticoid feedback sensitivity in women from a Mediterranean area: relationship with anthropometric characteristics, dietary intake and plasma fatty acid profile. *Clinical Endocrinology* 2007; 66: 185-91.
37. Caufriez A, Moreno-Reyes R, Leproult R, Vertongen F, Van Cauter E, Copinschi G. Immediate effects of an 8-h advance shift of the rest-activity cycle on 24-h profiles of cortisol. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 2002; 282: E1147-1153.
38. Konopka RJ, Benzer S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: 2112-6.
39. Bargiello TA, Jackson FR, Young MW. Restoration of circadian behavioural rhythms by gene transfer in *Drosophila*. *Nature* 1984; 312: 752-4.
40. Garaulet M, Corbalan MD, Madrid JA, Morales E, Baraza JC, Lee YC, Ordovas JM. 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: 516-23.
41. Bandin C, Martinez-Nicolas A, Ordovas JM, Ros Lucas JA, Castell P, Silvente T, Madrid JA, Garaulet M. 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)* 2012; 1-7.
42. Garaulet M, Esteban Tardido A, Lee YC, Smith CE, Parnell LD, Ordovas JM. SIRT1 and CLOCK 3111T > C combined genotype is associated with evening preference and weight loss resistance in a behavioral therapy treatment for obesity. *Int J Obes (Lond)* 2012.
43. Johnson CH. Forty years of PRCs—what have we learned? *Chronobiology International* 1999; 16: 711-43.
44. Bjarnason GA, Jordan RC, Wood PA, Li Q, Lincoln DW, Sothorn RB, Hrushesky WJ, Ben-David Y. Circadian expression of clock genes in human oral mucosa and skin: association with specific cell-cycle phases. *The American Journal of Pathology* 2001; 158: 1793-801.
45. Cajochen C, Jud C, Munch M, Kobiak S, Wirz-Justice A, Albrecht U. Evening exposure to blue light stimulates the expression of the clock gene PER2 in humans. *The European Journal of Neuroscience* 2006; 23: 1082-6.
46. Gomez-Santos C, Gomez-Abellan P, Madrid JA, Hernandez-Morante JJ, Lujan JA, Ordovas JM, Garaulet M. Circadian rhythm of clock genes in human adipose explants. *Obesity (Silver Spring)* 2009; 17: 1481-5.
47. Garaulet M, Ordovas JM, Gomez-Abellan P, Martinez JA, Madrid JA. An approximation to the temporal order in endogenous circadian rhythms of genes implicated in human adipose tissue metabolism. *Journal of Cellular Physiology* 2011; 226: 2075-80.
48. Minors DS, Waterhouse JM. The use of constant routines in unmasking the endogenous component of human circadian rhythms. *Chronobiology International* 1984; 1: 205-16.
49. Waterhouse J, Jones K, Edwards B, Harrison Y, Nevill A, Reilly T. Lack of evidence for a marked endogenous component determining food intake in humans during forced desynchrony. *Chronobiology International* 2004; 21: 445-68.
50. Halberg F. Frequency spectra and cosinor for evaluating circadian rhythms in rodent data and in man during Gemini and Vostok flights. *Life Sciences and Space Research* 1970; 8: 188-214.
51. van Someren EJ, Hagebeuk EE, Lijzenga C, Scheltens P, de Rooij SE, Jonker C, Pot AM, Mirmiran M, Swaab DF. Circadian rest-activity rhythm disturbances in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 1996; 40: 259-70.
52. Ko CH, Takahashi JS. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human Molecular Genetics* 2006; 15 Spec No 2: R271-277.
53. Naismith SL, Rogers NL, Mackenzie J, Hickie IB, Lewis SJ. The relationship between actigraphically defined sleep disturbance and REM sleep behaviour disorder in Parkinson's Disease. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 2010; 112: 420-3.
54. Baron KG, Reid KJ, Kern AS, Zee PC. Role of sleep timing in caloric intake and BMI. *Obesity (Silver Spring)* 2011; 19: 1374-81.
55. Eisenmann JC, Ekkekakis P, Holmes M. Sleep duration and overweight among Australian children and adolescents. *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)* 2006; 95: 956-63.
56. Urban R, Magyarodi T, Rigo A. Morningness-eveningness, chronotypes and health-impairing behaviors in adolescents. *Chronobiology International* 2011; 28: 238-47.
57. Erren TC, Reiter RJ. Axelrod, the pineal and the melatonin hypothesis: lessons of 50 years to shape chronodisruption research. *Neuro Endocrinology Letters* 2010; 31: 585-7.
58. Horne JA. A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. *International Journal of Chronobiology* 1976; 4.
59. Lopez-Minguez J, Ordonana JR, Sanchez-Romera JF, Madrid JA, Garaulet M. Circadian system heritability as assessed by wrist temperature: A twin study. *Chronobiology International* 2014; 1-10.
60. Bandin C, Martinez-Nicolas A, Ordovas JM, Ros Lucas JA, Castell P, Silvente T, Madrid JA, Garaulet M. 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: 1044-50.