



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Influencias Genéticas y Ambientales en la Salud del Sistema Circadiano, el Patrón de Sueño Vigilia y el Horario de la Comida.
Estudio Clásico en Gemelos.

D. Jesús López Mínguez
2017



Memoria presentada por

D. JESÚS LÓPEZ MÍNGUEZ

para optar al GRADO DE DOCTOR por la

Universidad de Murcia, 2017

Esta tesis doctoral ha sido dirigida por:

Dra. MARTA GARAULET AZA

Catedrática de Fisiología

Departamento de Fisiología

Universidad de Murcia, Murcia. España



D^a. Marta Garaulet Aza, Catedrática de Universidad del Área de Fisiología en el Departamento de Fisiología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Influencias genéticas y ambientales en la salud del sistema circadiano, el patrón de sueño vigilia y el horario de la comida. Estudio clásico en gemelos", realizada por D^o Jesús López Mínguez, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 2 de Mayo de 2017

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Marta Garaulet Aza', written over the date.

*A mi madre y mis abuelos,
porque soy quien soy gracias a ellos.*

*A mi familia y mis amigos,
porque mi vida es maravillosa gracias a ellos.*

Agradecimientos

Tras llevar una hora delante del ordenador buscando las palabras adecuadas para dedicar esta tesis doctoral, y otra hora para averiguar cómo comenzar este apartado, nunca me podría haber imaginado lo difícil que es y la inmensa cantidad de emociones, consideradas olvidadas, que te llegan a la mente.

Quería comenzar agradeciendo eternamente esta tesis a mi directora **Marta Garaulet Aza**, a la que considero mi madre en la ciencia. Nunca se me olvidará cuando observé el tablón de fisiología y leí que iba a ser alumno interno de la profesora Garaulet, experta en obesidad. Tras mi primer pensamiento “¿Y quién es ella?”, me dispuse a buscar su despacho, donde me recibió con una enorme sonrisa seguido de un: “hola guapo, ¿quién eres?”. Ese fue el principio de una enorme cantidad de experiencias juntos que nos llevaron a vivir un mes en Boston, horas de risas que nos han saltado las lágrimas, muchas meteduras de pata que nos han hecho ser amigos, pero sobre todo muchísima ilusión, y eso es lo que caracteriza a Marta. Esa ilusión con la que transmite sus conocimientos y las ganas de trabajar, que te llevan a dar lo mejor de ti y a conseguir lo que te propongas, aunque no hayas sido un estudiante diez. Por todo esto y por lo que aún nos queda por vivir juntos, te doy y siempre te daré las GRACIAS.

Es inevitable pensar en segundo lugar en todos mis compañeros investigadores a los que considero mi familia en la ciencia y sobre todo grandes personas y amigos. Sin ellos, todo esto tampoco habría sido posible. Su alegría y apoyo incondicional hacen que me levante todas las mañanas con unas ganas locas de ir al despacho. **Puri**, “mi rebe”, fuiste la primera persona que vi después de Marta y eres la segunda persona a la que quiero agradecerle todo este trabajo. Como te dije en su día, eres la estrella del grupo y sin ti esto no sería posible. En estos años, poco a poco hemos ido haciéndonos grandes compañeros y amigos, hasta corroborar, tras un mes en Boston, que eres una persona excepcional, gracias por todo. **Cristina**, “mi maestra”, no podría haber tenido una mejor. Mi primer apoyo importante fuiste tú, aprendí de ti todo lo que sé de cronobiología, siempre traías el humor a la sala y te has convertido en una amiga incondicional para mí.

Quería continuar con las segundas a bordo de todo este gran viaje que ha sido mi tesis. **María Paz**, “mi hermana científica”, empecé en el maravilloso mundo de la investigación de alumno interno contigo y terminaré esta tesis también contigo. Poco a poco te has convertido en una persona crucial en mi vida, quizá porque no nos quedó más remedio, al tirarnos una año completo, 24 horas juntos cada viernes o quizá porque ha tenido que ser así, pero te agradezco todos los ratos vividos en el SACE y fuera de él. **Nuria**, “mi pupila”, gracias por darme la oportunidad de transmitirme todo lo que sabía de cronobiología, y por recibir el conocimiento con esa paciencia y alegría que tienes. Espero haber sido tan buen maestro como lo fueron conmigo, porque tú has sido una pupila alucinante y siempre me tendrás para enseñarte todo lo que pueda. **Vero**, “mi caracola”, aunque te conocí hace varios años en la clínica, este año ha sido cuando de verdad he descubierto lo increíblemente maravillosa y máquina que eres, gracias por darme un brazo y lo que hiciera falta para ayudarme cuando lo he necesitado, sé que siempre te voy a tener ahí para lo que sea.

Como no, agradecer al resto del grupo: a **Beatriz** “mi pija” preferida, gracias por las últimas correcciones; a la “hija pródiga” **Patricia**, y a las nuevas adquisiciones **Álvaro**, **Susana**, **Teresa**, **Nieves**, **Laura** y **Uri**, gracias chicos por ser parte de este grupo y traerme momentos maravillosos en los que me he reído y disfrutado muchísimo.

Quiero agradecer también esta tesis a **Juan Ramón Ordoñana**, “el psicólogo vasco” como decía Marta, porque sin él tampoco hubiera sido posible. Gracias a él tengo esta tesis, ya que puso en nuestras manos a su población de gemelas y realizó los análisis estadísticos tan difíciles que nunca llegaré a entender. Gracias por tu paciencia y tu profesionalidad.

En este párrafo quiero agradecer a todas las personas del departamento de Biología. Gracias a mis compañeros de sala con los que he compartido momentos de tensión por las tesis, **Antonio**, **Domingo**, **María** y **Ana**. Al profesor **Juan Antonio Madrid**, cuyo conocimiento ha sido pilar básico de esta tesis doctoral y a los demás profesores que forman parte de este grupo como a **Elvira**, **Paquita**, **Javier**, **Jorge**, **Pilar**, **Juan Fran**, **Salvador** y **Jose Ángel**.

Ahora llega el momento de dar las gracias a todas aquellas personas ajenas al mundo de la investigación, con ellas, estos cinco años han sido más llevaderos. Me gustaría empezar por mis tres amigas de la carrera, **Marina, María y Lola**. Gracias de veras por todos los momentos que he compartido con vosotras, por las cenas, los aperitivos, las fiestas hablando, momentos de reflexión biológica y por vuestro apoyo incondicional que nos ha llevado a ser grandes amigos diez años después de haber comenzado la carrera. Sois sólo tres, pero me llevo a las tres mejores compañeras que uno podría haber tenido.

Podría tirarme páginas y páginas agradeciendo a todos mis amigos lo mucho que hacen por mí, lo mucho que los quiero y lo muy orgulloso que estoy de todos y cada uno de ellos, porque son y serán siempre los mejores. Empezando por mis amigos de toda la vida **Pedro, Victoria, Miriam, Ana María, Lázaro, Elena, Marta, Cristina, Miguel, Ángel, Gabriela, Rubén, Antonio, Alejandro, Isa, Tere, Nuria, Nano y Alberto**, los cuales siempre han estado ahí para lo que me ha hecho falta. Gracias a ellos el sentido de la amistad tiene lógica, me han apoyado, escuchado, aconsejado y aguantado mis quejas todos estos años de tesis. Gracias a vosotros esta tesis también ha sido posible.

En segundo lugar, quiero agradecer también a otro grupo de amigos que aparecieron hace cinco años en mi vida y han formado parte de ella y cómo no, de esta tesis. Gracias **Fuensanta, Pablo, Dani, José Miguel, Nadia, Inés, Raquel, Elena, Gregorio y Lidia**. Vosotros también me habéis apoyado y escuchado en todo, y gracias a vuestras risas he pasado momentos increíbles.

Las últimas palabras quería reservarlas para unas personas realmente especiales para mí, mi familia. A mis padrinos, **Jero y Gela**, porque siempre me han hecho sentir como un hijo más y con ellos he sentido que nunca me faltaría nada. A mis primos, **Adela**

y **Alberto**, y cómo no, **Lola** y **Daniel**, gracias por ser los mejores primos que uno podría tener y por estar siempre ahí cuando lo he necesitado.

A mi hermana **Pilar**, por ser la mejor, por quererme y apoyarme siempre en todo, por preocuparse de mis artículos, aunque no entendiera de qué iban, por ser simplemente la mejor hermana del mundo. Por traerme a mi sobrina **Celia**, que tanto me hace reír. Siempre te estaré agradecido en todo Pilar. **Víctor**, no me olvido de ti, gracias por ser el mejor cuñado que uno podría tener, y aunque no seas hombre de muchas palabras, sé que estarás para lo que necesite.

A mis abuelos, **Pepe** y **Remedios**, porque no sabría expresar con palabras lo mucho que los quiero. Por ser unos padres para mí, por preocuparse de que no me faltara nada, por apoyarme en mis estudios y en mi investigación a toda costa. Siempre estaré agradecido de que seáis los mejores, GRACIAS ABUELOS.

Por último, agradécele todo esto a **mi madre**, porque sin ella esta tesis no hubiera sido posible. Por apoyarme siempre en todo, por permitirme poder dedicarme a la investigación con todo lo que conlleva. Por tus valores, forma de ser y por ser simplemente una madre (la mejor). GRACIAS MAMÁ.

ÍNDICE

Índice

INTRODUCCIÓN	01
1. Cronobiología	03
1.1. ¿Qué es la cronobiología?	03
1.2. Organización del sistema circadiano	05
1.3. Cuando el sistema circadiano funciona mal: cronodisrupción	07
1.4. Evaluación de la salud del sistema circadiano	09
a) Medir las entradas al reloj central o sincronizadores externos (<i>zeitgeber</i>).....	09
b) Determinar las alteraciones en el reloj interno, con el fin de evaluar la genética del reloj molecular.....	11
c) Evaluar las salidas del reloj central.....	12
2. Heredabilidad del sistema circadiano	16
2.1. Heredabilidad del sueño.....	17
2.2. Heredabilidad de los horarios de las comidas.....	20
2.3. Modelos en gemelos en el estudio de la heredabilidad	22
2.4. Estudios genéticos de poblaciones y definición de nutrigenética: <i>MTNR1B</i> 26	26
OBJETIVOS.....	31
Estado actual.....	33
Objetivo general	34
Objetivos específicos	34
MATERIAL Y MÉTODOS	37
1) Poblaciones de estudio	39
-Población de gemelas	39
-Población ONTIME-DINE	39
2) Procedimientos y diseño experimental de los estudios.....	40
-Heredabilidad de la salud del sistema circadiano (población de gemelas).....	40
-Impacto del <i>MTNR1B</i> en enfermedades asociadas con la cronodisrupción como la diabetes (población ONTIME-DINE).....	41
3) Características generales de las poblaciones estudiadas	43
a) Parámetros de obesidad y síndrome metabólico (MetS)	43
b) Evaluación del cronotipo	44
c) Evaluación de la dieta y características del sueño	44
4) Hormonas circadianas	45
5) Evaluación de la salud del sistema circadiano.....	46
-Medición de la ritmicidad de la temperatura de la muñeca	46
-Medición de la ritmicidad de la posición corporal y ritmo de actividad de reposo.....	47
-Medición de la ritmicidad de la variable integrada de temperatura, actividad y posición (TAP) y del sueño.	47
-Medición de la luz.	48
5.1. Parámetros obtenidos del estudio de ritmos circadianos.....	48
a) Parámetros obtenidos a través del análisis de Cosinor:	48
b) Parámetros obtenidos mediante análisis no paramétrico	49

c) Parámetros de sueño obtenidos a partir del software registrado (Circadianware ®):.....	50
6) Medidas de los valores de glucosa capilar.....	50
7) Aislamiento del ADN y genotipado del <i>MNTR1B</i>	51
8) Análisis estadísticos	52
Población de gemelas.....	52
Población ONTIME-DINE	54
RESULTADOS	57
Resultados objetivos 1-4:	59
1) Características generales de la población estudiada.....	61
2) Resultados específicos del análisis de la heredabilidad del sistema circadiano evaluado con la temperatura en la muñeca (objetivo 1)	61
3) Resultados específicos la determinación de heredabilidad del sistema circadiano evaluado con el TAP (objetivo 2).....	65
4) Resultados específicos la determinación de heredabilidad del patrón sueño-vigilia y la siesta (objetivo 3).....	70
5) Resultados específicos de la determinación de heredabilidad del horario de la comida y variables relacionadas (objetivo 4)	73
Resultados del objetivo 5:	77
1) Resultados específicos del estudio de la variante del <i>MTNR1B</i> y su interacción con la ceba y su efecto sobre la tolerancia a la glucosa.....	79
DISCUSIÓN	81
1. Sobre el análisis de las influencias genéticas y ambientales en la salud del sistema circadiano mediante la medición continua de la temperatura periférica.....	83
2. Sobre la utilización de procedimientos multiparamétricos como la variable integrada de temperatura, actividad y posición (TAP) para la medición de las influencias genéticas y ambientales sobre la salud del sistema circadiano	89
3. Sobre la determinación de las influencias genéticas y ambientales en la siesta del patrón sueño-vigilia	94
4. Sobre la evaluación de las influencias genéticas y ambientales de factores relacionados con la hora de la comida en una población mediterránea de gemelas.....	99
5. Sobre el estudio de una variante génica de riesgo del <i>MTNR1B</i> y su impacto sobre enfermedades asociadas con la cronodisrupción como la diabetes.....	104
CONCLUSIONES	109
BIBLIOGRAFÍA	113
ANEXOS.....	125
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....	141
CUESTIONARIOS.....	155

INTRODUCCIÓN

1.Cronobiología

1.1. ¿Qué es la cronobiología?

El concepto del tiempo es difícil de definir y hoy en día no hay una definición clara de lo que es el tiempo. Se ha definido como "el paso continuo de la existencia, en el cual los sucesos pasan de un estado de potencialidad en el futuro, a través del presente, a un estado de finalidad en el pasado" (1). El tiempo es también "un momento, una hora, un día o un año, según lo indicado por un reloj o un calendario".

Millones de años antes de que los humanos desarrollaran el primer calendario o inventaran el primer reloj artificial, los organismos vivos empezaron a desarrollar mecanismos para medir el tiempo. En la naturaleza numerosos procesos que se repiten de manera periódica y predecible, a este patrón se le denomina "ritmo biológico". El primer informe específico de un ritmo biológico fue proporcionado por el astrónomo francés Jean Jacques d'Ortous De Marian en 1729 (2), quien informó de los movimientos foliares de la planta *Mimosa pudica*. De Marian demostró que los movimientos de apertura y cierre de las hojas, producidos a lo largo de las 24h del día cuando la planta recibía la luz solar, se mantenían cuando la planta se sometía a condiciones de oscuridad constante durante varios días. De Marian descubrió que no era la luz solar ni el ambiente que rodeaba a la planta lo que provocaba los cambios en la posición de las hojas. Era un reloj interno propio, independiente del exterior, y que seguía funcionando aunque la planta se encontrara en un ambiente constante de completa oscuridad. De esta manera, De Marian demostró por primera vez la existencia de un reloj interno en un ser vivo que era independiente de la luz solar y que se mantenía en condiciones de oscuridad constante durante varios días consecutivos.

Posteriormente, Colin S. Pittendrigh en 1967, gracias al estudio de los ritmos biológicos de la mosca de la fruta *Drosophila*, descubrió los principios básicos en los que se basa la cronobiología moderna (3).

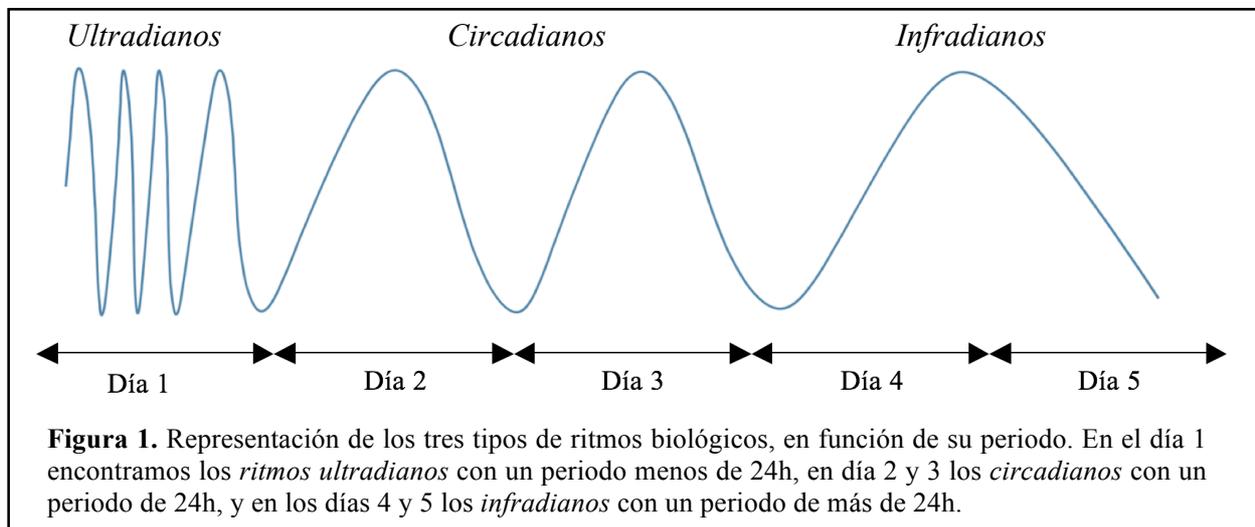
En el ser humano, los primeros estudios de cronobiología, basados en los cambios a lo largo de las 24 horas del día (ritmos circadianos) fueron los de Sanctorius Padua (1561-1636), médico y fisiólogo italiano que durante 30 años se pesaba varias veces al día y también pesaba todos los alimentos que ingería y los fluidos que excretaba. Además, inventó un termómetro clínico que utilizaba para medir los cambios de su propia temperatura corporal a lo largo del día.

Otra de las primeras referencias científicas sobre los ritmos circadianos fue el trabajo del farmacéutico francés Julien-Joseph Virey en 1814, sobre “Los cambios diarios y la periodicidad de sus fenómenos en la salud y las enfermedades”, en el que mencionaba los ritmos biológicos y la conveniencia de tener en cuenta la hora del día para administrar ciertos medicamentos (4).

Así decía Julien-Joseph en su tesis doctoral "...Esta rotación sucesiva de nuestras funciones vitales cada día, de la vigilia, del sueño, de la reparación nutricional, de las excreciones y secreciones ¿no está establecido por una periodicidad habitual y como innato en todos los órganos de nuestro cuerpo? ¿No parece como un sistema de ruedas engranadas unas sobre las otras, una clase de reloj viviente, montado por la naturaleza, encarrilado por el movimiento rápido del sol y de nuestra esfera?..."

Pero no fue hasta mediados del siglo XX cuando emergió un nuevo campo en la ciencia, conocido como cronobiología emergió. Cronobiología es una palabra derivada del griego: “*kronos*” de tiempo, “*bios*” de vida y “*logos*” de estudio, es decir es la ciencia que estudia los procesos temporales (los ritmos biológicos) que se producen en los organismos vivos. Los ritmos biológicos se pueden clasificar en función del tiempo en

el que transcurre su periodo, así aquellos con un periodo próximo a 24h se denominan *circadianos*, aquellos con un periodo de menos de 24h se denominan *ultradianos* y los que presentan un periodo de más de 24h *infradianos* (1).



Los ritmos circadianos, son una parte tan innata de nuestras vidas que raramente les prestamos atención (5). Gracias a la correcta oscilación cíclica de estos ritmos de 24h los organismos pueden predecir y anticiparse a los cambios medioambientales, así cómo adaptar temporalmente sus funciones conductuales y fisiológicas a estos cambios. En los humanos, los hábitos sociales actuales, como la reducción del tiempo de sueño, la irregularidad interdiaria del sueño-vigilia (jet-lag o el trabajo por turnos), el picoteo en la alimentación, actúan sobre el cerebro induciendo una pérdida de la percepción de los ritmos internos y externos (6).

1.2. Organización del sistema circadiano

El sistema circadiano de los mamíferos está formado principalmente por un marcapasos central, localizado en el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo, el cual se sincroniza cada día mediante una señal periódica de luz/oscuridad. La luz atraviesa una ruta no visual basada en las células ganglionares provistas del pigmento melanopsina y en el tracto retinohipotalámico (TRH). El reloj central, a su vez, sincroniza el funcionamiento de varios relojes periféricos localizados fuera del NSQ mediante la

secreción periódica de hormonas y la actividad del sistema nervioso vegetativo. Estos relojes periféricos, parece ser que son a su vez sincronizados por otros sincronizadores externos, como son el horario de las comidas (ingesta/ayuno) y el ejercicio programado (actividad/reposo).

Cabe destacar, que estos ritmos circadianos se producen gracias a la expresión de los denominados “genes reloj”. Dichos genes reloj codifican una serie de proteínas que generan mecanismos de autorregulación a través de bucles de “feed back” positivos y negativos (7). Por un lado, nos encontramos con los elementos positivos, CLOCK (circadian locomotor output cycles kaput) y BMAL1 (brain and muscle ARNT-like protein 1). Estos elementos positivos forman el heterodímero CLOCK/BMAL1 el cual es capaz, de estimular la transcripción de *BMAL1*, generando un bucle de retroalimentación positiva, y además de unirse a la región promotora de diversos genes reloj, como el *PER1* (period 1), *PER2* (period 1), *PER3* (period 3), *CRY1* (cryptochrome 1), *CRY2* (cryptochrome 2) y otros genes controlados por el reloj (*CCGs*: clock-controlled genes). Por otro lado, nos encontramos con los elementos negativos CRY1 y PER2 los cuales forman el heterodímero CRY1/PER2 que se transloca al núcleo para inhibir la actividad de CLOCK/BMAL1 (8, 9). De tal manera, se produce un ciclo de activación e inhibición que se repite aproximadamente cada 24h.

Hoy en día, se conoce muy bien cómo participa la maquinaria del reloj circadiano en el metabolismo. Aproximadamente entre un 10 y un 30% de los genes, dependiendo del tejido, parecen estar regulados por un ritmo de expresión guiado por estos genes reloj. Así, proteínas reloj como BMAL1 y otras proteínas de CCG están involucradas en el metabolismo lipídico. Además, BMAL1 y CLOCK están implicados en la homeostasis de la glucosa, mientras que CLOCK y PER parecen asociarse con la regulación del apetito.

1.3. Cuando el sistema circadiano funciona mal: cronodisrupción

En la sociedad moderna del siglo XXI también conocida como sociedad de los 7/24 (7 días y 24h al día), es habitual el trabajo por turnos, los viajes a otras partes del mundo con diferente huso horario, la contaminación lumínica durante la noche, así como la realización de actividades lúdicas durante la noche. Estos hábitos de vida frenéticos producen una perturbación del orden temporal interno de los ritmos circadianos fisiológicos, bioquímicos y de conducta, a lo que se le ha denominado “cronodisrupción” (CD). La CD se define como la ruptura de la sincronización entre los ritmos circadianos internos y los ciclos de 24 horas medioambientales (10).

En los últimos años, ha aumentado el interés por la CD debido a las evidencias científicas de su estrecha asociación con el riesgo de desarrollar ciertas enfermedades o el empeoramiento de patologías ya existentes, como el envejecimiento prematuro, el cáncer, enfermedades cardiovasculares y la obesidad.

Para conocer el funcionamiento del sistema circadiano, debemos de entender que éste consta de tres componentes fundamentales que deben de actuar en armonía para que se produzca un correcto funcionamiento de la maquinaria que entrama el ritmo biológico. De esta manera la CD se entiende como el resultado de alteraciones en alguno de estos componentes:

-Entradas. El primero de estos componentes se refiere a las entradas del oscilador central y osciladores periféricos llamadas sincronizadores externos (zeitgeber), que son aquellos procesos externos al reloj central y periféricos que ayudan a ponerlo en “hora”. Entre éstos cabe destacar el ciclo de luz-oscuridad, la actividad física y los horarios de las comidas. Se ha observado que la baja intensidad lumínica o estar sometido a espectros de luz por debajo de los rangos óptimos, puede dar lugar a fallos en la sincronización del reloj interno con el exterior y por tanto puede contribuir a la aparición de patologías

relacionadas con la CD (11). Del mismo modo, los cambios en el horario de las comidas también pueden producir CD; sujetos con estilos de vida nocturno presentan hiperglucemia y valores anormalmente bajos durante la noche de leptina (hormona de la saciedad) y melatonina (hormona del sueño) (12). Además, a hora de la actividad física es también un importante sincronizador de los ritmos biológicos y sabemos que la realización de ejercicio por la noche empeora los ritmos circadianos, ya que presentan oscilaciones diarias menos marcadas, comparados con las mostradas tras realizar ejercicio por la mañana (13).

-Oscilador central. La CD puede ser también resultado de un fallo en la maquinaria del propio reloj. El oscilador o reloj central está formado por todo el entramado de genes mencionados anteriormente, así gracias a los sincronizadores externos, los dímeros CLOCK/BMAL1 y CRY1/PER2, siguen un ciclo de 24h capaz de regular múltiples procesos fisiológicos. Alteraciones en estos genes reloj pueden dar lugar a CD, como es el caso de la alteración en Clock que en ratones se asocia con obesidad, y en humanos existen también variantes génicas en *CLOCK* que se asocian con obesidad, tal y como ha demostrado nuestro grupo de investigación (14). Otros estudios en animales de experimentación y en humanos han mostrado también que alteraciones en el *BMAL1* se asocian con envejecimiento, o en el *PER2* con diversos tipos de cáncer y alteraciones psicológicas (15, 16). La CD también se produce como consecuencia de un desfase entre los ritmos del NSQ y los producidos por los relojes periféricos.

-Salidas. El tercer componente implicado en este entramado son las salidas del sistema circadiano. El estudio de melatonina y cortisol, de los ritmos de temperatura (central y periférica), y de la presión arterial, entre otros factores, nos ayuda a detectar alteraciones en el sistema circadiano. La melatonina es la hormona de la noche, y se

libera en la glándula pineal como respuesta simpática a la acción del NSQ (17). Las alteraciones en el ritmo de melatonina se consideran un buen marcador de CD (18).

1.4. Evaluación de la salud del sistema circadiano

La evaluación del sistema circadiano alcanza una gran importancia en el estudio de la enfermedad, en su diagnóstico y en la prevención ya que la CD se asocia con ciertas enfermedades tales como obesidad, cáncer, alzhéimer, depresión, etc. (19, 20), es por ello que cada vez es mayor el interés en evaluar el sistema circadiano, no sólo en la investigación de ciertas enfermedades, sino también en la práctica clínica.

Actualmente existen diversos enfoques en la evaluación del sistema circadiano las más utilizadas hasta el momento son las siguientes:

a) *Medir las entradas al reloj central o sincronizadores externos (zeitgeber).* A partir del análisis de los ritmos de luz/oscuridad, ayuno/ingesta y actividad/reposo, se pueden determinar diferentes variables que nos pueden ayudar a evaluar la salud circadiana.

-Ritmos de luz/oscuridad. El ciclo de luz/oscuridad es uno de los mayores sincronizadores externos, por lo que la cuantificación a la exposición lumínica de los individuos puede ser útil en la práctica clínica. La exposición insuficiente de luz durante el día influye en la temperatura central y el estado de conciencia (8). Además, por la noche se debe evitar la exposición a la luz, especialmente a la luz azul, con el fin de mantener la secreción de melatonina activa, siendo esta exposición nocturna a la luz uno de los cronodisruptores claves en la sociedad moderna. Estos ritmos pueden ser cuantificados por luxómetros, que contienen una célula fotosensible y registran periódicamente la intensidad luminosa recibida por el individuo. La combinación de estos sensores con otros sensores de temperatura ambiental proporciona información completa sobre la calidad de los sincronizadores ambientales que actúan sobre el sistema circadiano (8).

-Ritmo de ayuno/ingesta. El horario y el número de comidas difiere mucho de cultura a cultura. De hecho, el momento de la ingesta es un comportamiento modificable que puede influir en la regulación de la energía y, en consecuencia, el riesgo de obesidad. Nuestro grupo de investigación ha demostrado que la hora de la comida es predictiva de la pérdida de peso durante una intervención dietética de 20 semanas realizada en 420 personas obesas y con sobrepeso (9). Además, en este estudio se observó que la sensibilidad a la insulina fue menor en los consumidores tardíos en comparación con los comedores tempranos. Esto se puede explicar en parte, por el hecho de que en el tejido adiposo el momento de mayor sensibilidad a la insulina se produce alrededor de las 12 del mediodía, momento que coincide con la ingesta de los comedores tempranos (21). Además, que comer tarde la comida principal del medio día, se asocia con una disminución del gasto energético en reposo, disminución de la oxidación en carbohidratos en ayunas, disminución de la tolerancia a la glucosa, reducción del perfil diario en las concentraciones de cortisol libre y disminución del efecto térmico de los alimentos en la temperatura periférica (22). Existen diferentes métodos que pueden utilizarse para evaluar la ingesta dietética habitual y el horario de las comidas: por ejemplo, para evaluar los hábitos alimentarios, la ingesta se puede determinar mediante un registro dietético de 7 días. Cada día, los sujetos deben registrar todo lo que comen y también el momento en que comienzan o terminan cada comida. Los pacientes también pueden registrar durante una semana la hora del día en que comienzan cada comida con el cuestionario desarrollado por Bertéus *et al.* (23). Otro cuestionario utilizado para evaluar los cambios circadianos en el hambre y el apetito es el desarrollado por Flint *et al.* (24), de escalas analógicas visuales (VAS) para medir las sensaciones del apetito. Las VAS se utilizan para registrar el hambre, la saciedad, la plenitud, el consumo potencial de alimentos, el deseo de comer algo graso, salado, dulce o salado, y la palatabilidad de las comidas (24).

-Ritmo de actividad/reposo. La actigrafía (entendida como actividad motora y posición corporal) es una excelente herramienta para evaluar la salud del sistema circadiano y determinar la actividad de sueño-vigilia en los individuos (25). Se basa en el principio de que durante el periodo en que el individuo está despierto los valores de actividad son altos comparado con el periodo en el que el individuo está dormido. Para su medición, se coloca un sensor de actividad (actímetro) en la muñeca de la mano no dominante durante no menos de 5 días, período mínimo para obtener datos confiables que reflejen las características del sujeto (26). La actigrafía, se considera el método de elección para evaluar y diagnosticar trastornos circadianos como la cronodisrupción en trabajadores por turnos, síndrome de fase retrasada o avanzada de sueño y síndrome de ritmos circadianos irregulares (27). Otro método para evaluar el ritmo de actividad/reposo del individuo es el registro de actividad física durante 7 días, en el que el sujeto registra el momento, el tipo y la intensidad de la actividad física diaria realizada durante una semana, incluidos los días laborables y los fines de semana. Sin embargo, aún queda por resolver una serie de cuestiones metodológicas que justifiquen su uso en la investigación clínica (28).

Otra herramienta circadiana es el análisis de la posición del cuerpo durante 24h. Esta determinación ha sido más cuestionada que el registro de actividad física, ya que depende del control voluntario del individuo y rara vez se ha considerado en la medición de la salud circadiana del individuo, ya que la mayoría de los actímetros se colocan en la muñeca, y por lo tanto no proporcionan información sobre la adecuada posición horizontal/vertical del sujeto.

b) Determinar las alteraciones en el reloj interno, mediante el estudio de la genética del reloj molecular. Hoy en día, los modelos experimentales nos permiten evaluar la expresión de los genes de reloj, no sólo en animales vivos, sino también fuera del cuerpo

(técnicas *in vitro*). Estos modelos experimentales también nos permiten estudiar las fluctuaciones de 24 horas en la expresión génica, y la presencia o ausencia de un reloj periférico en los diferentes órganos y tejidos. Los modelos experimentales nos permiten activar y desactivar componentes específicos de la maquinaria del reloj para identificar sus efectos en los fenotipos metabólicos y de enfermedad. Desde el punto de vista de la epidemiología genética, el estudio de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), está contribuyendo a la identificación de los antecedentes genéticos del cronotipo del individuo. El cronotipo clasifica a la población en individuos matutinos, que son aquellos que prefieren la mañana para la realización de la mayoría de sus actividades diarias, y en individuos vespertinos o aquellos que prefieren la noche. El análisis de los genes reloj también está siendo de gran utilidad para el estudio de las alteraciones del sueño o de los trastornos estacionales del estado de ánimo.

c) Evaluar las salidas del reloj central. Por último, la evaluación del sistema circadiano también se puede realizar mediante el análisis de las salidas del mismo. Hormonas, transmisores, etc. que sirven de conexión para poner en “hora” otros sistemas fisiológicos. Entre estos marcadores destaca la temperatura corporal, la melatonina y el cortisol.

-Temperatura corporal. Uno de los marcadores más usados en cronobiología es la medición de la temperatura central cuyos valores más elevados ocurren durante el día y los más bajos durante la noche (29, 30). La temperatura central se ha asociado con efectos fisiológicos generalizados (29). Su medición no es fácil en condiciones de vida ambulatoria o libre, ya que generalmente se mide mediante sondas rectales, timpánicas, orales o urinarias, o píldoras abdominales recolectoras de datos, lo cual requiere laboratorios especializados (31-33).

Por otro lado, muchos investigadores optan por la medición de la temperatura en la muñeca (WT: wrist temperature) a través de sensores, ya que nos permite la evaluación del sistema circadiano en condiciones habituales de vida libre y durante largos períodos de tiempo. Es una técnica no invasiva que permite una evaluación fácil y económica de la salud circadiana para un uso rápido y efectivo en la práctica clínica (34). El patrón circadiano de la temperatura periférica es inverso al de la temperatura central, mostrando los valores más altos durante la noche y los más bajos durante el día. Las investigaciones muestran que la WT es un buen marcador para evaluar la salud del sistema circadiano en diferentes circunstancias (34) ya que además ha sido validado por polisomnografía (35) y se ha correlacionado previamente con el análisis del “inicio de melatonina en condiciones de luminosidad tenue” llamada en inglés Dim Light Melatonin Onset (DLMO) y que se conoce como un método eficaz de conocimiento de la acrofase del sueño (36). De hecho, diferentes patologías como la hipertensión (37), el síndrome metabólico (MetS) y la obesidad (38), así como con la pérdida de peso (39) se han asociado con alteraciones en el patrón de 24h de la temperatura periférica. Un ritmo de temperatura en la muñeca poco robusto, aplanado (con menor amplitud), fragmentado (con mayor variabilidad intradiaria), o poco estable (con menor estabilidad interdiaria), se considera marcador de enfermedad. Teniendo en cuenta que la medición de la temperatura en la muñeca resulta útil en la práctica clínica para evaluar la cronodisrupción (40), sería interesante conocer la contribución relativa de los componentes genéticos y ambientales en los ritmos diarios de este marcador de CD, sin embargo, hasta ahora no existen estudios al respecto.

-Melatonina. La melatonina se considera el mejor marcador de fase del sistema circadiano. Sin embargo, su perfil está no es sólo circadiano, es decir no sólo está marcado por el reloj interno, sino que en él influyen otros factores o sincronizadores

externos como es la exposición a la luz y, en menor medida factores del propio individuo como es la posición corporal, la actividad física, el sueño, el consumo de cafeína y de fármacos como los betabloqueantes (41-44). Los valores plasmáticos de melatonina muestran un perfil de 24h, con valores bajos durante el día y valores altos durante la noche, produciéndose un pico en la secreción de entre las 02:00 h y las 04:00 h de la noche. En los seres humanos, la melatonina contribuye al ritmo de la temperatura corporal, ya que esta hormona es responsable de la vasodilatación de la piel de las extremidades. Además, la secreción de melatonina se relaciona con la propensión al sueño y coincide con una caída de la temperatura corporal central, y con una disminución en el grado de excitación y en el rendimiento del individuo (45). La manipulación de los valores de melatonina podría ser clínicamente útil para resincronizar el ritmo de la temperatura corporal en condiciones de desincronización. Sus valores se pueden medir de forma fiable en plasma, saliva y orina (en el último caso como su metabolito, la 6-sulfatoximelatonina). El mejor momento para evaluar la melatonina como marcador del ritmo circadiano es al anochecer, en condiciones de luz tenue (<50 lux), ya que coincide con un rápido aumento de las concentraciones fisiológicas de melatonina. A esta metodología se le conoce como DLMO (Dim Light Melatonin Onset) es decir, inicio de melatonina en condiciones de luminosidad tenue (46). En los estudios de DLMO, es suficiente iniciar el muestreo de melatonina de 2 a 3 horas antes de la hora normal de acostarse del sujeto (entre las 19:30 h y las 22:00h de la noche, aunque depende del individuo y de los hábitos del país donde se realice el estudio, y de las características del individuo, es decir si muestra o no alteraciones de fase.

-*Cortisol*. El cortisol se considera un marcador adecuado para la evaluación de la salud circadiana, ya que es un corticosteroide con un perfil circadiano robusto que alcanza su pico máximo a la hora del despertar y que presenta valores mucho menores a

medida que avanza el día y alcanza su valor mínimo, aproximadamente 2 horas después de que el individuo se vaya a dormir. A pesar de considerarse un buen marcador circadiano, debemos tener en cuenta que los valores de cortisol pueden verse afectados por factores externos como los horarios de ingesta de alimentos (22), la presencia de situaciones estresantes, la exposición a la luz en determinados momentos del día (47), o situaciones patológicas como la obesidad (48). Situaciones no patológicas como el envejecimiento también afectan el perfil de cortisol. El perfil de sueño-vigilia también puede modificar el ritmo del cortisol (49). El cortisol se puede medir en suero o saliva, siendo los momentos más críticos para medir su perfil circadiano el aumento justo antes de despertar y al final del día o comienzo de la noche que es cuando presenta sus concentraciones mínimas en sangre.

-Variables integradoras (TAP). Las variables circadianas analizadas individualmente como la temperatura de la muñeca, la actividad física y la posición corporal presentan fuertes influencias ambientales, como es la temperatura ambiental externa. Además, hay errores que pueden afectar su registro, como por ejemplo, la dificultad de diferenciar entre el comienzo del descanso nocturno y la retirada del sensor para ducharse justo antes de acostarse, los movimientos del compañero de la cama, el sueño en un coche o tren, las comidas, la activación emocional y otros (50). De manera semejante, el uso de la actividad, o el análisis de la posición, como marcadores de la salud circadiana, también puede presentar errores.

Debido a estos inconvenientes, para evitar estos problemas, se ha planteado el uso de variables que integren diferentes marcadores para obtener medidas de la salud circadiana más fiables. Con el fin de minimizar estos errores y la variación aleatoria, en 2010 el grupo de investigación dirigido por el profesor Dr. Juan Antonio Madrid,

desarrolló un método para la integración de dichas variables circadianas como la temperatura periférica, la actividad y la posición, llamado TAP (51).

Estudios recientes han demostrado que el TAP permite no sólo evaluar la función del sistema circadiano del individuo, sino también el ritmo sueño-vigilia con una precisión superior al 90% según el registro polisomnográfico (52). Esta técnica se ha aplicado recientemente para evaluar la salud del sistema circadiano y su madurez en recién nacidos (53), así como su asociación con patologías como el síndrome metabólico y la obesidad (40).

2. Heredabilidad del sistema circadiano

La ritmicidad circadiana está sometida a la influencia de diferentes factores tanto internos como externos, que configuran su desarrollo y funcionamiento. Estos factores pueden ser factores genéticos (por ejemplo, los genes reloj que dirigen el funcionamiento del núcleo supraquiasmático –SCN, y otros genes que modulan otras variables circadianas), así como factores ambientales (por ejemplo, los ritmos de luz, de actividad, la vida social, factores culturales que influyen en los horarios, etc). Los ritmos circadianos del individuo por tanto serán el resultado no sólo de estos factores genéticos y ambientales sino probablemente, de la interacción entre ellos.

Clásicamente se han utilizado los modelos basados en gemelos para analizar la contribución relativa de los factores genéticos y ambientales en un determinado carácter. Estos modelos han sido aplicados también en el análisis de la ritmicidad circadiana, del cronotipo y de otras variables que definen la salud circadiana.

De hecho durante los años 1993 y 1994, Paul Linkowski *et al.* realizaron dos estudios relevantes sobre el sistema circadiano para analizar las contribuciones relativas de factores hereditarios y/o ambientales en la secreción del cortisol y la presión arterial

respectivamente (54, 55), y se concluyó que los factores genéticos controlaban algunas de las características de la ritmicidad circadiana del cortisol y de la presión arterial diastólica.

Más recientemente, Jacqueline M *et al.* (56) demostraron que la heredabilidad del cronotipo del individuo, es decir el componente genético que marca la tendencia a ser matutino o vespertino era del 44% en la población joven y del 47% en la población adulta (57). Estos resultados se obtuvieron mediante un cuestionario que clasifica a la población con respecto a su comportamiento en diferentes rangos: un valor alto del cuestionario se refiere a personas de mañana o matutinas, que son aquellas personas que se levantan temprano por la mañana, logran su mayor rendimiento durante este segmento del día y se van a la cama pronto. Un valor bajo, sin embargo, se refiere a personas nocturnas o vespertinas e incluye a aquellos sujetos que se levantan, logran su mayor rendimiento y se van a dormir tarde. Estos resultados coincidieron con los resultados obtenidos en otro estudio realizado por Hur *et al.* (58), en el que se observó que la matutinidad-vespertinidad (por ejemplo la preferencia diurna) parece estar relacionadas genéticamente con la calidad del sueño (59).

2.1. Heredabilidad del sueño

Si seguimos con la clasificación de los factores circadianos utilizada a lo largo de esta memoria de tesis, la duración y la calidad del sueño se podría considerar como un resultado o como “salida” del reloj circadiano, aunque también se podría interpretar como una característica que afecta al sistema circadiano, es decir como una “entrada”. De hecho, a la hora de analizar la salud circadiana, se estudia el ritmo de sueño-vigilia. Es por ello, que el estudio de la heredabilidad del sueño es motivo de estudio en cronobiología. Desde el punto de vista de la heredabilidad del sueño, es importante discernir entre el sueño diurno y el sueño nocturno. La carga genética del sueño nocturno

se ha estudiado repetitivamente, con estimas de heredabilidad en la “duración del sueño” entre el 17% y el 55% (59-62) mientras que la heredabilidad de la “somnolencia diaria” estaba entre el 29% (62) y el 38% (63). Estos y otros trabajos (64, 65) sugieren que los patrones de sueño presentan un componente genético considerable.

Sin embargo, esto no es así en lo que se refiere a la heredabilidad del sueño diurno, que es está todavía por descubrir. El sueño diurno, cuyo principal protagonista es la siesta, se puede definir como un sueño regular de la tarde o una siesta de mediodía y es característico de algunos países y áreas del mundo como los países mediterráneos, China y América Latina (66).

La práctica de la *siesta* es un aspecto relevante a considerar en investigación debido a su posible relación con la salud y la enfermedad. En los últimos años, la siesta se ha convertido en un tema de interés entre los científicos y en la población general, ya que estudios previos sugirieron que dormir una siesta corta podría ser beneficioso para la salud, particularmente en algunas poblaciones específicas, como en los trabajadores por turnos (67, 68). La siesta corta (menos de 30 minutos) parece reducir la presión arterial y disminuir la prevalencia de la hipertensión (69). Por el contrario, varios autores han especulado que la siesta es un marcador de condiciones insalubres, probablemente relacionadas con algunas enfermedades, como la diabetes (70), el Parkinson (71), el infarto de miocardio (72) y la obesidad (73). Hoy en día no está claro el efecto de la siesta sobre la salud, y en el caso de que fuera un factor negativo tampoco se sabe si la siesta es la causa o la consecuencia de estos problemas de salud.

Con respecto a la obesidad, está aumentando el número de estudios que hace referencia a la relación entre el sueño nocturno y la obesidad (74-76). Sin embargo, los estudios sobre la asociación entre la siesta y obesidad son escasos (73). Se necesita más información, incluyendo datos objetivos de sueño diurno, para explorar los determinantes

de la siesta y su relación con las variables relacionadas con la salud, en general, y con la obesidad, en particular.

Los hábitos de la siesta muestran una distribución geográfica y se han considerado tradicionalmente como un comportamiento que depende de la cultura y las condiciones ambientales. Sin embargo, los análisis recientes de la asociación del genoma con las características del sueño, han identificado nuevos *loci* relacionados, no sólo con la duración del sueño nocturno y el insomnio, sino también con la somnolencia diurna (77). Esto sugiere que no sólo los hábitos de vida y culturales, sino que también la genética juega un papel en los hábitos de la siesta y sus características. Sin embargo, tras una revisión bibliográfica exhaustiva no hemos sido capaces de encontrar estudios sobre la contribución relativa de factores genéticos y ambientales a la siesta, y no existen estudios evaluados por técnicas objetivas de análisis del sueño diurno.

Por el contrario, la heredabilidad del sueño nocturno sí que está bien definida, y se sabe que oscila entre el 50-70% (78, 79). De hecho, se han utilizado varios enfoques para estudiar el papel relativo de la genética y el medio ambiente en el sueño mediante *métodos subjetivos*, que implican el uso de cuestionarios para obtener características de sueño (80); y mediante *métodos objetivos*, que proporcionan una mayor visibilidad de los aspectos fisiológicos del sueño, como el examen de patrones de actividad cerebral mediante polisomnografía (81) o electroencefalografía (EEG) (82). Sin embargo, estas técnicas tienden a centrarse exclusivamente en el sueño nocturno, excluyendo episodios de sueño diurno como la siesta. Además, estas técnicas no permiten registrar de manera continuada las características del sueño durante más de un día o incluso semanas, lo cual es crucial para estudiar la siesta, su patrón diario y sus características tales como frecuencia, longitud y tipo. Para evaluar un patrón preciso de la siesta, sería aconsejable realizar las mediciones durante al menos 7 días consecutivos (34). La polisomnografía a

pesar de ser la técnica de referencia en el evaluación del sueño nocturno, su uso no parece aconsejable para el estudio de la siesta, ya que podría interferir con la rutina del sujeto y afectar el comportamiento de éste en relación a su actividad-reposo. Por lo tanto, para el estudio de la heredabilidad de la siesta es esencial utilizar una técnica diferente, que evite estos problemas y que permita medidas ambulatorias correctas y cómodas. El uso de técnicas cronobiológicas de temperatura, actimetría y posición, o de variables integradoras como el TAP, podría evitar estos problemas, ya que se basa en la utilización de sensores externos, y facilita la medición de varios días e incluso semanas. El uso de TAP (temperatura, actividad y posición), nos permitiría evaluar la siesta, sus horarios, su duración y su frecuencia durante al menos una semana, tiempo mínimo necesario para obtener variables circadianas de calidad.

La variable integradora TAP, puede ser útil para obtener patrones circadianos y parámetros rítmicos del ciclo de sueño-vigilia (51). Además, TAP ha sido validada como una medida apropiada para el estudio del sueño por su asociación con la polisomnografía y se considera una herramienta útil para el cribado preliminar de sujetos con sospecha de tener problemas de sueño y para detectar patologías circadianas del sueño (52).

2.2. Heredabilidad de los horarios de las comidas

Otro aspecto interesante a estudiar en cronobiología es la hora de la comida, ya que el cambio entre el ayuno y la ingesta es uno de los principales sincronizadores de nuestro sistema circadiano, en particular se sabe que la hora de la comida es capaz de cambiar la fase de relojes periféricos, tal y como se ha demostrado en estudios realizados en animales de experimentación (83, 84).

Además, el momento de la ingesta de alimentos es un aspecto novedoso a considerar en los estudios nutricionales actuales. Varios estudios han demostrado la relación entre el horario de la comida y varias enfermedades como las alteraciones

cardiovasculares, la obesidad y el síndrome metabólico (MetS) (22, 85, 86). En modelos animales se ha demostrado que una hora inusual de alimentación podría alterar el sistema circadiano, influyendo en la fisiología y fisiopatología del animal (83, 84).

Diversos aspectos como el cronotipo individual y hormonas circadianas como el cortisol, están relacionados con el momento de la ingesta de alimentos. Estudios anteriores han demostrado que la ingesta de alimentos afecta a la concentración de cortisol (en el plasma), la cual, después de las comidas, disminuye por la mañana (8:00h, 12:00h y 14:00h) y de madrugada (4:00h), pero no por la tarde-noche (87). También se ha demostrado que los individuos de tipo nocturno son más propensos a cenar tarde, y son por tanto comedores tardíos (86).

Uno podría pensar que el horario de la comida está determinado por factores puramente ambientales, determinados por los horarios de trabajo y el estilo de vida propio de cada cultura y país. Sin embargo, varios estudios han propuesto que también hay un componente genético en el horario de la comida que nos impulsa a comer o dormir temprano o tarde. En este sentido, un trabajo previo llevado a cabo por el grupo Garaulet M *et al.* (86) ha demostrado que algunas variantes genéticas como los SNPs presentes en algunos genes reloj como el *CLOCK* rs4580704 se asocian con el horario de la comida lo que parece indicar que no sólo hay componentes ambientales, sino también genéticos en el horario de las comidas. Sin embargo, los estudios sobre la heredabilidad de la hora de la comida son escasos, y no han sido estudiados en una población mediterránea, como la española que presenta horarios muy diferentes al resto de países europeos y americanos.

España es un país peculiar en la distribución del horario de las comidas. Los españoles estamos acostumbrados a comer y cenar tarde en comparación con otros países. La hora media en la que realizamos la comida principal del mediodía es alrededor

de las 3 de la tarde (15:00 h) (86), mientras que para la cena es alrededor de las 22:00 (88). Aunque hay factores culturales que pueden estar involucrados en esta ingesta tardía, la genética también puede estarlo, y por lo tanto, sería interesante evaluar en la población española si el momento de la ingesta de alimentos es un factor genético o ambiental. Entendemos que si los horarios de comida tienen un componente genético es presentaremos una mayor dificultad cuando tratemos de implantar nuevos programas de salud pública hacia el cambio de horarios de alimentación.

2.3. Modelos en gemelos en el estudio de la heredabilidad

Una vez entendida la importancia del estudio de la heredabilidad de la salud circadiana es necesario conocer cuáles son las metodologías que tenemos al alcance para alcanzar nuestro objetivo. Aunque no es el único método, clásicamente se han utilizado los estudios de gemelos para el análisis de la contribución relativa de los factores genéticos y ambientales en la conducta del individuo y en otros fenotipos. Estos estudios, permiten separar las causas genéticas de las ambientales en la similitud familiar (89) y, de esa manera, tratan de explicar cuál es la razón por la que personas emparentadas se parecen entre sí; y también cuál es el origen de las diferencias individuales. El razonamiento utilizado básicamente es el siguiente: los gemelos monocigóticos (MZ) proceden de un solo cigoto escindido en una fase muy temprana del desarrollo y, por tanto, son genéticamente iguales. Sin embargo, gemelos dicigóticos (DZ) proceden de dos cigotos independientes y, en consecuencia, su similitud genética es la misma, en promedio, que las de unos hermanos cualesquiera, con la salvedad de que comparten la vida intrauterina. Teniendo esto en cuenta, si los factores genéticos son importantes en un carácter determinado, las parejas de MZ deben de ser más similares entre sí que las parejas de DZ.

Así, en estos estudios se comparan las asociaciones o correlaciones entre pares MZ y DZ en relación a un fenotipo, por ejemplo, ser matutino o vespertino. Si la correlación es mayor entre hermanos MZ que entre DZ, se interpreta como una evidencia de que los factores genéticos influyen sobre la variable en estudio. Si, además, la correlación es más del doble en MZ que en DZ, se considera que existen factores genéticos de dominancia. En otro sentido, si la correlación entre DZ es más de la mitad de la correlación entre MZ, se interpreta como una prueba de la influencia de factores ambientales compartidos (90). Además, este tipo de prácticas se basa en la presunción de que el parecido debido a causas ambientales es aproximadamente el mismo para ambos tipos de gemelos (ambientes iguales), al ser criados en la misma familia y tiempo de forma general (91, 92).

Por tanto, toda esta información se puede utilizar para estimar la contribución relativa de cuatro fuentes de varianza diferentes que afectan a un fenotipo cualquiera (59). Estas cuatro fuentes de varianza se clasifican en:

- Influencias genéticas aditivas (**A**). Representa hasta qué punto los genotipos se transmiten de padres a hijos. Indica la contribución al fenotipo de la suma de los efectos de todos los alelos individuales que intervienen en dicho fenotipo.
- Efectos genéticos de dominancia (**D**). Incluye los efectos génicos sobre el fenotipo, que son producidos por las interacciones de alelos en un mismo *locus*. Habitualmente se incluye también aquí el efecto de las interacciones entre distintos pares génicos sobre el fenotipo (por ejemplo, los efectos epistáticos es decir, cuando la expresión de uno o más genes depende de la expresión de otro gen).
- Influencias ambientales compartidas (**C**). Influencias ambientales que actúan para hacer los gemelos similares.

- Influencias ambientales no compartidas (**E**). Influencias ambientales que actúan para hacer los gemelos diferentes dentro de un par (esta fuente de varianza también incorpora error).

Gracias a la estimación de estas cuatro fuentes de varianza, es cuando se puede empezar a hablar de heredabilidad. Ésta hace referencia a qué proporción de la varianza de un fenotipo es explicada por la varianza genética, es decir qué parte de las diferencias encontradas entre los sujetos de estudio en un determinado carácter es producto de diferencias genéticas entre ellos. Se puede hablar de dos tipos de heredabilidad:

- Heredabilidad en sentido amplio (\mathbf{H}^2), la cual resulta de la suma de los componentes aditivo (A) y dominante (D). $\rightarrow \mathbf{H}^2 : A+D$
- Heredabilidad en sentido estricto (\mathbf{h}^2), la cual se debe únicamente al componente aditivo (A). $\rightarrow \mathbf{h}^2 : A$

La estimación de la heredabilidad se podría conseguir comparando las correlaciones entre algunos tipos de familiares, como por ejemplo entre hermanos. De acuerdo con esto, su parecido o correlación (\mathbf{r}) tiene que deberse a su similitud familiar, teniendo en cuenta que al menos comparten el 50% de los genes ($1/2 h^2$), añadiendo además su similitud ambiental (c^2).

$$\mathbf{r}_{\text{hermanos}} = 1/2 h^2 + c^2$$

Teniendo en cuenta esta salvedad, en el caso de los gemelos MZ y DZ sería posible estimar los valores de las contribuciones relativas de los factores genéticos y ambientales para un carácter específico, siendo la correlación para los gemelos MZ de: $\mathbf{r}_{\text{MZ}} = h^2 + c^2$, con la salvedad de que comparten el 100% de sus genes, y para los gemelos DZ de: $\mathbf{r}_{\text{DZ}} = 1/2 h^2 + c^2$, ya que comparten al menos el 50% de sus genes, como hemos mencionado anteriormente. Por lo que:

$$\mathbf{r}_{\text{MZ}} - \mathbf{r}_{\text{DZ}} = h^2 - 1/2 h^2 + c^2 - c^2; \mathbf{r}_{\text{MZ}} - \mathbf{r}_{\text{DZ}} = 1/2 h^2$$

$$h^2 = 2 (r_{MZ} - r_{DZ})$$

Con esto queremos explicar cómo la heredabilidad en sentido estricto (h^2) se calcula como el doble de la diferencia entre las correlaciones observadas dentro de cada pareja de gemelos MZ y DZ. Con respecto a la influencia del ambiente compartido y no compartido, cabe decir que toda variación entre gemelos MZ tiene que deberse a fuentes de variación ambiental no compartida ya que, por definición, los gemelos MZ comparten el 100% de sus genes así como las influencias ambientales compartidas. Este tipo de modelos se basa en una serie de asunciones, como la escasa importancia de los efectos dominantes, la ausencia de epistasia (interacción entre genes), y que el ambiente compartido para los gemelos MZ es idéntico que para los DZ. Además, se asume que el genoma es exactamente igual entre los MZ y que los efectos epigenéticos (modificaciones celulares que se pueden heredar no relacionadas con cambios en la secuencia del ADN y que pueden ser modificadas por el ambiente) (93), no introducirán grandes variaciones entre ellos. Es decir, están sujetos a fuentes de error conocidas las cuales son muy difíciles de controlar, pero que se espera que influyan en escasa medida (94, 95).

Los especialistas en el estudio de gemelos han demostrado con creces que se puede determinar la magnitud de los efectos genéticos (aditivos y dominantes) y ambientales (compartidos y no compartidos), con esta información obtenida a través de los gemelos MZ y DZ. Cabe destacar que con estos datos, solamente se pueden estimar tres de las cuatro fuentes de varianza, por lo que es necesario buscar el modelo que mejor ajuste en cada caso. Así, el modelo genético más sencillo incluye el efecto genético aditivo, el ambiental compartido y el ambiental no compartido (modelo ACE), el cual debe de estar siempre porque incluye el error. En el caso de que se sospeche que el carácter estudiado está influenciado por factores genéticos dominantes (cuando la

correlación de los MZ es más del doble de la correlación de los DZ, que implicaría que los efectos genéticos dominantes juegan un papel importante en dicho rasgo) habría que desestimar la influencia ambiental compartida (modelo ADE).

2.4. Estudios genéticos de poblaciones y definición de nutrigenética: *MTNR1B*

A parte de los modelos de heredabilidad basados en gemelos, actualmente en genética se realizan estudios para determinar las asociaciones entre genes específicos o variantes génicas con fenotipos particulares asociados a enfermedad, como el grado de obesidad, la presencia de diabetes, hipertensión, riesgo cardiovascular, cáncer y otras patologías de la sociedad actual. Además, estos estudios se hacen en grandes poblaciones denominados *GWAs* (Genome-Wide Association Study) o estudios de asociación del genoma completo. Los *GWAs* consisten en el uso de grandes poblaciones para el análisis de un millón o más marcadores genéticos (polimorfismos de un solo nucleótido) distribuidos a lo largo del genoma (96). Estos estudios están diseñados con el objetivo de identificar las diferentes asociaciones genéticas relacionadas con fenotipos observables (92), para ello se usa la tecnología del genotipado, que analiza cientos de miles de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), y permite estimar la contribución de la genética a enfermedades comunes (97). Se necesitan dos tipos de poblaciones para estos estudios: personas con la enfermedad y personas similares sin la enfermedad. Se considera que si determinadas variaciones genéticas son más frecuentes en las personas con la enfermedad, se dice que estas variantes génicas están “asociadas” con dicha enfermedad.

En este sentido, un *GWAs* realizado en el año 2009 identificó un polimorfismo en el gen que codifica el receptor 1B de melatonina (*MTNR1B*) rs10830963 como una variante de riesgo para la diabetes tipo 2 (DT2) (98, 99). El *MTNR1B* tiene una variación genética común que consiste en un cambio en una sola base nucleica o SNP en la

posición rs10830963 (MAF: 30%) que clasifica a la población en homocigóticos portadores del alelo de riesgo GG, en heterocigóticos portadores del alelo de riesgo CG, y en homocigóticos no portadores CC. Este SNP en el *MTNR1B* se ha asociado con uno de los efectos más fuertes sobre el índice de disposición oral (el producto de la secreción de insulina y la sensibilidad a la insulina) en más de 90 variantes genéticas comunes identificadas para la DT2 (100-102). Si bien este hallazgo generó mucha excitación con respecto al vínculo entre el sueño, los ritmos circadianos y el metabolismo de la glucosa, el mecanismo subyacente de su asociación está empezando a definirse, por lo que el camino hacia la aplicación clínica no está claro (102-104). Además, el impacto funcional de esta variante del *MTNR1B* en la fisiología metabólica no se conoce todavía, ya que las determinaciones de glucosa se suelen realizar por la mañana en ayunas, cuando los valores de melatonina están muy bajos y, por tanto, se hacen en ausencia del ligando del receptor.

La nutrigenética es el estudio de la interacción de los aspectos ambientales relacionados con la nutrición, como podría ser “qué”, “cómo” o “cuándo” se come y un polimorfismo determinado, para una enfermedad. Un ejemplo claro sería la interacción entre la hora de la comida y el SNP del *MTNR1B* rs10830963 para el riesgo de la diabetes tipo 2. El hábito de comer durante la noche es cada vez es más frecuente en la sociedad actual, debido al modelo de trabajo de 24h/7días, es decir en el que las empresas dan servicio durante 24h al día, los 7 días de la semana, y es propio de ciertas poblaciones como son los trabajadores por turnos (105). Los españoles, debido al hábito que tenemos de cenar tarde, somos población de riesgo: un porcentaje elevado de la población cena durante las dos horas y media antes de ir a la cama, por lo que se nos considera como cenadores nocturnos naturales.

Un estudio a gran escala en más de sesenta mil personas ha demostrado que comer por la noche se asocia con un aumento de glucemia (hiperglucemia), independientemente de otros factores tales como el grado de obesidad (106). Sin embargo, todavía se desconoce la causa de esta disminución de la tolerancia a la glucosa durante el consumo nocturno de alimentos.

Aunque son muchos los factores que pueden estar involucrados (107, 108), estudios previos apoyan la hipótesis de que la ingesta de alimentos coincidiendo con altos valores de melatonina puede conducir a un deterioro de la tolerancia a la glucosa. De hecho, nuestro equipo de investigación y otros, han demostrado que la administración exógena de melatonina, en concentraciones supra-fisiológicas, disminuye la tolerancia a la glucosa tanto en mujeres mayores (109) como en mujeres jóvenes (110). Sin embargo, hasta la fecha no se conoce la influencia de la melatonina endógena, a concentraciones fisiológicas, sobre la tolerancia a la glucosa.

Para entender el porqué esta variante génica *MTNR1B* rs10830963 se asocia con el riesgo de padecer Diabetes Mellitus tipo 2, anteriormente se desarrolló un estudio por nuestro grupo controlado con placebo para investigar si la administración exógena de melatonina (5 mg) presentaba un efecto diferente sobre la tolerancia a la glucosa en sujetos portadores de la variante de riesgo (G) del *MTNR1B*, que en los no portadores. Nuestros resultados mostraron que la administración de melatonina disminuía la tolerancia a la glucosa especialmente en aquellos sujetos que presentaban la variante de riesgo G, mientras que en los no portadores no se observó ningún efecto (111). Estos resultados se han replicado recientemente mediante otro grupo de investigación, que obtiene resultados semejante incluso tras de la administración crónica de melatonina (102). Sin embargo, todos estos estudios se han realizado tras administrar melatonina, lo que lleva a concentraciones supra-fisiológicas que no representan la situación habitual del

individuo, por lo que los resultados de estos estudios solamente son de utilidad para 1) tratar de entender el mecanismo de acción de la melatonina, y su efecto diferencial en función de la variante génica en su receptor; 2) para estudiar aquellos individuos que son tratados con melatonina exógena. Sin embargo, hacen falta estudios en los que se analice la concurrencia de valores elevados de melatonina endógena y glucosa, como es el caso de cenadores tardíos, que suelen comer durante las dos horas antes de comenzar el sueño, con lo que ingieren carbohidratos en presencia de valores altos de melatonina, ya que ésta hormona comienza su incremento en sangre aproximadamente dos horas antes de ir dormir. La hipótesis es que comer con melatonina elevada, produce alteraciones en el metabolismo de insulina (menor secreción o una menor sensibilidad a la insulina) lo que daría lugar a una disminución de la tolerancia a la glucosa sobre todo en aquellos portadores de la variante de riesgo G en *MTNR1B* rs10830963, en los que el receptor de melatonina presenta una función exacerbada, y que son un 51% de la población europea.

OBJETIVOS

Estado actual

Los estudios realizados sobre la heredabilidad del sistema circadiano se han abordado de forma *subjetiva* mediante cuestionarios o registros semanales de sueño y comida. Sin embargo, hacen falta estudios *objetivos* sobre la heredabilidad de otros parámetros cronobiológicos relevantes, como la fase, la amplitud, la estabilidad o la fragmentación, característicos todos de un ritmo circadiano saludable. Este análisis objetivo se puede realizar mediante el análisis de: a) variables como la temperatura corporal, la actividad, la posición corporal, o una combinación de ellos (TAP); b) ritmos circadianos de hormonas como el cortisol y la melatonina; c) características del sueño; d) horarios de comida. Además, se pueden estudiar variantes génicas individuales, implicadas en la salud del sistema circadiano, y su posible asociación con ciertos fenotipos de interés.

Uno de los objetivos de los *estudios clásicos de gemelas* ha sido el estudio de la heredabilidad del sueño generalmente analizado por polisomnografía. Aunque esta técnica es considerada la técnica por excelencia, no permite determinar la estabilidad del sueño a lo largo de varios días, ni estudiar la siesta o el sueño diurno (hábito característico de nuestra región mediterránea). Para ello, se requiere del uso de técnicas que se puedan utilizar de manera continua durante al menos 7 días. En esta tesis doctoral, proponemos el TAP (temperatura, actividad y posición) como una técnica novedosa para el análisis de la heredabilidad de la salud circadiana y de los ritmos de sueño-vigilia.

Por otro lado, se sabe que la hora a la que comemos es un sincronizador de nuestros relojes periféricos. Sin embargo, no se conoce el grado de heredabilidad de este factor, y de otras variables relacionadas con él como son el cortisol, los horarios de sueño o el cronotipo.

Aunque el GWAs realizado en 2.009 identificó un SNP del receptor de melatonina 1B como variante génica de riesgo para la diabetes mellitus tipo 2, no hay estudios claros que demuestren si existe una interacción entre la concurrencia de las concentraciones fisiológicas de melatonina y la ingesta de alimentos sobre la tolerancia a la glucosa en los portadores de la variante de riesgo G.

Objetivo general

En base a lo expuesto en el estado actual, nuestro objetivo principal es el estudio de las influencias genéticas y ambientales en la salud del sistema circadiano, el patrón de sueño-vigilia y el horario de la comida. De igual modo, pretendemos estudiar si una variante génica relacionada con el sistema circadiano, cómo es el caso de *MTNR1B* rs10830963, se relaciona con una intolerancia al metabolismo de la glucosa, factor de riesgo de diabetes, sobre todo cuando existe una concurrencia entre valores elevados de melatonina e ingesta.

Objetivos específicos

Objetivo 1: Analizar las influencias genéticas y ambientales sobre la salud del sistema circadiano mediante la medición continua de la temperatura en la muñeca.

Objetivo 2: Utilizar procedimientos multiparamétricos como la variable integrada de temperatura, actividad y posición (TAP) para la medición de las influencias genéticas y ambientales sobre la salud del sistema circadiano.

Objetivo 3: Determinar las influencias genéticas y ambientales del patrón sueño-vigilia y sus diferentes parámetros cómo son la siesta y el sueño nocturno, medidos de forma continua a través de una variable integrada (TAP). Así cómo la posible relación entre el sueño diurno y las medidas antropométricas relacionadas con la obesidad.

Objetivo 4: Evaluar las influencias genéticas y ambientales de factores relacionados con la hora de la comida en una población mediterránea de gemelas.

Objetivo 5: Estudiar si la variante génica del receptor 1 de melatonina (*MTNR1B* rs10830963) relacionada con el sistema circadiano presenta un impacto sobre el metabolismo de la glucosa, en especial cuando existe coincidencia en el tiempo entre melatonina e ingesta.

MATERIAL Y MÉTODOS

1) Poblaciones de estudio

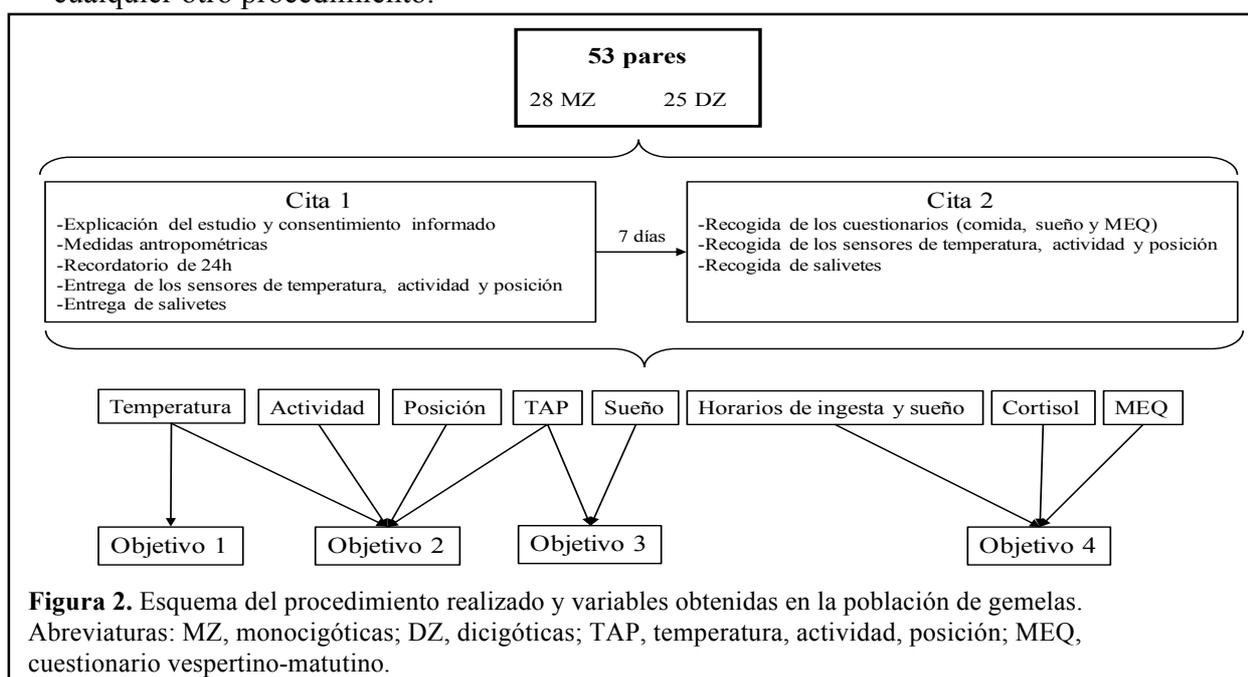
-Población de gemelas (objetivos 1-4). Para llevar a cabo los objetivos relacionados con la heredabilidad de la salud del sistema circadiano (objetivos 1-4), se seleccionó una muestra de mujeres gemelas adultas del registro de gemelas de Murcia (MTR) (112, 113). El MTR ha sido aprobado por el comité bioético de la Universidad de Murcia y sigue las normas nacionales en materia de protección de datos personales. Durante esta investigación se siguieron las regulaciones institucionales y gubernamentales aplicables sobre el uso ético de los voluntarios humanos. La muestra seleccionada para este estudio constaba de 53 pares de gemelas: 28 pares fueron monozigóticas (MZ) y 25 pares fueron dizigóticas (DZ) (**tabla 1**, ver en anexos). La edad media de las participantes fue de 52 años (SD: 6,03; Rango: 46-69). Todas las mujeres procedían de la misma área geográfica (alrededor de unos 30 Km del centro de investigación). La zigosidad fue determinada por un test de ADN. Los criterios de exclusión incluían los diagnósticos de desordenes cognitivos, diabetes mellitus, enfermedad renal crónica, enfermedad hepática o cáncer.

-Población ONTIME-DINE (objetivo 5). Para llevar a cabo el objetivo sobre el impacto de una variante del gen *MTNR1B* en enfermedades asociadas con la cronodisrupción como la diabetes, se dio de alta la población ONTIME-DINE (Número de Clinical Trial: NCT03003936). Esta población constaba de 40 mujeres con sobrepeso/obesidad ($IMC > 25 \text{ kg/m}^2$) de ascendencia europea que eran comedoras tardías habituales (aquellas que no dejan al menos 2:30 h entre la cena y la hora habitual de irse a la cama), incluyendo 20 homocigóticas portadoras del alelo de riesgo GG y 20 homocigóticas portadoras de CC para *MTNR1B* rs10830963 (**tabla 2**, ver en anexos). Las 20 portadoras GG se seleccionaron a partir de una base de datos previamente establecida (n=94) (ONTIME, NCT02829619) mientras que las portadoras de CC (n=20) fueron seleccionadas como controles para coincidir en los parámetros de edad, obesidad y síndrome metabólico

(**tabla 2**, ver en anexos). Los criterios de exclusión fueron: tener una dieta especial, estar bajo tratamiento con medicamentos para bajar de peso, usar medicamentos para dormir o melatonina, o diagnósticos de diabetes mellitus, insuficiencia renal crónica, enfermedades hepáticas o cáncer. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de cada paciente conforme lo establecido en la Declaración de Helsinki de Estudios Humanos y aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Murcia (UMU, Murcia).

2) Procedimientos y diseño experimental de los estudios

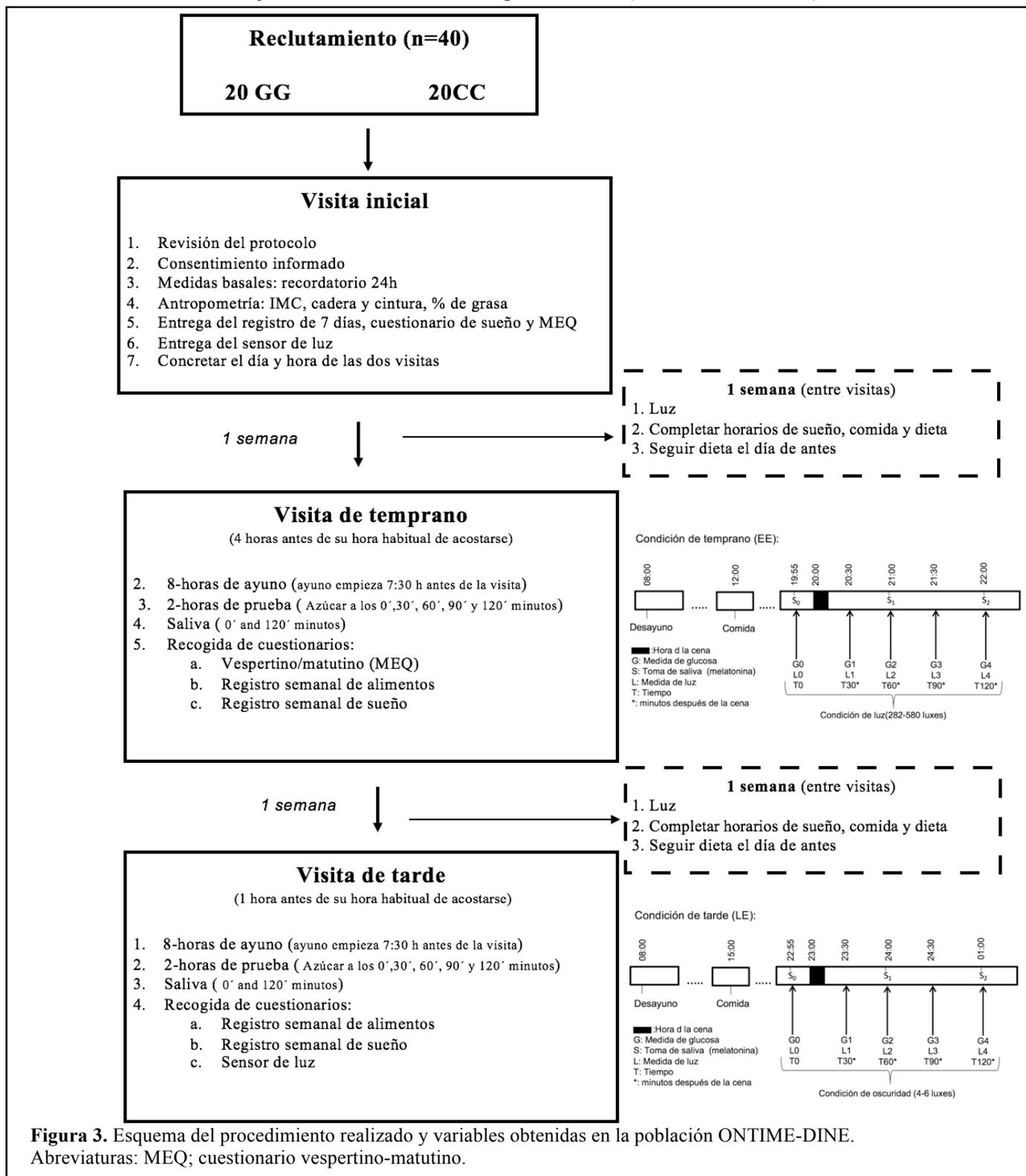
-Heredabilidad de la salud del sistema circadiano (población de gemelas). Los datos analizados en la población para el estudio de la heredabilidad de la salud del sistema circadiano fueron recolectados entre diciembre del 2012 y marzo del 2013. Una carta informativa se envió a las mujeres seleccionadas. Más tarde, una llamada telefónica confirmó su disponibilidad, la ausencia de cualquier criterio de exclusión y su voluntad de participar. La participación fue completamente voluntaria. Los sujetos fueron organizados en grupos de 4-5 parejas, y se les dio una cita en un centro universitario situado en la ciudad de Murcia, donde el consentimiento informado fue firmado antes de cualquier otro procedimiento.



-Impacto del MTNR1B en enfermedades asociadas con la cronodisrupción como la diabetes (población ONTIME-DINE). En primer lugar, los sujetos fueron contactados a través de una llamada telefónica en la que se les informó sobre el estudio y se concertó una cita personal en los centros de nutrición Garaulet. Posteriormente, durante el encuentro personal en el centro de nutrición, se dio una explicación más detallada del estudio experimental y se obtuvo el consentimiento informado por escrito, después del cual se establecieron las fechas de la intervención y se realizaron medidas antropométricas y de presión arterial. En los dos días de la intervención, se realizaron las pruebas de tolerancia a la glucosa de 2 h, la recogida de muestras de saliva y la medición de luz en las casas de las participantes del estudio.

Se utilizó un diseño de estudio cruzado y aleatorizado. Los participantes fueron examinados en dos condiciones de horario de cena diferentes: a) Cenar tarde (LE: “Late Eating”): 1 hora antes de su hora habitual de ir a la cama, con la cena aproximadamente a partir de las 23:00 h; b) Cenar pronto (EE: “Early Eating”): 4 horas antes de la hora habitual de ir la cama, con la cena aproximadamente a partir de las 20:00 h. La aleatorización fue realizada por el personal de la Universidad de Murcia con un tamaño de bloque 2, usando un diseño equilibrado a través de un software ejecutado por un ordenador (<http://www.randomization.com>). Los valores de glucosa en sangre se determinaron por un glucómetro justo antes de la cena (T0’) y a los 30’, 60’, 90’ y 120’ minutos después del comienzo de la misma. Se recogieron muestras de saliva cada hora (justo antes de cenar (T0’), y a los 60’ y 120’ minutos después del comienzo de la misma) para la evaluación de las concentraciones de melatonina salival. La exposición a la luz se midió usando un sensor de temperatura/luz UA-002-64 (Onset Computer, Bourne, MA, EE,UU) situado en una cadena en el cuello lo más cerca posible de los ojos. Los participantes fueron estudiados en su ambiente natural (sus hogares) en las dos

condiciones de cena con un período de lavado de 6 días entre visitas, es decir, el mismo día de la semana en dos semanas consecutivas (**tabla 3**, ver anexos). Como se esperaba, en los dos días del experimento, los valores de melatonina eran más altos y la intensidad de luz era más baja en la condición de LE que en la EE (tabla 3, ver anexos).



Por otra parte, durante la semana anterior a cada experimento no se encontraron diferencias significativas en la ingesta de alimentos y el horario de sueño entre la condición de comer temprano y la de comer tarde. Del mismo modo, en el día del experimento, el tiempo de sueño y de ingesta de alimentos fue el mismo en las dos condiciones (EE y LE). Sin embargo, el inicio de la comida y de la cena fue modificado en función del estudio para mantener la misma duración de ayuno (8h) antes de la cena en ambas condiciones.

3) Características generales de las poblaciones estudiadas

a) Parámetros de obesidad y síndrome metabólico (MetS)

Las mediciones antropométricas se obtuvieron al comienzo de la cita a la misma hora del día. El peso corporal se determinó en los sujetos descalzos que llevaban ropa ligera usando una escala digital con precisión de 0,1 Kg. La altura se determinó usando un estadiómetro portátil (rango 0,14-2,10). Los sujetos se midieron en posición vertical, relajados y con la cabeza en el plano de Frankfort. Estos datos se utilizaron para calcular el Índice de Masa Corporal (IMC) de acuerdo con la fórmula: peso (Kg) /altura (m²). La grasa corporal total se determinó por impedancia bioeléctrica, utilizando el equipo TANITA TBF-300 (Tanita Corporación de América, Arlington Heights, IL, EEUU). La distribución de la grasa corporal se determinó mediante el índice cintura-cadera: la cintura se midió a nivel del ombligo y la cadera en el máximo perímetro (114).

Específicamente en la población ONTIME-DINE se determinaron los valores de triglicéridos (TG), colesterol y glucosa mediante análisis químico automatizado (Analizador químico ILAB 600 en el laboratorio de instrumentación). El HDL-C se midió después de la precipitación de lipoproteínas que contienen apoB con sulfato de dextrano y magnesio. El índice de resistencia a la insulina (HOMA) se calculó con la fórmula aceptada: $HOMA = \text{glucosa en ayunas (mmol/l)} \times \text{insulina en ayunas (mIU/l)} / 22,5$. Para

determinar la presencia o ausencia de MetS, se aplicó la definición propuesta por la Federación Internacional de Diabetes (115, 116). Se calculó un valor de MetS para cada participante sumando una unidad para cada uno de los componentes de MetS (circunferencia de cintura, glucosa en ayunas, triglicéridos, HDL-C y presión arterial sistólica o diastólica) con un valor máximo de 5 puntos (tabla 2, ver anexos).

b) Evaluación del cronotipo

Las mujeres también completaron el cuestionario de matutinidad/vespertinidad (MEQ) de 19 preguntas de Horne & Ostberg (57). Se consideraban sujetos de tipo vespertino aquellos que obtuvieron una puntuación por debajo de 41, y de tipo matutino aquellos cuya puntuación estuvo por encima de 59. Todos los sujetos dentro del rango entre 42-58 fueron clasificados de tipo indefinido (117).

c) Evaluación de la dieta y características del sueño

El día de la cita las participantes cumplieron el recordatorio de 24h, que se utilizó para enseñar a las participantes cómo apuntar las ingestas, sus cantidades y horarios. Posteriormente, las participantes realizaron un registro continuo de siete días en caso de la población de gemelas, y de catorce días (cada semana previa a cada condición) en el caso de la población ONTIME-DINE (**tabla 4**, ver anexos)..

Las participantes también aprendieron a cumplimentar un diario de sueño diseñado por el Laboratorio de Cronobiología de la Universidad de Murcia (34), el cual incluía información sobre cuando se iban a la cama, el momento en que se despertaban y la duración del sueño (tabla 4, ver anexos). Estas preguntas eran para el sueño nocturno, así como para el sueño diurno o siesta.

Condiciones dietéticas de la población ONTIME-DINE. Durante al menos cuatro días antes de cada día experimental, se les indicó a los participantes que siguieran su ingesta dietética habitual. En los días del experimento, a cada participante se le

proporcionó una cena con un alto índice glucémico en ambas condiciones la de cenar temprano (Early Eating; EE) y la de cenar tarde (Late Eating; LE). Esta cena consistía en un bote de ravioli con salsa de tomate y una pieza de melocotón (Hero, S,A, Murcia, España) con una composición nutricional de 58-60% de carbohidratos, 15-17% de proteínas y 25-27% de grasas. El contenido de energía de esta cena representó del 30 al 35% de la ingesta energética total del día para cada participante. En ambas condiciones de cenar temprano o tarde, las participantes consumieron los mismos alimentos tanto para el desayuno, el almuerzo y la cena. La comida principal del mediodía, fue rica en proteínas y baja en carbohidratos con un contenido total de energía de 650 Kcal y comenzó 8 horas antes de la cena para asegurar la misma duración de ayuno antes del inicio del experimento en ambas condiciones de cena temprana o tardía.

4) Hormonas circadianas

Cortisol. Las muestras de saliva para el cortisol se recogieron en la población de gemelas utilizando el sistema de Salivette (Sarstedt, Barcelona, España) (118). Las muestras de cortisol salival se recogieron a las 09:00 h de la mañana, antes de la comida del mediodía alrededor de las 14:00 h y antes de acostarse sobre las 23:00 h. Dichos salivetes se centrifugaron para la obtención de saliva, la cual se repartió en alícuotas de 500 µl en criotubos para su posterior congelación y almacenamiento a -80°C hasta su análisis. Las concentraciones salivales de cortisol se midieron mediante radioinmunoensayo (RIA) (IZASA, Barcelona, España). El límite inferior de detección de cortisol en la saliva fue de 0,2 nmol/l. El coeficiente de variación intra e inter-ensayo fue 4,0% por encima de 0,4 nmol/l y 10,0% para los valores inferiores.

Melatonina. Las muestras de saliva para la melatonina se recogieron en la población ONTIME-DINE durante los dos días experimentales de la condición de cenar pronto y tarde, utilizando el sistema Salivette (Sarstedt, Barcelona, España). Dichas

muestras se recolectaron justo antes de comenzar la cena (hora 0') y cada hora después del inicio de la misma, durante 2 horas (tiempo 60' y tiempo 120'). Las muestras de saliva se centrifugaron y se repartieron en alícuotas de 500 μ l en criotubos para su posterior congelación y almacenamiento a -80°C hasta su análisis. Las concentraciones de melatonina salival se midieron mediante radioinmunoensayo (RIA) (IBL, Alemania). La precisión intra e inter-ensayo fue de 6,7% y 10,4%, respectivamente.

5) Evaluación de la salud del sistema circadiano

El registro de las diferentes variables cronobiológicas, solamente se realizó en la *población de gemelas* para llevar a cabo los objetivos sobre la evaluación de la heredabilidad del sistema circadiano. Para ello, se les entregó un dispositivo en forma de reloj, el cual incluía un sensor de temperatura y un actímetro en forma de brazalete.

-Medición de la ritmicidad de la temperatura de la muñeca. El ritmo de la temperatura de la muñeca se evaluó durante 7 días de forma continua usando un sensor de temperatura (Thermochron iButton DS1921H, Dallas, Maxim, Dallas, TX, EE,UU) con una sensibilidad de $0,125^{\circ}\text{C}$ que se programó para recopilar información cada 10 min. Se unió a un tipo de brazalete que simulaba un reloj, el cual se colocó en la muñeca sobre la arteria radial de la mano no dominante, como se describió previamente por Sarabia *et al*, (34). La información almacenada en el iButton se transfirió a través de un adaptador (DS1402D-DR8, Dallas, Maxim) a un ordenador personal utilizando iButton Viewer v. 3,22 (software Semiconductor Maxim de Dallas suministrado por el fabricante). Los datos se recolectaron durante el período de diciembre de 2012 a marzo de 2013, con temperaturas ambientales de $12,53\pm 1,68^{\circ}\text{C}$ (datos obtenidos del Centro de Estadística de Murcia, España) para minimizar la influencia de altas temperaturas ambientales en las lecturas de la temperatura de la muñeca.

-Medición de la ritmicidad de la posición corporal y ritmo de actividad de reposo. Los ritmos de posición corporal y de actividad de reposo se evaluaron durante los mismos 7 días. Para ello, se utilizó un sensor de datos de aceleración HOBO Pendant UA UA-004-64 (Onset Computer, Bourne, MA, EE.UU) que estaba programado para registrar datos cada minuto y colocado en el brazo no dominante por medio de una banda elástica, con su eje X paralelo al húmero. La información almacenada en el actímetro se transfirió a través de un adaptador óptico USB (MAN-BASE-U-4, HOBO, Onset Computer) a un ordenador personal utilizando el software proporcionado por el fabricante (HOBOWare v. 2,2). A partir de la información proporcionada por el actímetro se definieron dos variables: actividad motora (A) y posición corporal (P). En primer lugar, A se calculó como grados de cambio en la posición de los ejes X, Y y Z con respecto al tiempo de muestreo anterior, tal como se describe por Ortiz-Tudela *et al*, (51). En segundo lugar, P se calculó como el ángulo entre el eje X del actímetro y el plano horizontal, siendo el valor 0° cuando el brazo estaba en posición horizontal y 90° cuando estaba alineado verticalmente (51).

-Medición de la ritmicidad de la variable integrada de temperatura, actividad y posición (TAP) y del sueño. Las medidas de la temperatura de la muñeca, la actividad motora y la posición del cuerpo fueron finalmente integradas en una variable llamada TAP (51) según el software de Circadianware implementado en la plataforma de Kronowizard (<https://kronowizard.um.es/>). Para calcular la variable integrada TAP, primero se normalizaron las variables de temperatura, actividad y posición calculando los percentiles 95 y 5 para cada variable. Los valores de temperatura de la muñeca se invirtieron ya que los valores de actividad y posición eran opuestos, de modo que los valores máximos para las tres variables concurren a la misma hora del día. Luego se calculó la media de las 3 variables normalizadas, donde 0 correspondía al reposo

completo y sueño, y 1 a períodos de alta excitación y movimiento. Para una descripción detallada del procedimiento, véase (Ortiz-Tudela *et al*, 2010) (51). En un paso posterior se calculó un umbral individualizado a partir de la distribución de frecuencias del TAP, para el análisis individualizado de los patrones de sueño.

-Medición de la luz. La exposición a la luz se midió únicamente en las mujeres de la población *ONTIME-DINE*. Dicho registro se realizó cada 30 minutos empezando media hora antes de la cena y hasta 2 horas después del inicio de la misma con un sensor de temperatura/luz de HOBO UA-002-64 (Onset Computer, Bourne, MA, EE.UU) situado en un cadena en el cuello lo mas cerca posible de los ojos. El día de la cita personal, las participantes fueron instruidas para evitar la exposición a la luz brillante (intensidades de luz por encima de 25 lux) en la condición de cenar tarde, mientras que en la condición de cenar pronto los participantes debía de estar expuestas a su luz habitual en el hogar (300-500 lux).

5.1. Parámetros obtenidos del estudio de ritmos circadianos

Los parámetros de temperatura, actividad, posición, TAP y sueño se obtuvieron utilizando el paquete integrado "Circadianware" (Laboratorio de Cronobiología, Universidad de Murcia, España, 2010). Los datos rítmicos se procesaron primero para eliminar mediciones erróneas, como las producidas por la eliminación temporal del sensor en el momento de la ducha. Para caracterizar las variables circadianas se calcularon los siguientes parámetros utilizando métodos paramétricos y no paramétricos en los siete días de medición.

a) Parámetros obtenidos a través del análisis de Cosinor:

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

-*Amplitud*: diferencia entre el valor máximo (o mínimo) de la función coseno y el mesor.

-*Acrofase*: sincronización del valor máximo de la función coseno.

-*Rayleigh test*: evalúa la distribución de la acrofase dentro de un período de 24 horas.

Esta prueba proporciona un vector r con su origen en el centro de una circunferencia de radio uno. La longitud del vector r (entre 0 y 1) es proporcional al grado de homogeneidad de fase durante el período analizado y puede considerarse como una medida de la estabilidad de fase del ritmo durante los 7 días sucesivos.

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

-*Análisis de Fourier*: con estos análisis se calculó la potencia del primer armónico (P1) como una potencia espectral del ritmo de 24 h y la potencia del segundo armónico (P2) que muestra la subida postprandial de la temperatura.

b) Parámetros obtenidos mediante análisis no paramétrico (119)

- *Estabilidad interdiaria* (IS): regularidad del ritmo. Sus valores oscilan entre 0 y 1. Cuanto más se acerque al valor 1 el ritmo presenta una estabilidad perfecta, es decir se repite exactamente día tras día.

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

- *Amplitud relativa* (RA): diferencia entre el promedio de las mediciones hechas durante las 5 horas consecutivas de máximos valores de sueño (M5) y la media de las mediciones hechas durante las 10 horas consecutivas con el mínimo sueño (L10), dividido por la suma de ambos valores (M5+L10).

- *Índice de funcionalidad circadiana* (CFI): índice numérico que determina la robustez circadiana basada en tres parámetros circadianos: estabilidad interdiaria, variabilidad

intradiaria y la amplitud relativa (51). Los valores de variabilidad intradiaria fueron invertidos y normalizados entre 0 y 1, siendo 1 una senoide perfecta. Por último, el CFI se calculó como el promedio de estos 3 parámetros realizados por el software "Circadianware". En consecuencia, CFI oscila entre 0 (ausencia de ritmicidad circadiana) y 1 (ritmo circadiano robusto).

c) Parámetros de sueño obtenidos a partir del software registrado (Circadianware ®):

-Duración del sueño nocturno: duración del sueño durante la noche de 21:00h a 11:00h.

-Duración del sueño diurno: minutos de sueño diurno de 12:00h a 20:00h.

-Duración del sueño total: duración total del sueño durante 24 horas.

-Profundidad de sueño (%): índice de profundidad del sueño, determinado como la diferencia entre 1 y las 5 horas de mínimos valores del TAP. La profundidad del sueño muestra sus valores más altos cuando los valores de TAP son más bajos. Se expresa en tanto por ciento.

La siesta fue registrada como una variable categórica (Sí / No). Los sujetos que proporcionaron información diaria sobre la siesta (hora de inicio y finalización) durante 1 o más días en una semana fueron considerados como dormidores de siesta, codificados como "Sí", el resto fueron codificados como "No".

La duración de la siesta (es decir, el sueño diurno) se obtuvo de los registros de TAP seleccionando y promediando los minutos de sueño registrados entre las 14:00h y las 19:00 h de los 7 días consecutivos.

6) Medidas de los valores de glucosa capilar

Se obtuvieron perfiles de glucosa de 2h después de cenas idénticas en la población *ONTIME-MT*. La glucosa se determinó en ambos días, justo antes de la cena (hora 0') y cada 30 minutos después del comienzo de la misma (tiempo 30', 60', 90 y 120'). El área

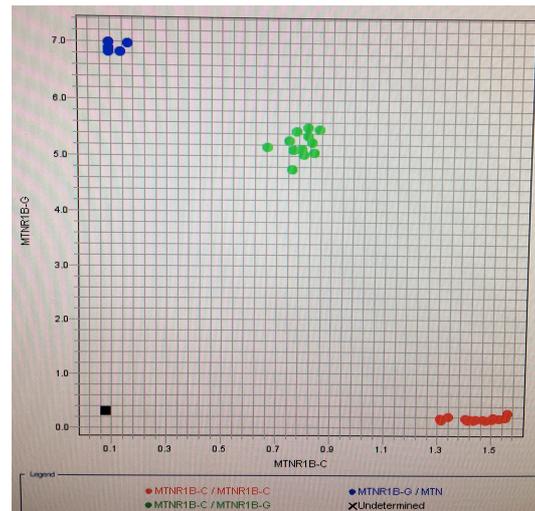
bajo la curva con respecto a la base (AUC) para la glucosa, se calculó con el método trapezoidal (21). Se determinó la concentración de glucosa en sangre total con GlucoMen®LX Plus (Menarini Diagnósticos S,A, Barcelona, España) que utiliza tiras reactivas para medir la glucosa.

7) Aislamiento del ADN y genotipado del *MNTR1B*

Se aisló el ADN de las mujeres de la población *ONTIME-MT* a partir de muestras de sangre usando el procedimiento estándar (Qiagen, Valencia, CA, USA). El genotipado del polimorfismo del gen *MTNR1B* se realizó mediante el método TaqMan® con sondas específicas de los alelos, en el sistema de detección de secuencias ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE,UU) de acuerdo con protocolos estandarizados de laboratorio (120).

Los sistemas de PCR que utilizan las sondas TaqMan® aprovechan la actividad 5' nucleasa de la ADN polimerasa. La sonda TaqMan® consta de un oligonucleótido específico, con un fluorocromo en el extremo 5' (reporter) y en el extremo 3' tiene otra tinción que evita que el fluorocromo emita la fluorescencia cuando están cerca (quencher). Posteriormente, la sonda se corta gracias a la actividad 5' nucleasa de la ADN polimerasa, con lo que se separan el "reporter" y el "quencher", y el fluorocromo emite fluorescencia. Este proceso se va repitiendo conforme avanza la PCR obteniéndose un incremento de la fluorescencia, la cual es proporcional a la cantidad de ARNm mensajero del gen (121). Así, se obtiene una nube de puntos reflejando el nucleótido específico de cada persona (**figura 4**).

Figura 4. Representación de las tres variantes genéticas diferentes que se pueden presentar en el polimorfismo del *MTNR1B*. En color azul se representan los portadores homocigóticos del alelo de riesgo (GG). En color rojo los homocigóticos no portadores del alelo de riesgo (CC), y en verde los heterocigóticos portadores del alelo de riesgo (CG).



8) Análisis estadísticos

Población de gemelas

La preparación de datos y los análisis descriptivos se realizaron en SPSS v.15,0 (SPSS, 2010). Para evaluar las diferencias estadísticas entre los grupos de zigosidad en las medidas antropométricas, Matutinidad/Vespertinidad y las características del sueño, se utilizó la prueba *t* de Student.

Análisis genético: Los índices de actividad, posición, TAP y sueño que no se ajustaron a la normalidad se normalizaron mediante un procedimiento *rankit* anterior a los análisis (122). Los valores atípicos se excluyeron del análisis usando tres veces el intervalo inter-cuartil como referencia. Los supuestos básicos del diseño de gemelos (es decir, medias y varianzas iguales para gemelos MZ y DZ, así como para orden dentro de cada par) y los posibles efectos de la edad se probaron comparando los modelos emparejados con modelos saturados. No se observaron diferencias significativas de media o de varianza entre gemelos en un par o entre grupos de cigosidad. El efecto de la edad no fue relevante en ningún caso, y podía ser eliminado de los modelos sin pérdida significativa de ajuste.

A continuación, probamos si las correlaciones entre pares de MZ eran superiores a las correlaciones entre pares de DZ, lo que sugeriría una influencia genética en las

diferencias individuales para la medida. Luego, las influencias genéticas sobre las diferencias individuales en los parámetros de las diferentes variables se estimaron mediante el ajuste de un modelo de ecuaciones estructurales (SEM), en el que la varianza fenotípica observada se descompone en sus componentes genéticos y ambientales (123).

Cabe destacar que la mayoría de los parámetros obtenidos de las diferentes variables eran de naturaleza continua, pero la siesta se definió como una variable categórica. Se analizó como tal utilizando un modelo de umbral de probabilidad. Para aplicar modelos genéticos de componentes de varianza a datos de gemelos categóricos, se supone que las categorías reflejan una medida imprecisa de una distribución normal subyacente de probabilidad, que tendría uno o más umbrales para discriminar entre las categorías. Esta probabilidad puede estar influenciada por factores genéticos y ambientales y se distribuye normalmente con un valor medio de 0 y una varianza de 1. La similitud entre gemelos puede estimarse mediante la correlación para la escala de probabilidad, llamada correlación tetracórica.

Las correlaciones observadas entre gemelos MZ y DZ reflejan generalmente una combinación de factores genéticos aditivos (A, es decir, efectos alélicos sumados a través de múltiples genes) y factores genéticos no aditivos (D, es decir, dominancia genética, posiblemente incluyendo epistasia); Así como los factores ambientales compartidos (C, es decir, entorno común / familiar) e individuales (E, es decir, idiosincrásicos, incluyendo el error de medida). No es posible estimar C y D simultáneamente, porque C y D se confunden negativamente y la elección del modelado C o D depende del patrón de las correlaciones MZ y DZ. Por lo general, C se estima si la correlación entre DZ es mayor que la mitad de la correlación entre MZ y D se estima si la correlación entre DZ es menor que la mitad de la correlación entre MZ (94).

El modelado de ecuaciones estructurales determina la combinación que mejor coincide con los datos observado (124). Los datos de los pares de gemelos MZ y DZ se analizaron utilizando el paquete de software MX (125). El mejor ajuste total del modelo completo (ADE) se determinó sobre la base del estadístico chi-cuadrado (χ^2). Posteriormente se evaluó la importancia de los factores genéticos (A y D) por medio de pruebas de razón de verosimilitud comparando el modelo completo con un submodelo en el que estos factores se restringieron a cero. Cuando el ajuste empeoró significativamente, la contribución de factores genéticos fue considerada significativa. La heredabilidad en sentido amplio (H^2) del fenotipo se definió como el porcentaje de varianza total que podría explicarse por factores genéticos (A + D).

La potencia del diseño experimental para detectar heredabilidad de sentido amplio para diferentes valores de H^2 basados en el tamaño actual de la muestra se determinó mediante pruebas de ADE frente a E con una prueba de 2 df y alfa de 5%. El poder de detectar una H^2 de 0,5, 0,6 o 0,8 fue de 75%, 91% y 99% respectivamente, cuando la contribución de los efectos aditivos y no aditivos se consideraba equivalente.

Población ONTIME-DINE

Se utilizó la prueba t de Student para analizar las posibles diferencias en las características generales y datos bioquímicos de la población *ONTIME-DINE* entre los portadores GG y CC. Además, se realizó un test pareado para estudiar las diferencias estadísticas entre las dos condiciones (EE y LE) dentro de cada grupo de mujeres (portadores GG o CC) para a) tolerancia a la glucosa (AUC), b) melatonina, c) condiciones de luz, d) características habituales del sueño y e) tiempo habitual de la ingesta de alimentos. Además, se utilizó un ANOVA para medidas repetidas (ANOVA_{rm}) con el fin de probar las diferencias en la glucosa a lo largo de los diferentes momentos (T0', T30', T60', T90' y T120') entre EE y LE. Además, se usó el ANOVA_{rm}

para comprobar si había una interacción entre el tiempo de comidas (EE vs LE) y el genotipo (GG vs CC) para los valores del AUC y de glucosa a lo largo de los diferentes momentos (T0', T30', T60', T90' y T120') (JMP Pro 12, SAS Institute). Los datos se ajustaron por MEQ para la interacción del horario de comida y por el ciclo menstrual para la glucosa a lo largo de los diferentes momentos.

RESULTADOS

Resultados objetivos 1-4:

Heredabilidad de la salud del sistema circadiano

1) Características generales de la población estudiada

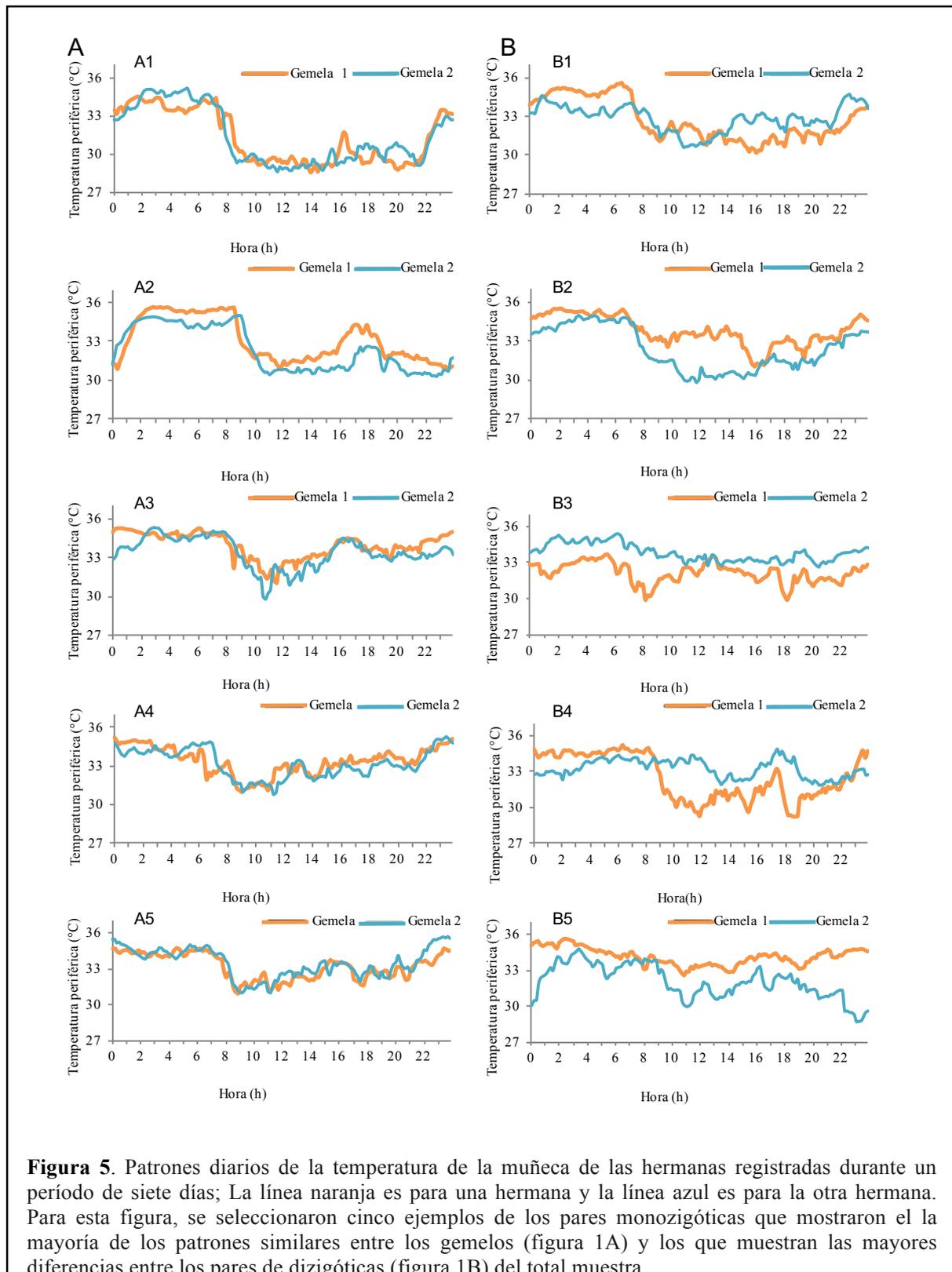
La **tabla 1** (ver anexos) representa las características generales según grupos de zigosidad de la población de gemelas, que participó en el estudio sobre la heredabilidad del sistema circadiano. No se encontraron diferencias significativas en edad y variables antropométricas (peso, altura, IMC, % de grasa, cintura, cadera y metabolismo basal). Además, tampoco se encontraron diferencias en las características del sueño tanto diurno como nocturno (hora de acostarse, hora de despertarse y duración), en horarios de ingesta de alimentos (inicio del desayuno, comida y cena), así como en el ratio del cortisol entre la mañana y la noche características de vespertinidad-matutinidad.

2) Resultados específicos del análisis de la heredabilidad del sistema circadiano evaluado con la temperatura en la muñeca (*objetivo 1*)

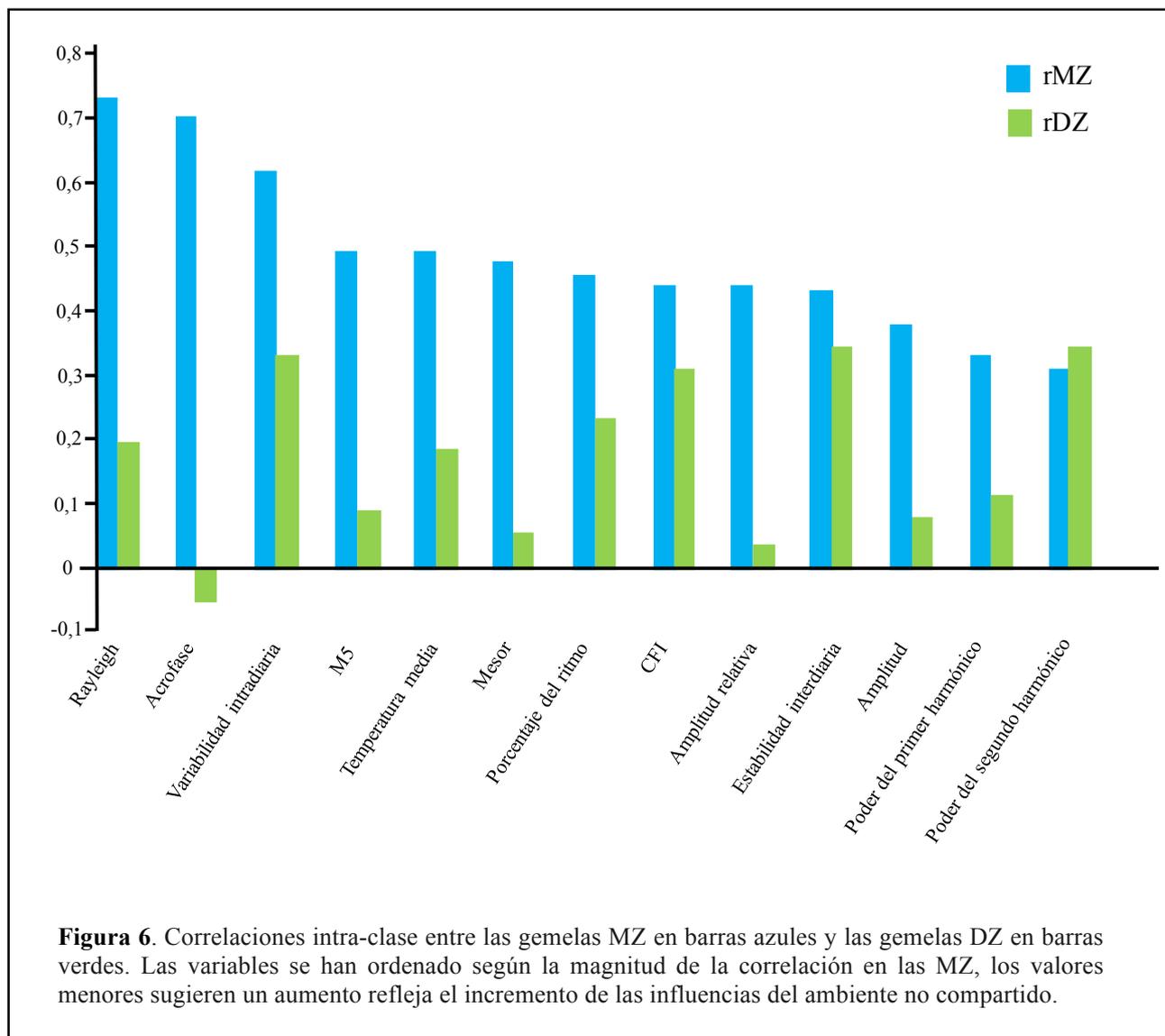
En la **figura 5** se representan cinco ejemplos seleccionados de patrones circadianos de la temperatura en la muñeca en parejas de gemelas (1A para MZ y 1B para DZ). Los patrones de temperatura diarios regulares se caracterizan por un aumento de la temperatura antes del inicio del sueño, un estado nocturno estable con altas temperaturas y una caída pronunciada después de despertar por la mañana. También hay un pico secundario en la tarde, un período que normalmente se asocia con siesta, y una caída de temperatura entre 20:00 h y 22:00 h, período de mínimas temperaturas conocido como "zona de mantenimiento del despertar" (126). Este patrón regular del ritmo de temperatura se observó en algunos de los participantes, mientras que otros mostraron una curva menos regular.

Los patrones de temperatura de las gemelas MZ fueron muy similares en ambas hermanas, tanto en aquellas que mostraban un patrón regular (**figuras 5 A1-2**), como en aquellas que tenían un patrón circadiano irregular con curvas más aplanadas (**figuras 5**

A3-5). En cambio, las gemelas DZ mostraron mayores diferencias entre los patrones de temperatura entre ambas hermanas (**figura 5 B1-5**).



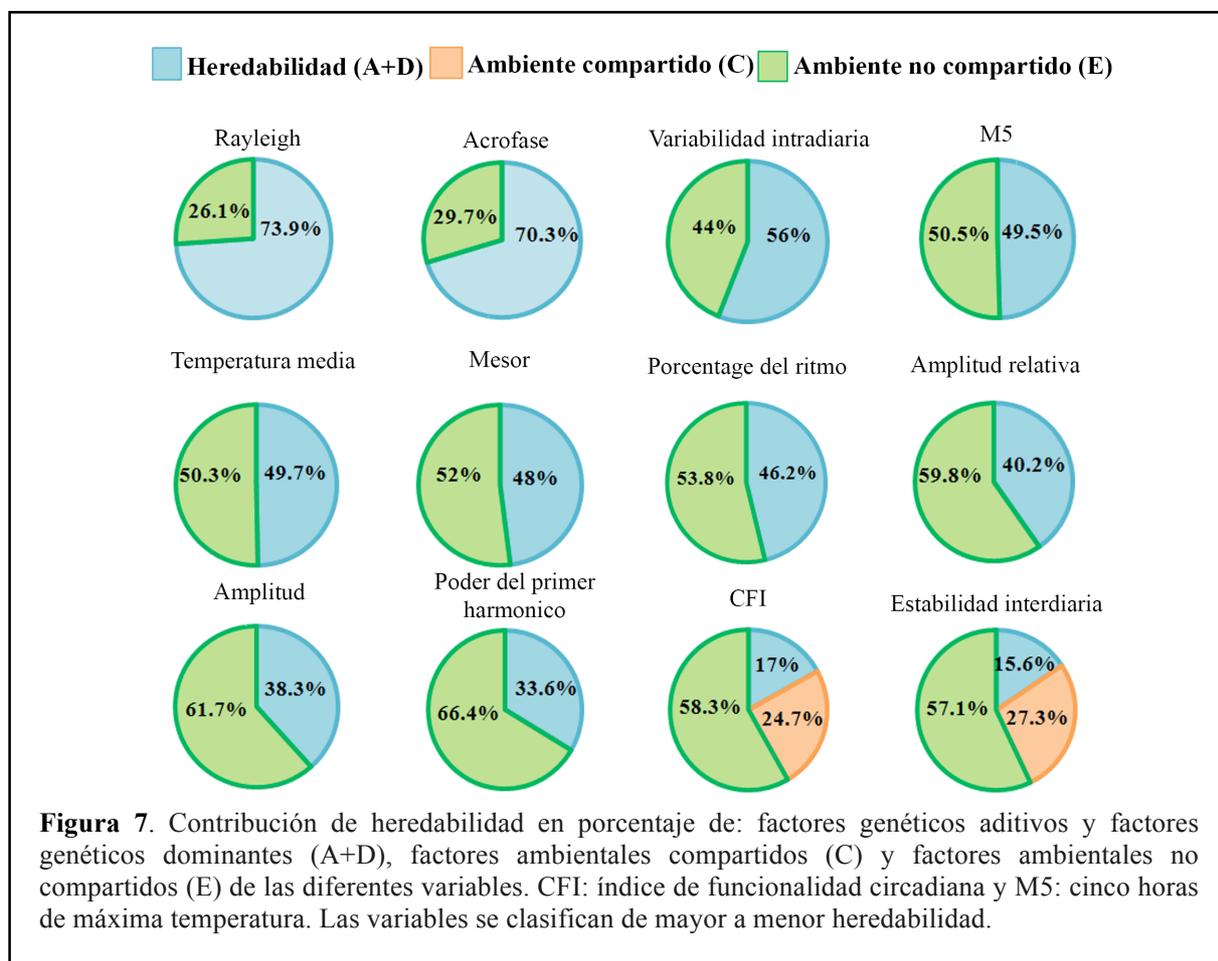
Aunque estas figuras sólo representan una selección de pares de gemelas, cabe destacar que tanto la similitud en las MZ como la desigualdad en las DZ fue coherente en la población total (53 pares de gemelas), tal como se muestra en las correlaciones intra-clase (**figura 6**) (**tabla 5**, ver anexos).



Las gemelas MZ mostraron correlaciones intra-clase superiores a las de las gemelas DZ de manera constante, especialmente en los parámetros de fase (*acrofase* del ritmo de 24 h) y otras mediciones. Las correlaciones intra-clase entre MZ y DZ fueron muy diferentes en el test de *Rayleigh*, el *mesor*, la *potencia del primer armónico*, la *temperatura media* y en las *cinco horas de máxima temperatura* (M5). Estas diferencias

disminuyeron para el *porcentaje del ritmo* y la *variabilidad intradía* (IV), y desaparecieron para el *poder del segundo armónico* (P2), la *estabilidad interdiaria* y el *índice de funcionalidad circadiana* (CFI) (**figura 6**).

El patrón de correlaciones en estas variables sugiere que el ritmo de la temperatura de la muñeca está determinado en gran parte por la genética. Estos datos se confirmaron cuando se estimó la contribución relativa de los factores genéticos [aditivo (A) y no aditivo (D)] y medioambientales (E). Las estimaciones estandarizadas de estos factores aparecen en la **figura 7** y **tabla 5** (ver anexos).



Cuando se eliminó la influencia de los factores genéticos en el modelo, el ajuste empeoró significativamente, por tanto, se calculó la heredabilidad en sentido amplio (A+D). Esto sucedió en parámetros tales como la temperatura media, el mesor, la acrofase, la prueba de Rayleigh, el porcentaje de ritmicidad, el M5 y la variabilidad intradiaria, en las cuales las heredabilidades (A+D) oscilaron entre 46% y el 72%. Otras

medidas relacionadas con la temperatura como la amplitud y la potencia del primer armónico mostraron una tendencia a una menor magnitud en el efecto genético ($P < 0,1$). Las correlaciones obtenidas en las gemelas MZ y DZ para la potencia del segundo armónico no fueron válidas para su aplicación posterior en los modelos genéticos.

En el caso de la estabilidad interdiaria y el Índice de Funcionalidad Circadiana (CFI), el patrón de correlaciones indicó que existían factores ambientales comunes (**figura 7** y **tabla 5**, ver anexos), por lo tanto, para estos dos parámetros se aplicó el modelo ACE. Los datos resultantes en los modelos genéticos demostraron que existe una influencia de los factores familiares (A+C) que en caso de eliminarse de los modelos se pérdida significativamente la bondad del ajuste.

3) Resultados específicos la determinación de heredabilidad del sistema circadiano evaluado con el TAP (objetivo 2)

La ritmicidad circadiana de la temperatura periférica (medida en la muñeca), la actividad y la posición corporal se analizó independientemente comparando las correlaciones de los pares de gemelas MZ y DZ y ajustando los modelos genéticos a los parámetros medidos. Tal y como hemos mencionado anteriormente, los principales parámetros medidos para la temperatura periférica muestran una influencia genética relevante, con estimaciones de heredabilidad entre 46% y 70% (**tabla 5**, ver anexos). Sin embargo, los análisis de actividad y posición no mostraron un patrón de correlaciones intra-clase mayor para las gemelas MZ que para las DZ. Además, las proporciones de varianza estimadas en los modelos genéticos para la actividad y la posición apuntaron a la predominancia de factores ambientales no compartidos (incluyendo el error de medida) para muchos de los parámetros analizados (**tablas 6 y 7 respectivamente**, ver anexos).

La **figura 8** representa las ondas medias diarias de las gemelas MZ (A) y DZ (B) seleccionadas para el análisis de la variable TAP. Ambos grupos mostraron un patrón de TAP diario similar al descrito previamente por el grupo de cronobiología de la Universidad de Murcia (Ortiz-Tudela, Martínez-Nicolas *et al*, 2010). El patrón diario de TAP se caracteriza por una gran disminución de los valores durante el tiempo de sueño, y de otra disminución consistente, pero transitoria, alrededor de las 16:00-17:00 h. Esta disminución secundaria de estos valores suele aparecer después de la hora habitual de la comida de los sujetos y durante su período normal de siesta. A continuación, se observan los mayores valores de TAP entre las 09:00-14:00 h y entre las 19:00-21:00 h. Por último, los valores de TAP comienzan a disminuir antes de acostarse.

Cuando comparamos las ondas medias de TAP entre las hermanas gemelas de MZ y DZ, observamos que los patrones diarios de las MZ eran similares entre las hermanas mientras que los patrones de las DZ presentaban diferencias notables dentro del mismo par de hermanas.

Esto se refleja en las correlaciones intra-clase para el TAP, representadas en la **tabla 8** (ver anexos). De la misma manera que pasaba con la temperatura de la muñeca, las gemelas MZ mostraron correlaciones intra-clase superiores a las de las gemelas DZ de para prácticamente todos los parámetros analizados, incluyendo el *mesor*, la *acrofase* y la *amplitud* del ritmo de 24 h. Estas grandes diferencias en las correlaciones entre MZ y DZ también se encontraron en la *estabilidad interdiaria* y el *Índice de Funcionalidad Circadiana* (CFI). Para la prueba de *Rayleigh*, el *porcentaje de ritmicidad y variabilidad intradiaria* las diferencias seguían siendo significativas.

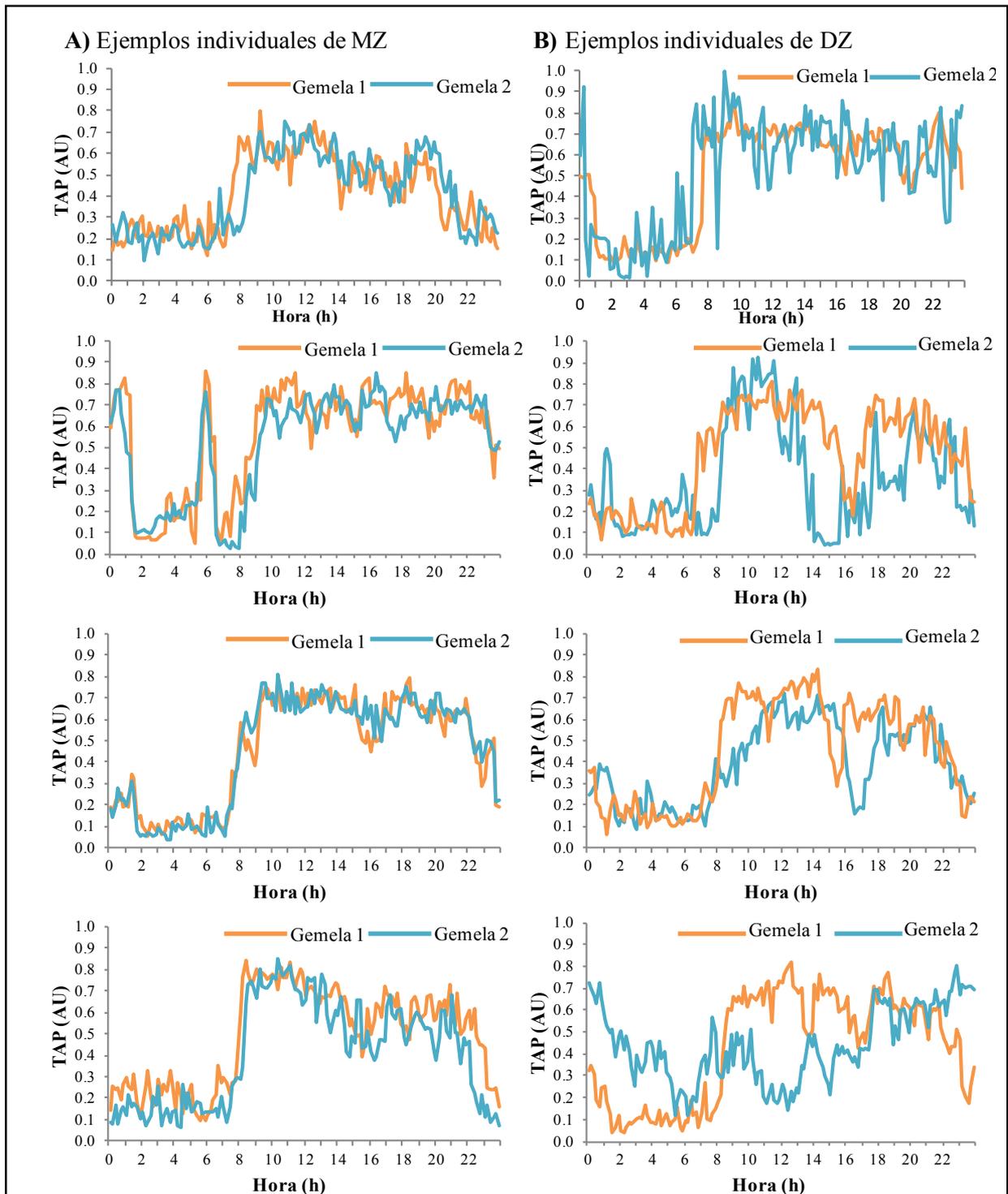


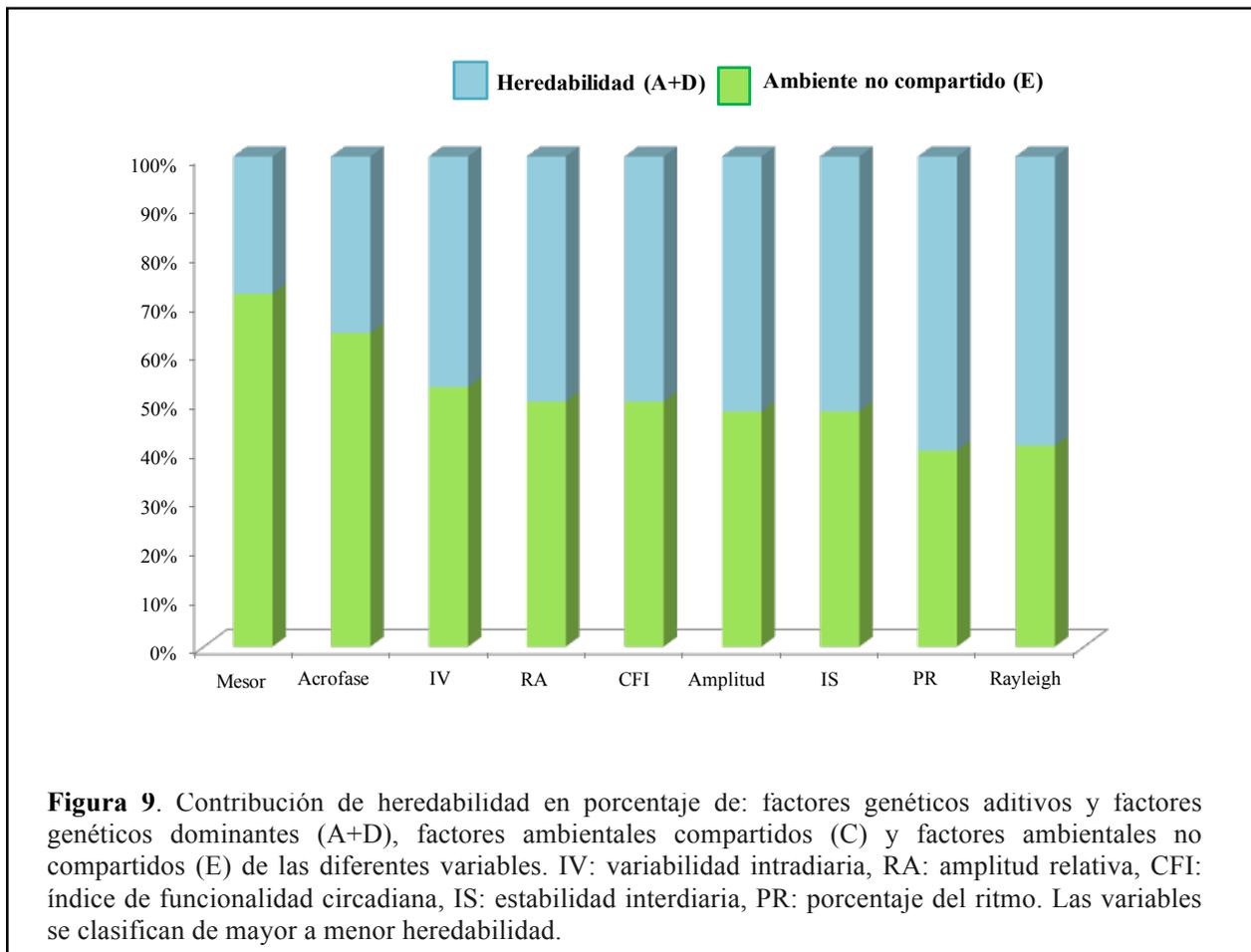
Figura 8. Patrones diarios de TAP de las hermanas registradas durante un período de siete días; La línea naranja es para una hermana y la línea azul es para la otra hermana. Para esta figura, se seleccionaron cuatro ejemplos de los pares monozigóticas que mostraron el la mayoría de los patrones similares entre los gemelos (A) y los que muestran las mayores diferencias entre dizigóticas pares (B) del total muestra.

Las correlaciones de las gemelas, representadas en la **tabla 8** (ver anexos) sugirieron la presencia de efectos genéticos dominantes (ya que las correlaciones de las MZ fueron más del doble que las correlaciones de las DZ), por lo tanto, los datos se ajustaron a través de los modelos ADE. En el modelo ADE, la varianza fenotípica se descompone en efectos genéticos aditivos (A), efectos genéticos dominantes (D) y efectos ambientales no compartidos (E).

En la **tabla 9** (ver anexos) se muestran los resultados de los modelos genéticos ajustados y las proporciones de la varianza explicadas por los modelos ADE, para los diferentes parámetros del TAP. Para este análisis genético, se probaron sucesivamente diferentes sub-modelos en los que los efectos A y D se fueron eliminando para probar su importancia y así poder ajustar por los diferentes modelos genéticos ADE o ACE. Si alguno de estos factores representaba un valor significativo de varianza no podría ser descartado del modelo sin causar un cambio significativo en la Chi cuadrado. Por lo tanto, el mejor modelo de ajuste, siguiendo el principio de parsimonia (aquel que busca la explicación más sencilla), sería un modelo simple que proporciona un ajuste comparable a los datos.

En el presente trabajo, los modelos que mejor se ajustaron mostraron un componente genético en todas las variables estudiadas (principalmente aditivo pero también incorporando factores dominantes no significativos) y fuentes de variación ambientales no compartidas (AE). En los modelos AE la eliminación del componente genético (para ajustar a un modelo más simple con sólo el efecto ambiental no compartido) siempre empeoraba la significación del ajuste.

La **figura 9** muestra la heredabilidad de sentido amplio (A+D) que osciló entre el 70% para el mesor y el 39% para el porcentaje de ritmo. Otros parámetros como la acrofase, la prueba de Rayleigh, la variabilidad intradiaria, la estabilidad interdiaria, la amplitud relativa, la amplitud y el índice de funcionalidad circadiana (CFI) mostraron heredabilidades amplias que oscilaron entre 62% y 40%.



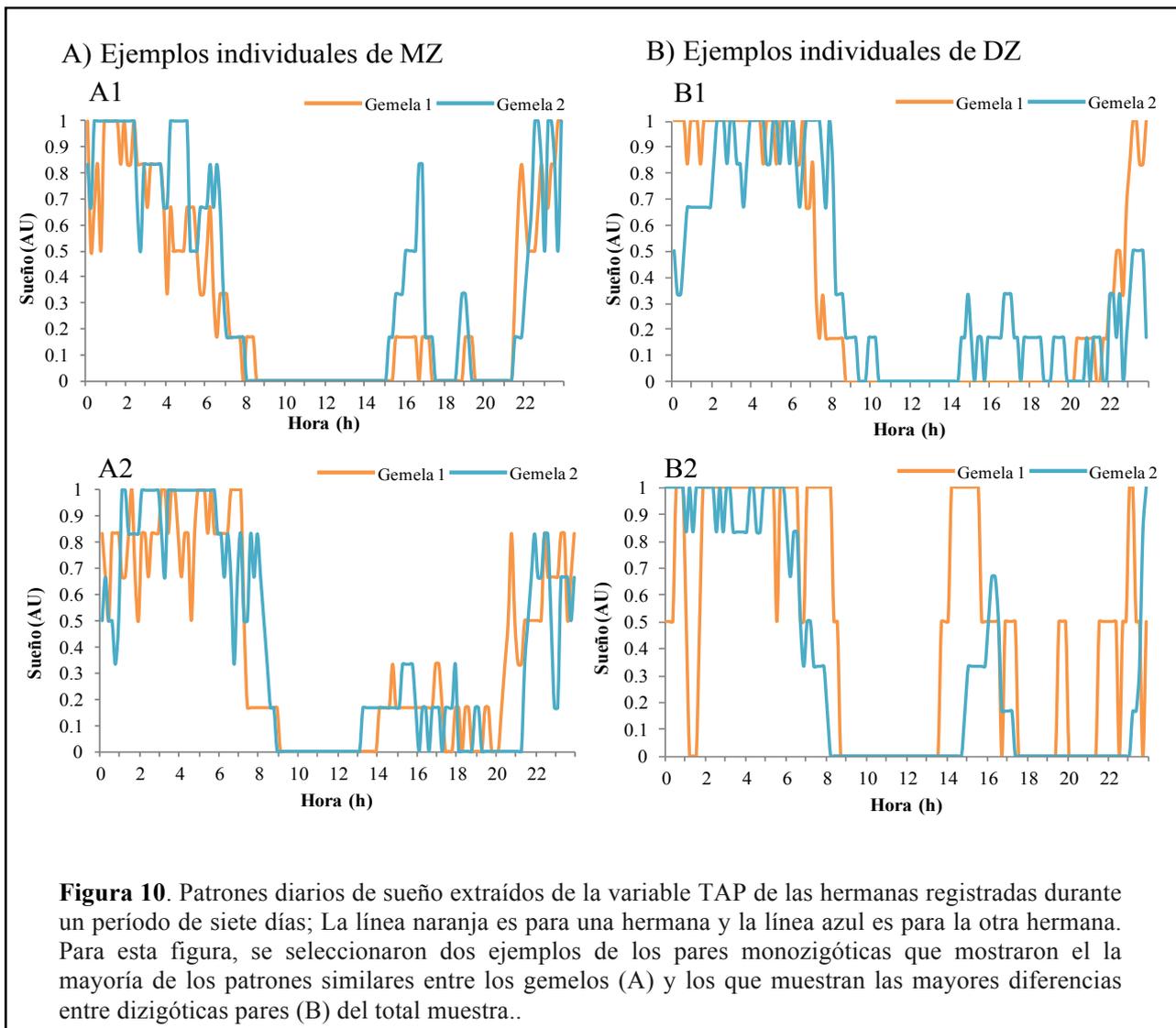
Los mismos análisis se aplicaron a las variables de actividad y de posición corporal. El ajuste de los modelos genéticos para estas variables mostró mayores inestabilidades y diferencias en las contribuciones de los factores genéticos y ambientales. Especialmente en la posición donde la mayor parte de la variación parece tener un origen ambiental (**tablas 6 y 7**, ver en anexos).

4) Resultados específicos la determinación de heredabilidad del patrón sueño-vigilia y la siesta (objetivo 3)

La **tabla 10** (ver anexos) representa la asociación entre la duración de la siesta y la obesidad. Se observó una asociación significativa y positiva entre la duración del sueño diurno y el IMC, la grasa corporal total (kg y porcentaje) y la masa grasa visceral ($P < 0,05$). Además, la siesta tendía a presentar mayor duración en las mujeres más obesas.

Las ondas medias de sueño diario extraídas a través de la variable TAP (**figura 10**) muestra una mayor similitud circadiana entre los pares de hermanas de gemelas MZ que entre los pares de hermanas de las gemelas DZ. El ritmo del sueño se muestra como la probabilidad de estar dormido en un momento dado cuyos valores van de 0 a 1, en el que 1 indicaría el estar totalmente dormido y 0 indicaría el estar totalmente despierto. La **figura 10 A1 y A2** muestra que, no sólo el sueño nocturno, sino también el sueño diurno fue similar entre las hermanas MZ, mientras que entre las hermanas DZ (**figura 10 B1 y B2**) las diferencias entre sus patrones de sueño fueron más marcadas.

Esta mayor similitud entre los pares de hermanas MZ se confirmó por las correlaciones intra-clase. Estas correlaciones fueron mayores para las gemelas MZ que para los pares de DZ de manera constante en los diferentes parámetros de sueño analizados (**tabla 11**, ver anexos).



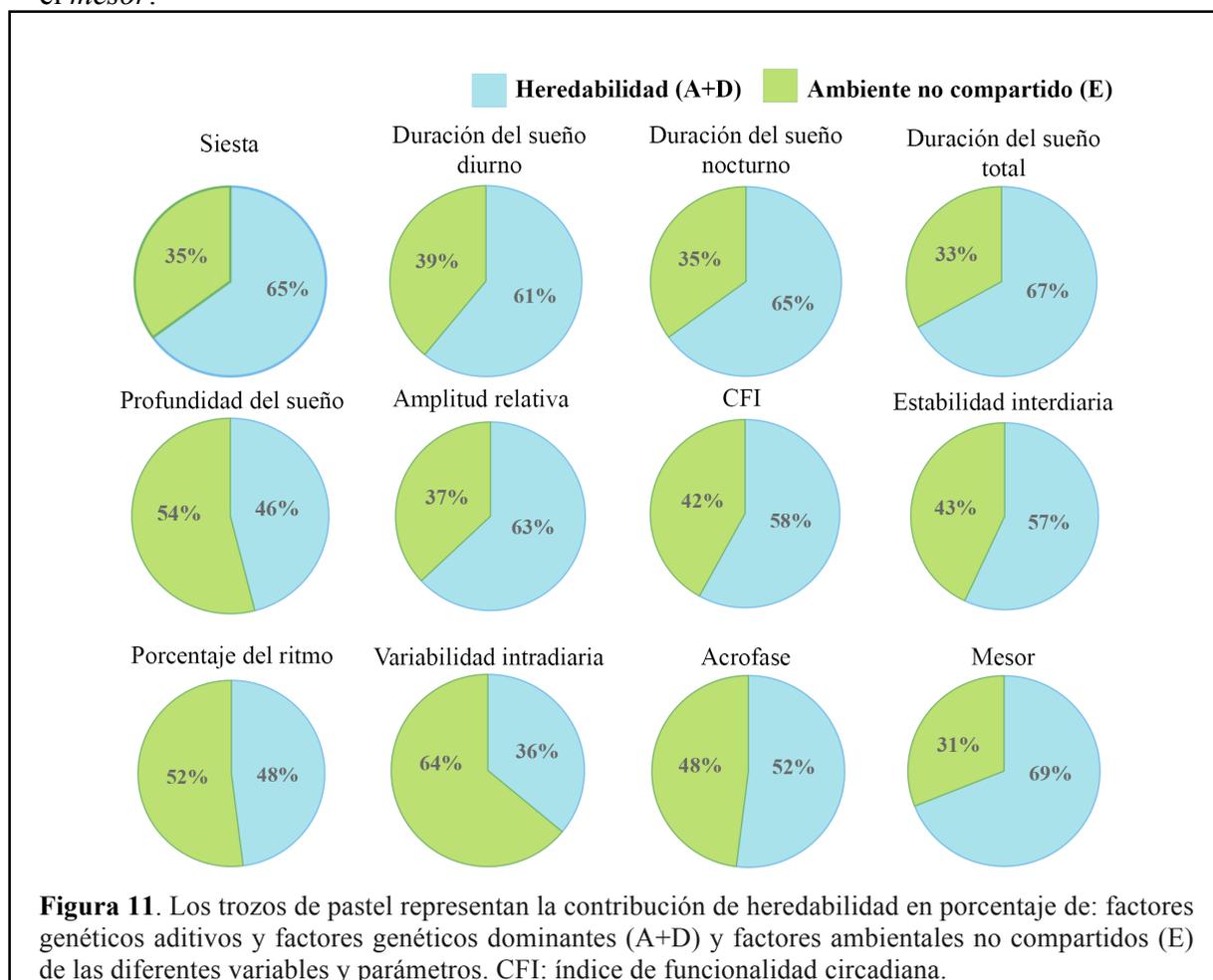
Las correlaciones intra-clase (**tabla 11**, ver anexos) sugirieron la presencia de efectos genéticos dominantes (las correlaciones de las MZ fueron más del doble de las correlaciones de las DZ), por lo tanto, para el análisis de los datos se ajustaron los modelos ADE (excepto para la amplitud relativa, donde se aplicó el modelo ACE).

A continuación, para el análisis genético, se fueron probando diferentes submodelos en los que los efectos D/C y A se fueron eliminando para probar su importancia y así poder ajustar por los diferentes modelos genéticos ADE o ACE.

Para todas las variables, los modelos más adecuados incluyeron un componente genético y una fuente de variación ambiental no compartida (AE). El componente genético en los modelos de AE no se pudo eliminar en la mayoría de los casos (solo en la

variabilidad intradiaria), ya que un modelo más simple con sólo el efecto ambiental no compartido (E) produjo un empeoramiento significativo del ajuste (**tabla 12**, ver anexos).

La **figura 11**, representa las diferentes heredabilidades de la siesta, información obtenida mediante cuestionario, y de la duración diaria del sueño, así como de varios parámetros de sueño obtenidos a partir de la variable TAP como son la *duración de sueño nocturno* y *duración total del sueño (diurno y nocturno)*, la *amplitud relativa*, el *CFI*, la *estabilidad interdiaria*, el *porcentaje del ritmo*, la *variabilidad intradiaria*, la *acrofase* y el *mesor*.



La heredabilidad del hábito de *dormir la siesta* (analizado mediante cuestionario) y la *duración del sueño diurno* fueron de un 65% y 61% respectivamente. Es importante resaltar que la heredabilidad del *sueño diurno* seguía siendo relevante [A: 45% (IC del 95%: ,13, ,68); E: 55% (IC del 95%: 0,31, 0,87)] después de ajustar por la duración del

sueño nocturno. Lo que indica que la heredabilidad de la siesta y su duración no está determinada por el sueño nocturno, sino que existe de forma independiente.

En el resto de parámetros obtenidos a partir del TAP, se encontraron resultados similares, con unas heredabilidades estimadas entre el 36% y el 69%. Estas estimaciones sugieren un impacto genético importante en la siesta y en el ritmo del sueño.

5) Resultados específicos de la determinación de heredabilidad del horario de la comida y variables relacionadas (objetivo 4)

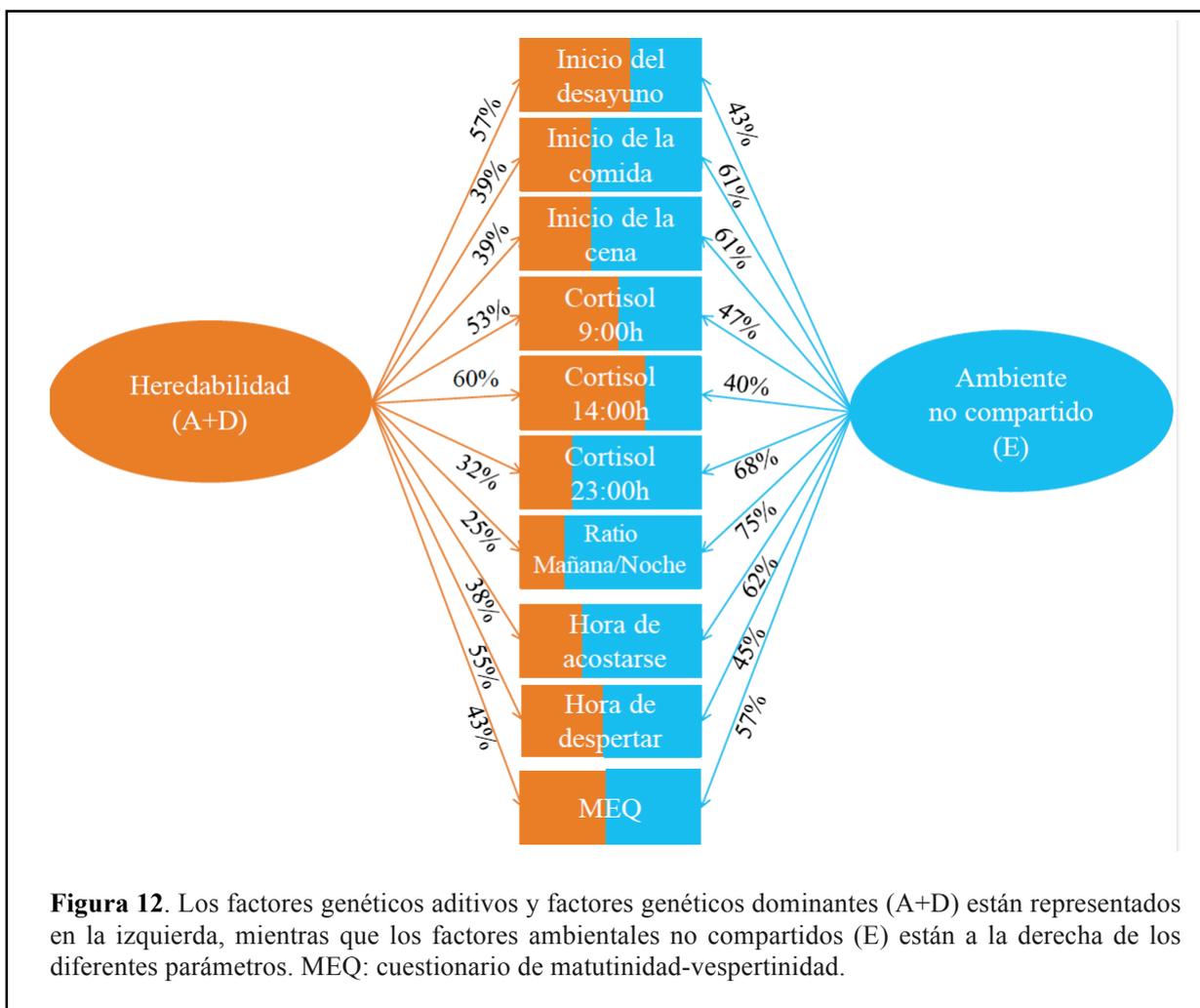
Se analizó la ritmicidad circadiana del horario de las comidas, las características del sueño, el cortisol y el MEQ, comparando las correlaciones de los pares de gemelas MZ y DZ y ajustando los modelos genéticos a las variables medidas. En la **tabla 10** (ver anexos) se muestran las correlaciones de las diferentes variables estudiadas para este objetivo.

Los parámetros estudiados para las características del horario de la ingesta de alimentos y el MEQ no mostraron grandes diferencias en las correlaciones intra-clase entre las hermanas MZ y las DZ. Por otra parte, para el horario del inicio de la cena, las gemelas DZ mostraron una correlación intra-clase más alta que la de las gemelas MZ, lo que sugiere un componente genético menor. Sin embargo, con respecto a las características del sueño, tanto la hora de acostarse como la hora de despertar mostraron correlaciones intra-clase mayores para las gemelas MZ que para las gemelas DZ. Del mismo modo, el momento del cortisol analizado a las 9:00h, a las 14:00h y a las 23:00h mostró correlaciones intra-clase mayores para las gemelas MZ que para las gemelas DZ.

El patrón de las correlaciones encontrado en estas variables sugiere una determinación genética relevante, especialmente en el inicio de la ingesta del desayuno, el inicio del sueño, el final del sueño, en el cortisol de las 9:00h y de las 14:00h y para el

MEQ. Así, para las diferentes variables se calculó la contribución relativa de los factores genéticos [aditivos (A) y dominantes (D)] y ambientales no compartidos (E).

Los valores estandarizados de los factores genéticos y ambientales aparecen en la **tabla 13** (ver anexos) y **la figura 12**. En cuanto a las características del horario de la ingesta de alimentos, cabe destacar que el inicio del desayuno estuvo más influenciado por factores genéticos (57%) (**figura 12**) cuando se comparó con el inicio de la comida y de la cena que mostraron un fuerte factor ambiental (61%). Por lo tanto, los genes parecen tener una mayor influencia en el desayuno que en el momento de la comida.



Los modelos genéticos mostraron también una heredabilidad de sentido amplio (A+D) que osciló entre el 60% para el cortisol de las 14:00h y el 25% para ratio entre el cortisol de la mañana y el de la noche. Esta baja heredabilidad para el ratio entre el

cortisol de la mañana y el de la noche es normal debido a la gran diferencia en los factores genéticos entre el cortisol a las 9:00h y el cortisol a las 23:00h (53% y 32% respectivamente). Cuando se analizó el horario del sueño (datos recogidos mediante un registro de sueño), se observó que los efectos genéticos representaron el 38% de la varianza en la hora de acostarse, mientras que estos efectos genéticos mostraron un porcentaje mayor en la hora de despertar (55%).

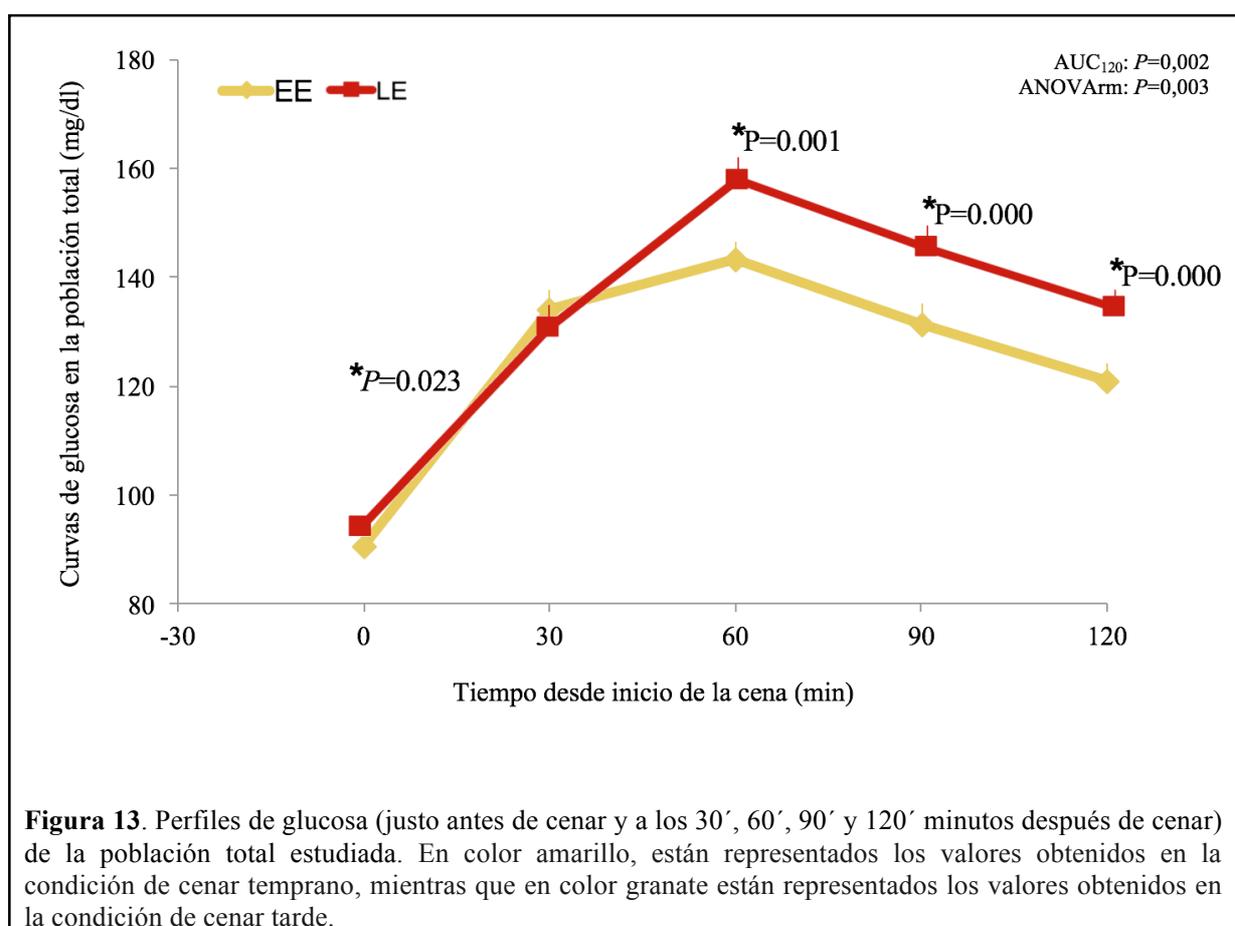
Además, también se estimó la heredabilidad en sentido amplio para el cronotipo de las mujeres que participaron en el estudio (**figura 12**), el cual tras el análisis de los modelos genéticos mostró una influencia genética en sentido amplio (A+D) del 43%.

Resultados del objetivo 5:

Estudio de una variante génica de riesgo del *MTNR1B* y su impacto sobre enfermedades asociadas con la cronodisrupción como la diabetes

1) Resultados específicos del estudio de la variante del *MTNR1B*, su interacción con la cena y su efecto sobre la tolerancia a la glucosa (objetivo 5)

La **figura 13** muestra los perfiles de glucosa después de la cena en ambas condiciones para la población total. Según la hipótesis, en la población total, cenar tarde perjudicó significativamente la tolerancia a la glucosa en comparación con cenar pronto observado en el análisis del área bajo la curva (AUC) (media±SD; LE: AUC=284,74±32,67 mmol/L×h y EE:AUC=269,61±34,8 mmol/L×h, respectivamente, $P=0,002$). Además, el análisis de ANOVA para medidas repetidas (ANOVA_{Arm}) para la concentración de glucosa analizada cada media hora también mostró una diferencia significativa entre ambas condiciones de cena ($P=0,003$).



Además, cuando la población fue dividida según el genotipo de *MTNR1B* (GG y CC) (**figura 14A y 14B**), los resultados mostraron que entre los portadores del alelo de riesgo GG, cenar tarde afecta la tolerancia a la glucosa en comparación con el hecho de cenar temprano según los valores del AUC de la glucosa (media \pm SD; LE: AUC =292,2 \pm 33,8 mmol/L \times h y EE: AUC =270,9 \pm 30,4mmol/L \times h, $P=0,006$). Resultados similares se encontraron para los valores de glucosa analizada cada media hora según el análisis de ANOVArm ($P = 0,013$). Sin embargo, entre los no portadores del alelo de riesgo riesgo (CC), la condición de la cena (pronto o tarde) no afectó significativamente a la tolerancia postprandial a la glucosa, evaluada por el AUC (LE: AUC=277,3 \pm 30,5 mmol/L \times h y EE: AUC=268,2 \pm 38,2 mmol/L \times h, $P=0,122$) o en el análisis de ANOVArm ($P=0,230$).

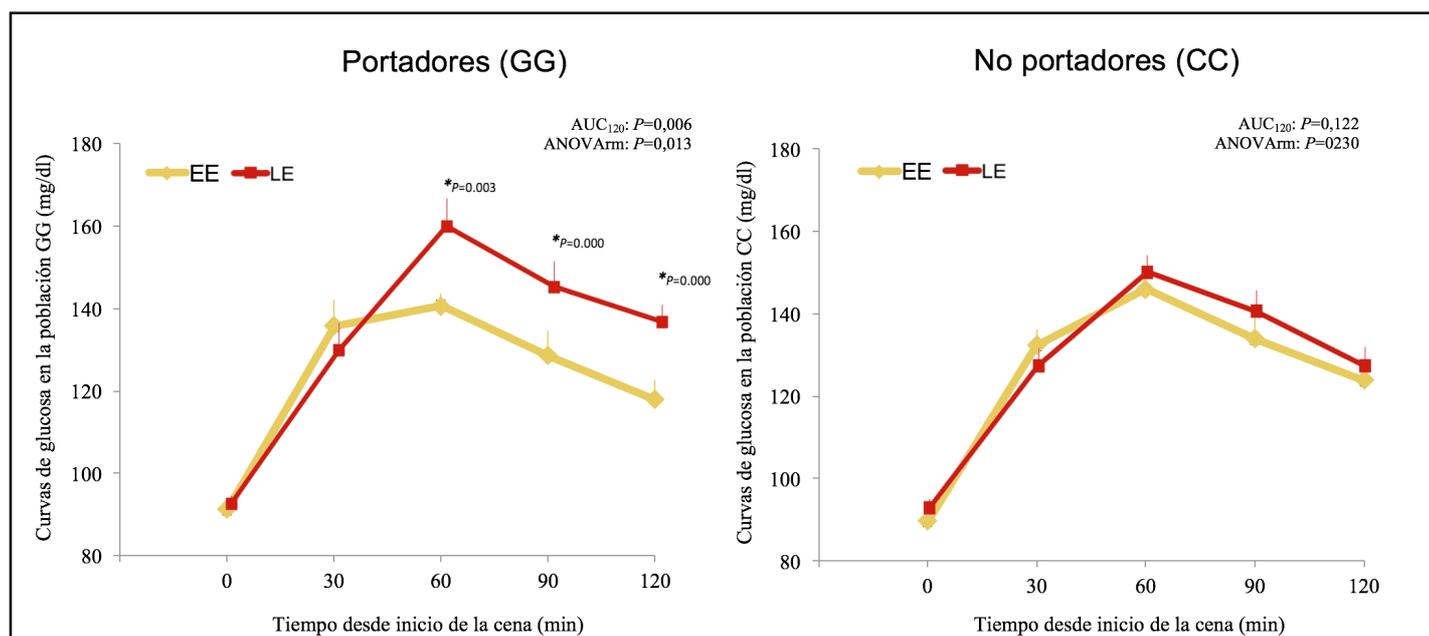


Figura 14. Perfiles de glucosa (justo antes de cenar y a los 30', 60', 90' y 120' minutos después de cenar) de la población separadas en función del SNP del *MTNR1B*. A la izquierda se muestran los portadores del alelo de riesgo (GG), y a la derecha los no portadores (CC). En color amarillo, están representados los valores obtenidos en la condición de cenar temprano, mientras que en color granate están representados los valores obtenidos en la condición de cenar tarde.

Otros análisis demostraron una interacción significativa entre el horario de las comidas (EE vs LE) y el genotipo (GG vs CC) para el AUC ($P=0,045$) y para las medidas repetidas de glucosa ($P=0,016$).

DISCUSIÓN

1. Sobre el análisis de las influencias genéticas y ambientales en la salud del sistema circadiano mediante la medición continua de la temperatura periférica

Los datos presentados en esta tesis proporcionan la primera evidencia sobre la heredabilidad de los patrones circadianos de la temperatura periférica medida en la muñeca en mujeres adultas estudiadas en su vida habitual. El patrón de las correlaciones y los modelos genéticos apuntan a una heredabilidad de moderada a alta para la mayoría de los parámetros analizados, lo que sugiere una influencia genética relevante en los patrones circadianos. De hecho, nuestros resultados muestran una heredabilidad elevada en los parámetros tales como la **fase del ritmo** y la **temperatura media**, que fluctuó entre el 50% y el 74%.

Estos modelos genéticos, basados en estudios de gemelos, se han utilizado en el pasado para otras características fenotípicas relacionadas de forma directa o indirecta con el sistema circadiano, tales como el cronotipo (vespertino o matutino) y la duración y calidad del sueño, generalmente evaluadas de forma subjetiva mediante cuestionarios. Asimismo, estos modelos también se han usado para analizar variables circadianas más precisas y objetivas como la variabilidad diaria del cortisol sanguíneo o la presión arterial. Estudios previos basados en cuestionarios mostraron una heredabilidad total alrededor del 47% al 49% para cronotipo mediante el uso del cuestionario de vespertinidad-matutinidad (MEQ) (56, 127) o alrededor del 20% al 44% (para la duración y la calidad del sueño) (59, 60, 62, 64, 128-130). Los resultados del presente estudio mediante medidas objetivas como es el ritmo diario de temperatura de la muñeca, registrado cada minuto durante siete días consecutivos, muestran valores de heredabilidad ligeramente superiores (50%-74%). Esta diferencia puede deberse a la naturaleza de la medida, siendo ésta una técnica objetiva y más precisa que los cuestionarios con preguntas que contesta el participante (medida subjetiva).

Además, los estudios realizados sobre el sistema circadiano mediante el uso de otras medidas también objetivas como son la presión arterial y los perfiles diarios de ritmo cardíaco (mediante electrocardiografía) mostraron en general resultados similares a los nuestros. Las correlaciones variaron de 0,66 a 0,83 para MZ y de 0,25 a 0,37 para DZ tanto en la acrofase como en la amplitud (55).

En esta tesis doctoral, las gemelas MZ mostraron correlaciones intra-clase superiores en comparación con las gemelas DZ de manera constante para la mayoría de las medidas. En particular las correlaciones en la *acrofase*, la prueba de *Rayleigh*, el *mesor*, la *temperatura media*, las *5 h de máxima temperatura* y el *porcentaje del ritmo*. De hecho, los modelos mostraron que los factores genéticos eran responsables del 46% al 70% de la varianza en estos parámetros.

Entre los parámetros estudiados, la acrofase (hora de máxima temperatura diaria en las participantes) en y la prueba de Rayleigh (que define la estabilidad de la fase del ritmo, y se refiere a distribución uniforme o no de esta fase en un círculo o reloj de 24h), fueron los parámetros con mayor porcentaje de heredabilidad, lo que indica una fuerte influencia genética en la fase, y en la estabilidad del sistema circadiano. Llama la atención esta heredabilidad elevada ya que resultados anteriores de nuestro grupo de investigación han demostrado que la acrofase está relacionada con las características de alteraciones metabólicas del MetS (38). Se ha observado que una acrofase retrasada, se relaciona con una hipoglucemia matutina (38, 131). De hecho, los parámetros de fase tienen un componente genético como se ha demostrado previamente en un estudio realizado en una población con sobrepeso. Este trabajo, muestra que los portadores del alelo del gen *CLOCK* 3111C presentaron una mayor preferencia por la noche (132).

Estudios anteriores han mostrado que esta fase de temperatura es capaz de detectar con precisión la fase del sistema circadiano en sujetos estudiados en condiciones de vida normales en comparación con el Dim Light Melatonin Onset (DLMO) (36). De hecho, los índices de fase de temperatura de la muñeca mostraron una correlación significativa y fuerte, una alta capacidad de predicción y una coincidencia temporal con el DLMO. Un retraso en la fase es bastante común entre los jóvenes de hoy en día (133) y caracteriza a los individuos de tipo tardío o vespertinos.

En lo que se refiere a otros parámetros obtenidos del análisis del ritmo de temperatura, como son la temperatura media, el mesor y las 5 horas de máxima temperatura nuestros resultados muestran que el componente genético explicó aproximadamente el 50% de la varianza. Temperaturas elevadas de muñeca se han relacionado con vasodilatación cutánea diurna, activación parasimpática y somnolencia (134). De hecho, se ha demostrado que un pequeño aumento ($0,4^{\circ}\text{C}$) en la temperatura de la piel suprime la vigilia nocturna y cambia la estructura del sueño NO REM, hacia una mayor presencia y duración de etapas más profundas como son las etapas 3 y 4 (135).

La *variabilidad intradiaria* mide la fragmentación del ritmo y parece ser poco dependiente de los cambios circadianos endógenos, ya que demuestra una correlación baja con el bienestar social y emocional (119). De hecho, nuestros datos corroboran estos resultados, ya que este parámetro muestra una heredabilidad relativa del 56%. la variabilidad intradiaria se relaciona con la obesidad (38) y con una disminución de la amplitud de la ritmicidad de la melatonina, signo biológico de cronodisrupción (136), también se ha relacionado con el tratamiento de la obesidad, de tal manera que también una variabilidad intradiaria o fragmentación alta se asocia con una menor pérdida de peso (39). Además, se ha demostrado una mayor fragmentación del ritmo en aquellos sujetos que respondían mal al tratamiento en comparación con aquellos que respondían bien al

tratamiento conductual de la obesidad. Una variabilidad intradiaria elevada también se ha relacionado con el envejecimiento (79), probablemente debido al alargamiento de la siesta diurna y a los despertares nocturnos de las personas mayores.

Otro parámetro que ha sido previamente ligado al envejecimiento es la *amplitud*. Una disminución de la amplitud del ritmo circadiano de temperatura es uno de los cambios más destacados en el envejecimiento (79). Normalmente, este parámetro es elevado en sujetos con un sistema circadiano sano y en aquellos que tienen una rutina diaria más estable, mientras que se han descrito amplitudes bajas en personas mayores (79) y también en sujetos con Alzheimer (79, 137) o con obesidad (38). En nuestro estudio, la amplitud presentó un porcentaje genético moderado, lo que sugiere que la salud del sistema circadiano es parcialmente heredable, teniendo en cuenta que también muestra un efecto medioambiental moderado. Estos resultados coincidieron con los resultados anteriores de nuestro grupo, en los que se muestra que la amplitud es el resultado de influencias tanto internas como externas (51).

Además, se analizó la *estabilidad interdiaria*, un parámetro que depende más de las condiciones de vida libre (138). Este parámetro mide la similitud del patrón de 24h encontrado en los diferentes días, es decir la regularidad del ritmo. Sobre este parámetro encontramos un efecto de los factores familiares, aunque la muestra no fue lo suficientemente grande como para diferenciar de forma adecuada entre los factores genéticos aditivos (A) y los factores ambientales compartidos (C), mientras que los efectos ambientales no compartidos (E) representaron el 57,1% de la varianza. Esto está de acuerdo con trabajos previos (138) indicando que la estabilidad interdiaria podría verse influida en mayor medida por factores ambientales. Estos resultados pueden parecer contradictorios teniendo en cuenta que la prueba de *Rayleigh*, la cual describe la estabilidad de la fase del ritmo, indica una alta heredabilidad en el ritmo circadiano de la

temperatura. Sin embargo, la estabilidad interdiaria y la prueba de Rayleigh, tienen significados similares pero diferentes: mientras que la prueba de Rayleigh se refiere a la estabilidad de la fase determinada por un análisis de cosinor donde los datos de temperatura se ajustan a una onda sinusoidal, la *estabilidad interdiaria* mide la repetitividad de todo el patrón circadiano independientemente de la forma de la onda.

Otro parámetro interesante en fisiopatología es *la potencia del segundo armónico (P2)* de la temperatura que, se refiere a un segundo pico que aparece después de comer en nuestra muestra y en otras de poblaciones también mediterráneas, y que suele asociarse con la siesta. Nuestros resultados indican que no hay diferencias en las correlaciones intra-pares, o entre hermanas, cuando se comparan las gemelas MZ y las DZ, lo que indica una fuerte dependencia del entorno. Un pico ultradiano poco marcado se ha relacionado con la temperatura postprandial y se ha asociado previamente con obesidad. Datos previos indican que mientras que en mujeres con normo-peso hay un pico de temperatura secundario marcado en el período postprandial, este pico es menos pronunciado en mujeres obesas (38). Los efectos ambientales externos tales como las diferencias en el tipo y cantidad de alimento ingerido con mayor o menor efecto termogénico, en los tiempos de trabajo, o en los períodos de siesta, pueden estar implicados en esta observación (34, 38). Además, otro factor ambiental como el momento de la actividad física también puede afectar el poder de este segundo armónico (P2): mientras que el ejercicio matutino está relacionado con un mayor P2, la actividad nocturna parece disminuir este pico postprandial (13).

El *índice de funcionalidad circadiana (CFI)*, un índice numérico que determina la robustez circadiana, integra tres parámetros circadianos, cada uno proporciona información complementaria sobre el sistema circadiano: la variabilidad intradiaria, la amplitud y la estabilidad interdiaria (139). Se ha demostrado que el CFI es preciso al

tratar de definir el estado circadiano de los sujetos (51). En esta tesis, los factores ambientales compartidos representaron casi el 60% de la varianza para el CFI de la temperatura, mientras que el resto se explicaron por factores familiares (A+C).

A partir del presente estudio podríamos suponer que en la práctica clínica podría ser útil enfocar los esfuerzos en la modificación de aquellos parámetros que dependen principalmente de condiciones ambientales como la amplitud, la estabilidad interdiaria y la potencia del segundo armónico para mejorar el estado circadiano del paciente (139). Como, como se mencionó anteriormente, nuestros estudios previos muestran que algunos de estos parámetros, principalmente ambientales, están asociados con condiciones fisiopatológicas como la obesidad, la hipertensión y el MetS. Sin embargo, es importante señalar que los parámetros relevantes de la temperatura de la muñeca como la fase, la estabilidad de la fase del ritmo, la temperatura media y la fragmentación del ritmo que parecen influir en el reloj central (140, 141) muestran influencias genéticas. No obstante, todavía dependen del efecto ambiental y, por lo tanto, son también susceptibles de cambio a través de intervenciones externas.

Nuestros resultados representan un paso significativo en la comprensión de la naturaleza de los ritmos diarios de temperatura periférica, un marcador circadiano y han demostrado ser relevantes para evaluar la condición del sistema cronobiológico e identificar las bases genéticas y las intervenciones ambientales relacionadas con la salud cronobiológica.

En resumen, el patrón de correlaciones y los modelos genéticos apuntan a una heredabilidad moderada a alta en la mayoría de los parámetros analizados de ritmo WT, lo que sugiere una influencia genética relevante en el sistema circadiano de las mujeres estudiadas. La presencia de estos factores genéticos apunta a la endogenicidad como la principal causa de la coincidencia de los ritmos entre las hermanas MZ. Sin embargo,

algunos de los parámetros de la temperatura siguen dependiendo de factores ambientales en su gran medida y, por lo tanto, susceptibles de cambio a través de intervenciones externas.

2. Sobre la utilización de procedimientos multiparamétricos como la variable integrada de temperatura, actividad y posición (TAP) para la medición de las influencias genéticas y ambientales sobre la salud del sistema circadiano

Esta tesis doctoral presenta también el primer análisis de cómo influyen los factores genéticos y ambientales en la variable integrada TAP (temperatura, actividad y posición). La existencia de múltiples influencias ambientales para variables rítmicas consideradas marcadores circadianos como son la temperatura, la actividad y la posición, de manera independiente ha llevado a proponer una combinación de estas tres variables rítmicas para la evaluación del sistema circadiano en la vida real, no en condiciones de laboratorio, en las que se utilizan técnicas más complejas y costosas (51). TAP proporciona información sobre el estado general del sistema circadiano, ya que incluye una variable con un gran componente endógeno (temperatura), y otras más dependientes de los hábitos y las conductas del individuo, como la actividad motora y la posición corporal. Teniendo en cuenta que el TAP permite una predicción muy precisa de los periodos de actividad en reposo, constituye un gran paso adelante en la evaluación ambulatoria del estado del sistema circadiano en humanos (51). Además, permite una correcta evaluación del ritmo de sueño-vigilia, y esta técnica ha sido validada por polisomnografía.

En esta validación, el TAP presentó los valores más elevados (85,70%) del índice que mide la coincidencia entre los episodios de sueño-vigilia medidos por polisomnografía y los episodios de sueño-vigilia estimados por TAP, en comparación con

la temperatura de la muñeca (79,57%), la actividad (61,08%) y la posición corporal (76,93%) evaluadas independientemente (52). El TAP también se ha utilizado para analizar los deterioros cognitivos leves (52). La confirmación de que la variabilidad del TAP depende en gran medida de factores genéticos ayudaría a comprender su naturaleza y determinaría la susceptibilidad del sistema circadiano a la intervención ambiental.

Nuestros resultados de heredabilidad de la variable integrada TAP parecen ser más robustos y precisos que los obtenidos a partir de las variables individuales. Sólo la temperatura ha mostrado resultados comparables mientras que la actividad y la posición presentan más discrepancias en los datos de heredabilidad, quizás por los errores debidos a la presencia de artefactos. Si observamos cualquiera de las tres medidas de forma aislada, podemos observar la presencia más relevante de factores ambientales (tanto compartidos como, especialmente, no compartidos que incluyen el error de medida) en algunos de los índices. Esto también está relacionado con las mayores diferencias en las estimaciones de heredabilidad entre los parámetros obtenidos dentro de cada variable, como por ejemplo en la posición, en la que la estimación de heredabilidad fluctuó de 0 a 66% entre los parámetros estudiados, por ejemplo amplitud, fragmentación, estabilidad del ritmo, etc. Estas inconsistencias podrían ser un reflejo de que la temperatura, la posición y la actividad no están afectadas por los mismos factores genéticos y ambientales o que el ambiente tiene efectos desiguales entre las medidas.

El elevado efecto ambiental no compartido en algunos casos (por ejemplo, en la estabilidad interdiaria de la actividad) también puede ser el resultado de los artefactos o errores, específicamente asociados a medidas individuales. Por el contrario, al integrar los resultados, el TAP presenta resultados más consistentes en sus parámetros, con estimaciones más estables (heredabilidades entre el 39% y el 70%), lo que parece indicar una mayor precisión de la medida debido a que depende menos de efectos del azar.

Estudios anteriores han demostrado que la actividad física tiene un componente ambiental importante (28). En la actualidad, la actividad física medida por actimetría se utiliza para predecir la salud y la enfermedad. De hecho, muchos estudios han concluido que la fragmentación del ritmo de actividad está relacionada con la obesidad y la adiposidad central, alteraciones cerebrales (142), enfermedad cardiovascular (143), síntomas de depresión (139), el envejecimiento (138) y el riesgo de mortalidad (144).

En el TAP, los factores genéticos explican aproximadamente el 60% de la varianza en la fragmentación del ritmo de actividad (variabilidad intradiaria), lo que sugiere que tiene una dependencia (parcial) de los ritmos circadianos endógenos. Sin embargo, de acuerdo con nuestros resultados, la mayoría de los parámetros derivados de la actividad como el mesor, la amplitud y la prueba de Rayleigh, parecen estar en gran medida influenciados por factores ambientales no compartidos que también explican el error de la medición.

La posición del cuerpo se ha utilizado recientemente para medir el estado del sistema circadiano. En los últimos años, la posición relativa del cuerpo se ha correlacionado positivamente con la presión arterial sistólica y diastólica y se ha demostrado que cambiar de “estar de pie” a estar acostado durante la fase de reposo, podría estar implicado en la vasodilatación de los vasos sanguíneos periféricos lo que afectaría a la presión arterial (37). Además, esta variable ha sido útil en estudios genéticos de obesidad mostrando que las mujeres con sobrepeso portadoras del alelo menor (C) del gen *CLOCK 3111T/C* presentaron posiciones más acostadas (132). Nuestros resultados con respecto a la posición muestran una heredabilidad de baja a moderada con una heterogeneidad importante entre los parámetros obtenidos de ella, lo que sugiere que los factores ambientales son responsables de la mayor parte de la varianza de este fenotipo.

Estos resultados proporcionan un apoyo para el uso de la variable integrada TAP como un marcador del estado del sistema circadiano. Teniendo en cuenta que el TAP es el resultado de tres medidas complementarias, se puede suponer que proporciona una mejor representación del sistema circadiano en su conjunto en lugar de una sola medición, por ejemplo, la temperatura. La integración de las mediciones parece reducir el ruido y minimizar los errores, produciendo más estabilidad y reduciendo la heterogeneidad entre los índices. Por lo tanto, un efecto de esta integración podría ser ayudar a desentrañar los verdaderos efectos de entornos individuales de errores de medición y artefactos, que podrían ser probados en el futuro con procedimientos apropiados. Como posible efecto de esa homogeneización, las estimaciones de heredabilidad de sentido amplio para TAP son superiores al 40% para todos los parámetros. También se obtuvieron heredabilidades elevadas en la temperatura de la muñeca, especialmente en el Rayleigh y acrofase en comparación con otros parámetros derivados de la temperatura, pero las diferencias entre los parámetros fueron mayores.

Los parámetros obtenidos por TAP pueden clasificarse en a) aquellos que miden "valores", tales como el *mesor* que muestra una heredabilidad del 70%; b) aquellos que miden el "tiempo", tales como la *acrofase* que tenía una heredabilidad del 62%; C) aquellos que miden la "robustez", tales como la *amplitud*, la *amplitud relativa*, el *porcentaje del ritmo*, el *Rayleigh*, la *IV*, la *IS* y el *CFI*. Recordemos que el *Rayleigh* utiliza el análisis de cosinor al ajustar los datos del TAP a una onda sinusoidal, mientras que la *IS* mide la similitud de todo el patrón circadiano independientemente de la forma de la onda. Trabajos previos sugieren que la *IS* podría estar influenciada por factores ambientales (51). En esta tesis se muestra que al considerar las tres técnicas por separado (temperatura, actividad y posición), la influencia relativa de factores genéticos y ambientales tanto para el *Rayleigh* como para la *IS* varía dependiendo de la técnica. Sin

embargo, utilizando la variable de integración TAP, los efectos ambientales reducen su impacto y, en consecuencia, el componente genético tiene una magnitud similar tanto en Rayleigh como en IS. Como se ha mencionado anteriormente, una de las ventajas de la medición integrada TAP es la minimización de artefactos y errores de medición mediante el equilibrio de los efectos de las variables aisladas. Por lo tanto, el TAP muestra una mejora sustancial en la estabilidad en comparación con las técnicas circadianas individuales.

Con respecto al *CFI* (resume la regularidad (IS), la fragmentación (IV) y la amplitud del ritmo), la heredabilidad de TAP-CFI se estima en un 47%. Por el contrario, la de las mediciones individuales varía entre el 17% para la temperatura de la muñeca, el 33% para la posición corporal y el 35% para la actividad. Una vez más, la integración de las tres mediciones parece producir una reducción del ruido, aumentando así el peso relativo de los factores genéticos sobre la variabilidad del TAP. El CFI es especialmente importante porque proporciona información resumida sobre el sistema circadiano, lo que facilita la evaluación objetiva de la eficacia de los tratamientos para mejorar la cronodisrupción (51). Estos resultados, si se confirman en estudios futuros, son un paso importante en la búsqueda de evidencias para encontrar el menor número de mediciones necesarias para el monitoreo ambulatorio en la vida diaria, el cual puede usarse para proporcionar una estimación notablemente precisa del reloj interno en humanos (145, 146). Esta reducción es necesaria porque cuando se analiza independientemente cada variable y parámetro, la cantidad de datos es demasiado grande. Por lo tanto, el uso de técnicas como TAP, que sintetizan o condensan esta información, y el uso de índices, como el CFI, para unificar varios parámetros a la vez, sería extremadamente útil. La obtención de una variable que permita la clasificación cronobiológica de los sujetos cuando se trate de tratamientos clínicos, como la medicina del sueño, la psiquiatría u

otros dominios clínicos, representaría una base para conocer la fase circadiana endógena exacta y una ayuda para el momento preciso del tratamiento (51).

En resumen, nuestros resultados profundizan en el análisis de la heredabilidad del sistema circadiano mediante el uso de una técnica integradora como el TAP que proporciona resultados más precisos sobre el estado del sistema circadiano que la temperatura, la actividad y la posición de la muñeca analizados individualmente.

3. Sobre la determinación de las influencias genéticas y ambientales en la siesta y el patrón sueño-vigilia

En esta tesis se ha investigado por primera vez la contribución relativa de los factores genéticos y ambientales en la siesta. Además de la el TAP nos ha permitido estudiar la heredabilidad del sueño desde una nueva perspectiva, a diferencia de la polisomnografía, que es difícil de llevar a cabo en la vida real del individuo, y que es una técnica limitada a la evaluación de una noche, generalmente en hospital, el TAP permite medir características como la regularidad del sueño o su estabilidad, ya que nos permite medir el sueño durante periodos largos como durante 7 días, o más. Además, el TAP nos permite estudiar características diferentes que las que se estudian con la polisomnografía, que se refieren principalmente a la arquitectura del sueño, duración de la fase REM y no REM, número de despertares o apneas o hipoapneas. El TAP introduce un nuevo enfoque para el estudio de la heredabilidad del sueño, a través de la evaluación de: a) parámetros de robustez circadiana (es decir, *CFI*); b) tiempo de sueño, evaluado por la *acrophase*; c) valor de sueño, determinado por el *mesor*. La ventaja del TAP es que ofrece la posibilidad de evaluar la heredabilidad en condiciones de vida libre, sin interferir con la rutina del sujeto. Este conocimiento proporciona una visión única no sólo del sueño nocturno, sino también de la siesta o sueño diurno y mejora nuestra comprensión del

importante papel que desempeñan los factores genéticos en la calidad y duración del sueño (59, 64, 147).

La siesta es un aspecto novedoso a considerar en los estudios del sueño, debido a sus efectos sobre la salud son todavía polémicos. En particular, algunos estudios se han centrado en la asociación entre la siesta y la obesidad (73, 148). La duración de la siesta se considera un factor relevante en la obesidad, aquellos que durmieron la siesta durante más de una hora, exhibieron un aumento del 46% de la obesidad central (148). Además, Sayón-Orea *et al.* (73), determinaron en 2013 que la probabilidad de ser obeso fue mayor en personas que durmieron siestas de más de 30 minutos y tenían sueños nocturnos de menos de 5 horas. Este estudio demostró la implicación de hormonas relacionadas con el apetito, con valores más bajos de leptina, hormona que reduce el apetito, y valores más altos de ghrelina, hormona que aumenta el hambre, en aquellos que dormían una siestas más largas (73). Recientemente, se ha demostrado una correlación genética entre somnolencia diurna y los patrones de adiposidad (77). Estos resultados coinciden con los datos obtenidos en la presente tesis, que muestran que las siestas más largas se asocian con un mayor grado de obesidad (mayor IMC, mayor grasa corporal total y mayor grasa visceral).

Nuestros resultados sobre la duración de la siesta y del sueño diurno muestran una heredabilidad de moderada a alta (65% y 61% respectivamente), lo que sugiere una contribución importante del componente genético en la siesta, hábito común característico de los países mediterráneos, como España. Nuestros datos muestran una similitud mucho mayor entre las hermanas MZ que entre las hermanas DZ en el hecho dormir la siesta, así como en los minutos dormidos durante el día. Este fuerte efecto genético se refleja en el ritmo de 24h, ya que las gemelas MZ mostraron curvas de sueño

tanto diurnas como nocturnas muy similares entre las hermanas, mientras que las gemelas DZ mostraron más diferencias entre las hermanas.

Para la evaluación de la heredabilidad de la siesta, se utilizaron dos métodos diferentes: uno subjetivo medido por un registro de sueño, para la variable "siesta, si o no"; y otro objetivo para la variable "duración sueño diurno, es decir minutos dormidos" obtenido con el TAP. Cabe destacar que la contribución genética a la siesta obtenida por estos dos métodos fue similar. Es obvio que dormir la siesta no sólo depende de factores genéticos, sino también de los hábitos culturales y las condiciones ambientales, requiere un poco de tiempo libre y un espacio conveniente. Nuestros resultados sugieren que, cuando se cumplen estas condiciones (como es el caso de nuestra población), la somnolencia después de la comida del mediodía y la consiguiente necesidad de dormir siesta pueden tener influencias genéticas, así como la duración de este descanso.

Las características del sueño nocturno y la duración son otros aspectos a considerar en la necesidad de dormir siesta. Se sabe que el ritmo sueño-vigilia está regulado no sólo por el impulso circadiano (un reloj interno), sino también por el impulso homeostático, es decir la presión que produce en sí mismo el cansancio, que aumenta en el caso de un sueño insuficiente durante la noche anterior. Ambos factores homeostáticos y circadianos interactúan entre sí (149).

Un resultado importante de nuestros análisis fue que la heredabilidad la siesta fue significativa, a pesar de controlar por la duración del sueño nocturno. Esto sugiere que la heredabilidad de la siesta, está marcada por factores, distintos al de dormir siesta para compensar un sueño nocturno insuficiente, y quizás los genes que determinen el sueño nocturno y el diurno sean distintos entre ellos.

La duración del sueño nocturno es uno de los aspectos más estudiados, y tanto el sueño largo como el sueño corto se han relacionado con la obesidad, la saciedad, el

apetito y el equilibrio energético, con lo que se considera que la relación del sueño y la obesidad presenta una distribución de tipo “U” (150, 151). La duración nocturna del sueño también se ha relacionado con el riesgo metabólico (152) y el riesgo de enfermedad cardiovascular (153), así como con trastornos mentales como la esquizofrenia, la ansiedad y la depresión (154-156). La heredabilidad de la duración nocturna del sueño ha sido muy estudiada con EEG y polisomnografía, demostrando en varios trabajos que oscila entre el 50% y el 70% (78, 157). Recientemente, los análisis de asociación del genoma sobre la alteración del sueño han identificado nuevos *loci* y han replicado un *locus* previamente asociado con la duración del sueño (77).

Con el uso del TAP, hemos sido capaces de investigar aspectos novedosos del sueño. La evaluación del patrón de sueño de 24h medido de forma continua durante 7 días nos ha permitido diferenciar entre la duración del sueño nocturno, con una heredabilidad del 65% y la regularidad del sueño, que corresponde a la estabilidad interdiaria del sueño con un 57% de heredabilidad. Esta nueva variable de regularidad está siendo de gran interés en los estudios modernos del sueño, ya que la falta de regularidad en sí misma, parece ser un factor de riesgo de enfermedad.

Los factores genéticos que influyen sobre la duración del sueño (si el tiempo de sueño es más largo o más corto), puede que sean diferentes a los de su regularidad. Se deben realizar otros estudios de asociación del genoma para abordar esta cuestión.

Otro aspecto importante de la arquitectura del sueño son las características del sueño No REM, el sueño de ondas lenta tal y como se percibe en la los electroencefalogramas (EEG). Estudios anteriores con EEG han demostrado que la cantidad de sueño de onda lenta presenta heredabilidades del del 50% (78). Estos datos se asemejan a nuestros resultados obtenidos con TAP, que estiman que los factores genéticos de sueño de onda lenta presentan un 46% de la varianza.

Tal y como comentamos en el apartado anterior, los parámetros obtenidos del TAP, se pueden clasificar en tres grupos: a) los que miden la robustez; b) los relacionados con el tiempo; c) los que miden los parámetros "de valor". En este estudio analizamos:

a) En relación con el sueño, la heredabilidad de los parámetros de robustez circadiana como la *amplitud relativa*, el *CFI*, la *estabilidad interdiaria*, el *porcentaje del ritmo* y la *variabilidad intradiaria*, los cuales muestran factores genéticos que fluctúan entre el 36% y el 63%. La amplitud relativa, que determina los cambios entre el sueño máximo y el despertar, ha sido considerada como un indicador del envejecimiento biológico (79). Además, un patrón de sueño circadiano robusto debe ser regular y con una baja fragmentación. Estos aspectos se determinan respectivamente por la estabilidad interdiaria y la variabilidad intradiaria. La integración de estos tres parámetros (amplitud relativa, estabilidad interdiaria e variabilidad intradiaria) en el índice de funcionalidad circadiana (CFI) tiene una heredabilidad estimada de 58%, lo que sugiere que la robustez del sueño está en gran parte influenciada por factores genéticos.

b) La hora central del sueño nocturno, que se considera la fase más profunda del sueño, se evaluó con la *acrofase*, la cual es uno de los parámetros más importantes para la caracterización del sueño y está relacionada con diferentes patologías, como el tipo de fase avanzada de sueño familiar o la fase de sueño retrasada (158). Los resultados actuales estiman una heredabilidad del 52% para la acrofase en sueño nocturno.

c) Por último, el *mesor* es un parámetro de "valor" relacionado con los valores medidos de sueño (0 es para el totalmente despierto y 1 para el totalmente dormido). Para este parámetro, nuestros datos muestran una heredabilidad del 69%.

Resumiendo, esta tesis aporta asociaciones significativas y positivas entre la duración de la siesta y la obesidad. También se han mostrado heredabilidades significativas relacionadas con el ritmo de sueño circadiano en la mayoría de los

parámetros, utilizando una metodología que permite un monitoreo ambulatorio de medidas rítmicas objetivas. Cabe destacar que esta influencia genética aparece no sólo en la noche, sino también en los parámetros diurnos del sueño. Nuestros resultados representan un paso importante en el entendimiento del ritmo del sueño. Esta comprensión ha demostrado ser relevante para evaluar la condición de nuestro sistema cronobiológico, y su posible relación con varias patologías, como la obesidad.

4. Sobre la evaluación de las influencias genéticas y ambientales de factores relacionados con la hora de la comida en una población mediterránea de gemelas

Es interesante observar la persistencia de un patrón básico de comidas en diferentes culturas y épocas, conocido como el patrón de tres comidas al día: una toma por la mañana, otra al mediodía y otra por la noche, aunque en ocasiones se incorporen otras dos (a media mañana y a media tarde). Este patrón se ha observado incluso en seres humanos aislados de fuentes externas temporalmente, a los que se les permitía comer cuánto y cuándo quisieran. A pesar del aislamiento, prácticamente todos los individuos estudiados eligieron comer tres veces al día en intervalos comparables a los que siguen en la vida cotidiana. Esto se podría explicar debido a que un estudio llevado a cabo en el año 2001, por John M. de Castro (159) mostró que la hora media de la comida por la mañana, tarde y noche parecía ser hereditaria, representando el 24%, 18% y 22%, respectivamente. En esta tesis, comprobamos que el momento de la ingesta tiene una carga genética considerable, siendo del 57% para el desayuno y del 39% para la comida y la cena, valores que se asemejan a estudios previos.

En este sentido y en cuanto al comportamiento alimentario, una de las principales señales de apetito es el horario de la comida. Muchas veces se come en momentos

precisos simplemente porque es la hora de comer, sin sentir verdadero apetito. Además, algunos casos de obesidad se relacionan con ingestas específicas en determinadas horas del día. Así, Garaulet *et al.* observaron 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 (19). Además, este comportamiento alimentario se asocia con la variabilidad diaria de los valores de cortisol plasmático y con el grado de obesidad.

El cortisol es una hormona circadiana, y su presencia está fuertemente correlacionada con el momento de la ingesta de alimentos. Estudios previos demostraron que el horario de las comidas afecta a la concentración del cortisol que disminuyó en las comidas de la mañana y de madrugada, pero no durante la tarde-noche (87). También se ha demostrado que el aumento medio del cortisol plasmático después del despertar y la respuesta del cortisol al despertar tenían un componente genético que oscilaba entre el 40% y el 48% (160-162). Los datos obtenidos en esta tesis reflejan como la carga genética del horario del cortisol va disminuyendo conforme avanza el día, siendo de un 54 y 64 % en el desayuno y en la comida, y de un 33% en la cena.

Este marcador circadiano es importante en el campo de la alimentación y la obesidad ya que resultados previos han correlacionado la amplitud del cortisol con la obesidad abdominal (163), así como patrones circadianos de esta hormona con alteraciones metabólicas en la circunferencia de la cintura, la presión arterial, la glucosa en plasma y la regulación de lípidos.

Sin embargo, hasta los últimos años no se ha empezado a demostrar que el momento de la ingesta es un factor clave en la obesidad, que puede ser independiente de la ingesta calórica diaria. Así, un estudio longitudinal que se realizó en colaboración con la Unidad del Sueño de la Universidad de Harvard, dirigido por el profesor Frank Scheer y publicado en 2013 en la revista *International Journal of Obesity* se demostró que en

España, en una población mediterránea, el momento de la comida principal del día era predictivo de la pérdida de peso (86). Además, los resultados previos fueron sorprendentes, ya que tanto los que comían temprano (antes de las 15:00) como los que lo hacían más tarde presentaron ingestas y gastos energéticos semejantes, lo que hace necesario encontrar una explicación metabólica a estos resultados.

Con el fin de descubrir por qué el momento de la ingesta de alimentos podría influir en la pérdida de peso, se llevó a cabo un estudio aleatorizado en el que 32 mujeres delgadas y jóvenes completaron dos protocolos: uno que incluía evaluaciones de gasto energético en reposo (calorimetría indirecta) y la tolerancia a la glucosa, y el otro constaba de mediciones de patrones circadianos, como los perfiles de cortisol en la saliva y la temperatura de la muñeca. Las participantes recibieron comidas estandarizadas durante las 2 semanas de intervención, y se estudiaron en dos tiempos: comiendo temprano (a las 13:00h) y tarde (a las 16:30h). Los resultados mostraron que estas mujeres delgadas, después de una semana comiendo tarde, experimentaron alteraciones metabólicas que suelen caracterizar a las mujeres obesas, como disminución de la tolerancia a la glucosa, del gasto energético en reposo y de la oxidación de hidratos de carbono. Además, tenían un patrón diario de cortisol aplanado y alteraciones en los ritmos diarios de la temperatura similares a las que caracterizan a las mujeres obesas (22).

La importancia de estos dos estudios radica en que son los primeros trabajos que demuestran que no solo es el “qué” se come, sino también el “cuándo” es decisivo en la pérdida de peso. De hecho, es bien sabido que un horario regular de comidas ayuda a mantener el orden temporal interno del sistema circadiano, por lo que no es de extrañar que presenten una carga genética considerable. Sin embargo, en la sociedad actual de 24 horas hace que con frecuencia se abandonen estos patrones, no sólo, por ejemplo, por el trabajo por turnos y el jet-lag, sino también, y sobre todo en los jóvenes, por la creciente

demanda de estudio e incluso de ocio y placer, conocido como el jet-lag social.

En este ámbito, los horarios de sueño juegan un papel fundamental. Así, datos experimentales en seres humanos demostraron que una inversión de 12 horas del ciclo de ayuno/ayuno y del de sueño/vigilia (comer durante la noche y ayunar durante el día) se acompañaba de una alteración de la tolerancia a la glucosa y disminución de leptina (hormona de saciedad). Los resultados de esta tesis muestran un componente genético del 42% en la hora del despertar y de un 36% en la hora de acostarse. Dichos datos son consistentes que estudios previos que muestran que la duración del sueño aumenta las influencias genéticas en el IMC y sugirieren que una cantidad considerable del patrón de sueño es determinado genéticamente (59-62).

Por último, un estudio reciente ha demostrado que el cronotipo tiene una correlación 47% (56) con factores genéticos, y al mismo tiempo con el momento de la ingesta de alimentos. Este resultado tuvo en cuenta que los individuos de tipo nocturno tendían a comer más tarde (164) tenían más propensión a engordar y menos capacidad de perder peso (165) y eran comedores tardíos en general (86). Por lo tanto, los estudios sobre el componente genético del cronotipo se han convertido en preciadas fuentes de información para el estudio de los horarios de las comidas y su relación con la obesidad.

El estudio de la carga genética y ambiental de estos tipos de variables es fundamental, ya que con el análisis de los factores genéticos podríamos centrar nuestros objetivos en la investigación de polimorfismos o variantes genéticas para determinar las asociaciones causales en enfermedades como la obesidad. Por otra parte, con el análisis de los factores ambientales podríamos centrar nuestros objetivos en mejorar los métodos que actualmente se utilizan para resolver estas enfermedades, ya que hay terapias que utilizan la interacción entre los genes y el medio ambiente para tratarlas.

En la actualidad se sabe de la existencia de factores genéticos en el ritmo

circadiano. Estos factores genéticos no sólo se han demostrado, en esta tesis, con la temperatura, sino también con el cortisol (54, 166) y el cuestionario de vespertino-matutino (MEQ) (56, 59), etc. En este sentido, es importante entender cómo estos marcadores cronobiológicos pueden interactuar con la alimentación y qué papel importante juegan en el momento de la hora de la comida.

En resumen, gracias a este estudio hemos demostrado que con respecto a los horarios de comida así como de variables relacionadas como el horario del sueño, el cortisol y el cronotipo presentan un mayor componente genético en la mañana, el cual va disminuyendo conforme avanza el día, dando lugar a una mayor carga ambiental en la noche. Además, hemos podido comprobar que los valores en dichos horarios relacionados con la comida en la población mediterránea, son consistentes con otras poblaciones.

En la discusión de los resultados obtenidos en la influencia de factores genéticos y ambientales en la evaluación del sistema circadiano (puntos del 1-4 de esta discusión), debemos considerar algunas limitaciones de ámbito general en la población de gemelas. Un mayor tamaño de la muestra habría aumentado la potencia y habría permitido estimar más acuradamente y diferenciar entre los componentes genéticos y ambientales de los factores familiares en parámetros específicos. Adicionalmente, el hecho de que solo mujeres adultas participaron en este estudio, limita las conclusiones a este género y rango de edad. Dados los amplios intervalos de confianza de los parámetros, nuestros resultados deben considerarse con precaución. En la evaluación del sueño esto habría permitido la comparación entre los ritmos del sueño y las variables relacionadas con la salud.

5. Sobre el estudio de una variante génica de riesgo del *MTNR1B* y su impacto sobre enfermedades asociadas con la cronodisrupción como la diabetes

Los resultados actuales de esta tesis doctoral apoyan la hipótesis de que los valores altos de melatonina endógena por la noche, junto con la ingesta de alimentos, causan un empeoramiento en la tolerancia a la glucosa. El hecho de que este efecto sea mayor en los portadores homocigóticos del alelo de riesgo del SNP *MTNR1B* rs10830963 sugiere que la melatonina está implicada en el empeoramiento de la tolerancia a la glucosa.

Estos resultados tienen relevancia en la práctica clínica y en la salud pública, dado que: a) el alelo G de riesgo es altamente prevalente, con un aproximadamente 51% de individuos de ascendencia europea portadores de dicho alelo (MAF ~ 30%); b) los portadores de riesgo presentan un aumento de la expresión del receptor 1b de melatonina en los islotes pancreáticos (98, 102), lo cual implica una ganancia en la función de dicho receptor y con ello un aumento del riesgo de diabetes (104); y c) el alelo de riesgo del *MTNR1B* tiene uno de los efectos adversos más fuertes sobre la secreción y sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa de todas las asociaciones con la diabetes tipo 2 (DT2) conocidas hasta ahora (100, 101). Por estas razones, la señalización del *MTNR1B* se ha propuesto como objetivo terapéutico en la prevención de la DT2 (167).

Estudios clínicos previos controlados con placebo en humanos han demostrado que la administración exógena (farmacológica) de melatonina empeora la tolerancia a la glucosa por la mañana y por la noche, tanto en mujeres mayores (109) como en mujeres jóvenes (110). Además, se encontró que la variante de riesgo del *MTNR1B* rs10830963 empeora drásticamente el efecto de la melatonina exógena en la tolerancia a la glucosa (111). Estos resultados en su totalidad sugieren una vulnerabilidad en los portadores del alelo de riesgo del *MTNR1B* rs10830963 a la hora de consumir alimentos cuando los

valores de melatonina son elevados, sobretodo si los portadores del alelo de riesgo son comedores tardíos o trabajadores por turnos.

Sin embargo, hasta el momento no se había evaluado el impacto de las variantes del *MTNR1B* sobre el metabolismo de la glucosa cuando coincidían elevadas concentraciones endógenas (fisiológicas) de melatonina y la ingesta de alimentos, hecho que se observa en las poblaciones de comedores nocturnos como la española. El impacto de la melatonina endógena sobre el control de la glucosa es una cuestión importante y ampliamente relevante. Mientras que alrededor de 5-12 millones de personas en los EE.UU utilizan la melatonina exógena para tratar el problema del sueño (168), una proporción mayor de la población cena tarde como costumbre, momento en el que los valores de melatonina endógena son elevados, incluyendo no sólo en los aproximadamente 10 millones de trabajadores por turnos (169), sino que también la población general en la que cenar tarde parece ser aún más común de lo que se había estudiado previamente (170).

Mientras que los estudios epidemiológicos ya habían demostrado que cenar tarde se asociaba con una peor regulación de la glucosa, tales estudios no pueden asegurar si esto es debido a un hecho causal. Nuestro estudio experimental se ajustó específicamente para cada sujeto (según su hora habitual de sueño) y se demostró que interviniendo en la cena hacia un horario más tardío la tolerancia a la glucosa fue menor. Más importante aún, mostramos que las diferencias en dicha tolerancia a la glucosa entre el horario de cena temprano (baja melatonina) y el tardío (alta melatonina) se limita a los portadores del alelo de riesgo del *MTNR1B*. De hecho, entre los no portadores del alelo de riesgo, el horario de la cena no influyó significativamente en la tolerancia a la glucosa. Apoyados por el aumento en la expresión del receptor 1b de melatonina en los portadores del alelo de riesgo G (98), proporcionamos la primera evidencia de que la melatonina está

implicada en las alteraciones del metabolismo de la glucosa que se presentan principalmente en los comedores nocturnos.

Además de las diferencias en la presencia o ausencia de melatonina entre los cenadores tempranos o tardíos, puede haber otros factores implicados en las diferencias en la tolerancia a la glucosa. Dichos factores pueden ser los cambios diarios en la sensibilidad a la insulina y función gástrica, intestinal y pancreática (107, 108). Sin embargo, el hecho de que cenar tarde sólo perjudique la tolerancia a la glucosa en los portadores del alelo de riesgo del *MTNR1B* y no en los no portadores de dicho receptor evidencia de que la melatonina juega un papel importante como se puede apreciar en nuestros resultados.

Nuestros hallazgos novedosos nos llevan a recomendar cenar entre 2 y 4 horas antes del momento habitual de irse a dormir. Esto permitirá la recuperación de la glucemia postprandial a los valores de ayuno antes del aumento de los valores de melatonina endógena. La elevación de los valores de glucosa después de una comida puede tardar entre 1 y 2 horas en individuos normoglucémicos y más en individuos pre-diabéticos y diabéticos. En cambio, la melatonina comienza a subir sus concentraciones aproximadamente 2 horas antes de la hora habitual de acostarse. Con esta recomendación se evitaría la concurrencia entre las concentraciones elevadas de glucosa y melatonina.

Estos consejos pueden ser particularmente beneficiosos para muchas poblaciones como: a) aquellas sociedades occidentales que tienen la mayor ingesta de energía por la noche, como los canadienses (171) o los estadounidenses (172) los cuales consumen aproximadamente el 40% de la ingesta total de energía durante la cena (173); b) para aquellos países, incluidos algunos mediterráneos, en los que la cena se realiza a altas horas de la madrugada y en torno una hora antes de irse a dormir (88); c) aquellos que padecen el síndrome de comedor nocturno, que afecta entre el 0,5% y el 5,7% de la

población general (1); y d) para los trabajadores por turnos que representan el 15-20% de la población activa y con frecuencia suelen consumir alimentos en un momento atípico, es decir, a media noche o de madrugada (174). Dentro de estas poblaciones, estas recomendaciones deben dirigirse principalmente a los portadores del alelo de riesgo G que representan aproximadamente el 51% de la población con ascendencia europea.

La fuerza de este estudio incluye el diseño cruzado y aleatorizado realizado en una población de comedores tardíos naturales, en la selección de portadores y no portadores del alelo de riesgo homocigóticos, en la duración idéntica del ayuno y en las condiciones dietéticas previas a la cena el día del estudio. Una limitación de este trabajo es la falta de determinaciones de insulina en suero. Otros estudios deben evaluar efectos separados sobre la secreción de insulina, sensibilidad a la insulina, secreción de glucagón y otros factores implicados en la regulación de la tolerancia a la glucosa. En este estudio, decidimos evitar métodos invasivos como la punción venosa para no alterar las condiciones habituales de vida de las mujeres.

En resumen, estos hallazgos podrían apoyar una aplicación clínica para el cribado de este SNP y la posibilidad de implementar intervenciones de comportamiento adaptadas y costo-efectivas para prevenir la DT2 en poblaciones vulnerables.

CONCLUSIONES

(1) El ritmo de temperatura, muestra una heredabilidad de moderada a alta para la mayoría de sus parámetros, lo que sugiere una influencia genética. La presencia de estos factores genéticos apunta a la endogenicidad como la principal causa de la coincidencia entre los ritmos de las hermanas MZ. Sin embargo, aquellos parámetros dependientes de factores ambientales son más susceptibles de cambio a través de intervenciones externas.

(2) El análisis de la heredabilidad del sistema circadiano mediante el uso de una técnica integradora como el TAP, proporciona datos más precisos sobre el estado del sistema circadiano que la temperatura, la actividad y la posición de la muñeca. Con estos resultados demostramos que el uso de variables integradoras mejora la evaluación del sistema circadiano, aumentando la carga genética y reduciendo el efecto ambiental.

(3) Existe una asociación significativa y positiva entre la duración de la siesta y la obesidad. Además, el patrón sueño-vigilia muestra heredabilidades significativas tanto en el sueño nocturno como en el sueño diurno. Esta comprensión ha demostrado ser relevante para evaluar la condición de nuestro sistema cronobiológico, y su posible relación con varias patologías, como la obesidad.

(4) Los horarios de las comidas y de variables relacionadas como el horario del sueño, el cortisol y el cronotipo presentan un mayor componente genético en la mañana, el cual va disminuyendo conforme avanza el día, dando lugar a una mayor carga ambiental en la noche.

(5) Los resultados actuales apoyan nuestra hipótesis de que los valores elevados de melatonina en la noche, junto con la ingesta de alimentos, causan un deterioro en la tolerancia a la glucosa. Además, este efecto se empeora en portadores homocigóticos del alelo de riesgo del *MTNR1B* rs10830963. Estos datos sugieren el desarrollo de programas de intervención para avanzar la hora de la cena sobre todo en los portadores de a variante de riesgo para prevenir el desarrollo de diabetes tipo 2.

BIBLIOGRAFÍA

1. MC M-e, FM S, C F. The Clock That Time Us: Physiology of the Circadian Timing System. Harvard University Press, MA, USA. 1982.
2. J D. Observation Botanique. Historire de L'Academie Royale des Sciences, France. 1972:35-6.
3. Pittendrigh CS. Circadian systems. I. The driving oscillation and its assay in *Drosophila pseudoobscura*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1967;58(4):1762-7.
4. Reinberg AE, Lewy H, Smolensky M. The birth of chronobiology: Julien Joseph Virey 1814. Chronobiology international. 2001;18(2):173-86.
5. M G, P G-A, JA M. Chronobiology and obesity: the orchestra out of tune. Clinical Lipidology. 2010;5(2):181-8.
6. Buijs RM, Kreier F. The metabolic syndrome: a brain disease? Journal of neuroendocrinology. 2006;18(9):715-6.
7. Albrecht U, Eichele G. The mammalian circadian clock. Curr Opin Genet Dev. 2003;13(3):271-7.
8. Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, et al. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. Science (New York, NY). 1998;280(5369):1564-9.
9. Yoshitane H, Takao T, Satomi Y, Du NH, Okano T, Fukada Y. Roles of CLOCK phosphorylation in suppression of E-box-dependent transcription. Mol Cell Biol. 2009;29(13):3675-86.
10. Erren TC, Reiter RJ. Defining chronodisruption. Journal of pineal research. 2009;46(3):245-7.
11. Turner PL, Van Someren EJ, Mainster MA. The role of environmental light in sleep and health: effects of ocular aging and cataract surgery. Sleep medicine reviews. 2010;14(4):269-80.
12. Qin LQ, Li J, Wang Y, Wang J, Xu JY, Kaneko T. The effects of nocturnal life on endocrine circadian patterns in healthy adults. Life sciences. 2003;73(19):2467-75.
13. Rubio-Sastre P, Gomez-Abellan P, Martinez-Nicolas A, Ordovas JM, Madrid JA, Garaulet M. Evening physical activity alters wrist temperature circadian rhythmicity. Chronobiology international. 2014;31(2):276-82.
14. Garaulet M, Lee YC, Shen J, Parnell LD, Arnett DK, Tsai MY, et al. Genetic variants in human CLOCK associate with total energy intake and cytokine sleep factors in overweight subjects (GOLDN population). European journal of human genetics : EJHG. 2010;18(3):364-9.
15. Kondratov RV, Kondratova AA, Gorbacheva VY, Vykhovanets OV, Antoch MP. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. Genes & development. 2006;20(14):1868-73.
16. Milagro FI, Gomez-Abellan P, Campion J, Martinez JA, Ordovas JM, Garaulet M. CLOCK, PER2 and BMAL1 DNA methylation: association with obesity and metabolic syndrome characteristics and monounsaturated fat intake. Chronobiology international. 2012;29(9):1180-94.
17. Korkmaz A, Topal T, Tan DX, Reiter RJ. Role of melatonin in metabolic regulation. Rev Endocr Metab Disord. 2009;10(4):261-70.
18. Corbalan-Tutau D, Madrid JA, Nicolas F, Garaulet M. Daily profile in two circadian markers "melatonin and cortisol" and associations with metabolic syndrome components. Physiology & behavior. 2012.
19. Garaulet M, Lee YC, Shen J, Parnell LD, Arnett DK, Tsai MY, et al. CLOCK genetic variation and metabolic syndrome risk: modulation by monounsaturated fatty acids. The American journal of clinical nutrition. 2009;90(6):1466-75.

20. Kondratov RV. A role of the circadian system and circadian proteins in aging. *Ageing Res Rev.* 2007;6(1):12-27.
21. Carrasco-Benso MP, Rivero-Gutierrez B, Lopez-Minguez J, Anzola A, Diez-Noguera A, Madrid JA, et al. Human adipose tissue expresses intrinsic circadian rhythm in insulin sensitivity. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2016;30(9):3117-23.
22. Bandin C, Scheer FA, Luque AJ, Avila-Gandia V, Zamora S, Madrid JA, et al. Meal timing affects glucose tolerance, substrate oxidation and circadian-related variables: A randomized, crossover trial. *Int J Obes (Lond).* 2014.
23. 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(8):740-7.
24. Flint A, Raben A, Blundell JE, Astrup A. Reproducibility, power and validity of visual analogue scales in assessment of appetite sensations 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(1):38-48.
25. Garaulet M, Madrid JA. Methods for monitoring the functional status of the circadian system in dietary surveys studies: application criteria and interpretation of results. *Nutricion hospitalaria : organo oficial de la Sociedad Espanola de Nutricion Parenteral y Enteral.* 2015;31 Suppl 3:279-89.
26. Acebo C, Sadeh A, Seifer R, Tzischinsky O, Wolfson AR, Hafer A, et al. Estimating sleep patterns with activity monitoring in children and adolescents: how many nights are necessary for reliable measures? *Sleep.* 1999;22(1):95-103.
27. Morgenthaler TI, Lee-Chiong T, Alessi C, Friedman L, Aurora RN, Boehlecke B, et al. Practice parameters for the clinical evaluation and treatment of circadian rhythm sleep disorders. *An American Academy of Sleep Medicine report. Sleep.* 2007;30(11):1445-59.
28. den Hoed M, Brage S, Zhao JH, Westgate K, Nessa A, Ekelund U, et al. Heritability of objectively assessed daily physical activity and sedentary behavior. *The American journal of clinical nutrition.* 2013;98(5):1317-25.
29. Krauchi K. How is the circadian rhythm of core body temperature regulated? *Clinical autonomic research : official journal of the Clinical Autonomic Research Society.* 2002;12(3):147-9.
30. Waterhouse J, Drust B, Weinert D, Edwards B, Gregson W, Atkinson G, et al. The circadian rhythm of core temperature: origin and some implications for exercise performance. *Chronobiology international.* 2005;22(2):207-25.
31. Kolka M, Levine L, Stephenson L. Use of an ingestible telemetry sensor to measure core temperature under chemical protective clothing. *J Therm Biol.* 1997;22:343-9.
32. O'Brien C, Hoyt RW, Buller MJ, Castellani JW, Young AJ. Telemetry pill measurement of core temperature in humans during active heating and cooling. *Med Sci Sports Exerc.* 1998;30(3):468-72.
33. Byrne C, Lim CL. The ingestible telemetric body core temperature sensor: a review of validity and exercise applications. *Br J Sports Med.* 2007;41(3):126-33.
34. Sarabia JA, Rol MA, Mendiola P, Madrid JA. Circadian rhythm of wrist temperature in normal-living subjects A candidate of new index of the circadian system. *Physiology & behavior.* 2008;95(4):570-80.
35. Ortiz-Tudela E, Martinez-Nicolas A, Albares J, Segarra F, Campos M, Estivill E, et al. Ambulatory Circadian Monitoring (ACM) based on Thermometry, motor Activity

- and body Position (TAP): A comparison with polysomnography. *Physiology & behavior*. 2014;126C:30-8.
36. Bonmati-Carrion MA, Middleton B, Revell V, Skene DJ, Rol MA, Madrid JA. Circadian phase assessment by ambulatory monitoring in humans: correlation with dim light melatonin onset. *Chronobiology international*. 2014;31(1):37-51.
 37. 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(6):747-56.
 38. Corbalan-Tutau MD, Madrid JA, Ordovas JM, Smith CE, Nicolas F, Garaulet M. Differences in daily rhythms of wrist temperature between obese and normal-weight women: associations with metabolic syndrome features. *Chronobiology international*. 2011;28(5):425-33.
 39. 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.
 40. 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.
 41. 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(22):1989-95.
 42. Shilo L, Sabbah H, Hadari R, Kovatz S, Weinberg U, Dolev S, et al. The effects of coffee consumption on sleep and melatonin secretion. *Sleep medicine*. 2002;3(3):271-3.
 43. 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(11):1437-43.
 44. Cardinali DP, Pevet P. Basic aspects of melatonin action. *Sleep medicine reviews*. 1998;2(3):175-90.
 45. Dijk DJ, Cajochen C. Melatonin and the circadian regulation of sleep initiation, consolidation, structure, and the sleep EEG. *J Biol Rhythms*. 1997;12(6):627-35.
 46. Van Someren EJ, Nagtegaal E. Improving melatonin circadian phase estimates. *Sleep medicine*. 2007;8(6):590-601.
 47. Scheer FA, Buijs RM. Light affects morning salivary cortisol in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1999;84(9):3395-8.
 48. Garcia-Prieto MD, Tebar FJ, Nicolas F, Larque E, Zamora S, Garaulet M. Cortisol secretory pattern and glucocorticoid feedback sensitivity in women from a Mediterranean area: relationship with anthropometric characteristics, dietary intake and plasma fatty acid profile. *Clinical endocrinology*. 2007;66(2):185-91.
 49. 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(5):E1147-53.
 50. Wilhelm FH, Grossman P. Emotions beyond the laboratory: theoretical fundamentals, study design, and analytic strategies for advanced ambulatory assessment. *Biological psychology*. 2010;84(3):552-69.
 51. Ortiz-Tudela E, Martinez-Nicolas A, Campos M, Rol MA, Madrid JA. A new integrated variable based on thermometry, actimetry and body position (TAP) to evaluate circadian system status in humans. *PLoS Comput Biol*. 2010;6(11):e1000996.
 52. Ortiz-Tudela E, Martinez-Nicolas A, Albares J, Segarra F, Campos M, Estivill E, et al. Ambulatory circadian monitoring (ACM) based on thermometry, motor activity and

- body position (TAP): a comparison with polysomnography. *Physiology & behavior*. 2014;126:30-8.
53. Zornoza-Moreno M, Fuentes-Hernandez S, Sanchez-Solis M, Rol MA, Larque E, Madrid JA. Assessment of circadian rhythms of both skin temperature and motor activity in infants during the first 6 months of life. *Chronobiology international*. 2011;28(4):330-7.
 54. Linkowski P, Van Onderbergen A, Kerkhofs M, Bosson D, Mendlewicz J, Van Cauter E. Twin study of the 24-h cortisol profile: evidence for genetic control of the human circadian clock. *The American journal of physiology*. 1993;264(2 Pt 1):E173-81.
 55. Degaute JP, Van Cauter E, van de Borne P, Linkowski P. Twenty-four-hour blood pressure and heart rate profiles in humans. A twin study. *Hypertension*. 1994;23(2):244-53.
 56. Vink JM, Groot AS, Kerkhof GA, Boomsma DI. Genetic analysis of morningness and eveningness. *Chronobiology international*. 2001;18(5):809-22.
 57. Horne JA, Ostberg O. A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. *Int J Chronobiol*. 1976;4(2):97-110.
 58. Hur YM. Stability of genetic influence on morningness-eveningness: a cross-sectional examination of South Korean twins from preadolescence to young adulthood. *Journal of sleep research*. 2007;16(1):17-23.
 59. Barclay NL, Eley TC, Buysse DJ, Archer SN, Gregory AM. Diurnal preference and sleep quality: same genes? A study of young adult twins. *Chronobiology international*. 2010;27(2):278-96.
 60. de Castro JM. The influence of heredity on self-reported sleep patterns in free-living humans. *Physiology & behavior*. 2002;76(4-5):479-86.
 61. Watson NF, Buchwald D, Vitiello MV, Noonan C, Goldberg J. A twin study of sleep duration and body mass index. *Journal of clinical sleep medicine : JCSM : official publication of the American Academy of Sleep Medicine*. 2010;6(1):11-7.
 62. Gottlieb DJ, O'Connor GT, Wilk JB. Genome-wide association of sleep and circadian phenotypes. *BMC medical genetics*. 2007;8 Suppl 1:S9.
 63. Watson NF, Goldberg J, Arguelles L, Buchwald D. Genetic and environmental influences on insomnia, daytime sleepiness, and obesity in twins. *Sleep*. 2006;29(5):645-9.
 64. Barclay NL, Eley TC, Maughan B, Rowe R, Gregory AM. Associations between diurnal preference, sleep quality and externalizing behaviours: a behavioural genetic analysis. *Psychological medicine*. 2011;41(5):1029-40.
 65. Barclay NL, Thalia CE, Buysse DJ, Rijdsdijk FV, Gregory AM. Genetic and Environmental Influences on Different Components of the Pittsburgh Sleep Quality Index and their Overlap. *Sleep*. 2010;33(5):659-68.
 66. Naska A, Oikonomou E, Trichopoulou A, Psaltopoulou T, Trichopoulos D. Siesta in healthy adults and coronary mortality in the general population. *Archives of internal medicine*. 2007;167(3):296-301.
 67. Tamaki M, Shirota A, Hayashi M, Hori T. Restorative effects of a short afternoon nap (<30 min) in the elderly on subjective mood, performance and eeg activity. *Sleep Res Online*. 2000;3(3):131-9.
 68. Ruggiero JS, Redeker NS. Effects of napping on sleepiness and sleep-related performance deficits in night-shift workers: a systematic review. *Biol Res Nurs*. 2014;16(2):134-42.
 69. Cai M, Huang Y, Sun X, He Y, Sun C. Siesta is associated with reduced systolic blood pressure level and decreased prevalence of hypertension in older adults. *Journal of human hypertension*. 2016;30(3):216-8.

70. Xu Q, Song Y, Hollenbeck A, Blair A, Schatzkin A, Chen H. Day napping and short night sleeping are associated with higher risk of diabetes in older adults. *Diabetes care*. 2010;33(1):78-83.
71. Gao J, Huang X, Park Y, Hollenbeck A, Blair A, Schatzkin A, et al. Daytime napping, nighttime sleeping, and Parkinson disease. *Am J Epidemiol*. 2011;173(9):1032-8.
72. Campos H, Siles X. Siesta and the risk of coronary heart disease: results from a population-based, case-control study in Costa Rica. *International journal of epidemiology*. 2000;29(3):429-37.
73. Sayon-Orea C, Bes-Rastrollo M, Carlos S, Beunza JJ, Basterra-Gortari FJ, Martinez-Gonzalez MA. Association between sleeping hours and siesta and the risk of obesity: the SUN Mediterranean Cohort. *Obesity facts*. 2013;6(4):337-47.
74. Patel SR, Hu FB. Short sleep duration and weight gain: a systematic review. *Obesity (Silver Spring)*. 2008;16(3):643-53.
75. Patel SR, Hayes AL, Blackwell T, Evans DS, Ancoli-Israel S, Wing YK, et al. The association between sleep patterns and obesity in older adults. *Int J Obes (Lond)*. 2014;38(9):1159-64.
76. Ruiz N, Rangel A, Rodriguez C, Rodriguez L, Rodriguez V. Relationship among nocturnal sleep deficit, excess weight and metabolic alterations in adolescents. *Archivos argentinos de pediatria*. 2014;112(6):511-8.
77. Lane JM, Liang J, Vlasac I, Anderson SG, Bechtold DA, Bowden J, et al. Genome-wide association analyses of sleep disturbance traits identify new loci and highlight shared genetics with neuropsychiatric and metabolic traits. *Nature genetics*. 2016.
78. Linkowski P, Kerkhofs M, Hauspie R, Susanne C, Mendlewicz J. EEG sleep patterns in man: a twin study. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*. 1989;73(4):279-84.
79. Huang YL, Liu RY, Wang QS, Van Someren EJ, Xu H, Zhou JN. Age-associated difference in circadian sleep-wake and rest-activity rhythms. *Physiology & behavior*. 2002;76(4-5):597-603.
80. Barclay NL, Eley TC, Buysse DJ, Rijdsdijk FV, Gregory AM. Genetic and environmental influences on different components of the Pittsburgh Sleep Quality Index and their overlap. *Sleep*. 2010;33(5):659-68.
81. Ancoli-Israel S, Cole R, Alessi C, Chambers M, Moorcroft W, Pollak CP. The role of actigraphy in the study of sleep and circadian rhythms. *Sleep*. 2003;26(3):342-92.
82. De Gennaro L, Ferrara M, Vecchio F, Curcio G, Bertini M. An electroencephalographic fingerprint of human sleep. *NeuroImage*. 2005;26(1):114-22.
83. Arble DM, Bass J, Laposky AD, Vitaterna MH, Turek FW. Circadian timing of food intake contributes to weight gain. *Obesity (Silver Spring)*. 2009;17(11):2100-2.
84. Sherman H, Genzer Y, Cohen R, Chapnik N, Madar Z, Froy O. Timed high-fat diet resets circadian metabolism and prevents obesity. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2012;26(8):3493-502.
85. St-Onge MP, Ard J, Baskin ML, Chiuve SE, Johnson HM, Kris-Etherton P, et al. Meal Timing and Frequency: Implications for Cardiovascular Disease Prevention: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 2017;135(9):e96-e121.
86. Garaulet M, Gomez-Abellan P, Alburquerque-Bejar JJ, Lee YC, Ordovas JM, Scheer FA. Timing of food intake predicts weight loss effectiveness. *Int J Obes (Lond)*. 2013;37(4):604-11.

87. Holmback U, Forslund A, Lowden A, Forslund J, Akerstedt T, Lennernas M, et al. Endocrine responses to nocturnal eating--possible implications for night work. *Eur J Nutr.* 2003;42(2):75-83.
88. Corbalan-Tutau MD, Madrid JA, Garaulet M. Timing and duration of sleep and meals in obese and normal weight women. Association with increase blood pressure. *Appetite.* 2012;59(1):9-16.
89. Neale M, Cardon L. Methodology for genetic studies of twins and families: Springer; 1992.
90. Plomin R, DeFries J, MacClearn G, McGuffin P. *Genética de la conducta.* 5th ed. Barcelona: Ariel; 2008.
91. Bouchard T, Propping P. *Twins as a tool of behavioral genetics.* New York: John Wiley & Sons. 1993.
92. Flint J, Greenspan RJ, Kendler KS. *How genes influence behavior.* Oxford University Press. 2010.
93. Holliday R. Epigenetics: an overview. *Dev Genet.* 1994;15(6):453-7.
94. Verweij KH, Mosing M, Zietsch B, Medland SE-. Estimating heritability from twin studies. *Statistical human genetics: methods and protocols.* New York, United States: Humana Press. 2012:151-70.
95. Plomin R, DeFries J, MacClearn G, McGuffin P. *Genética de la conducta.* 4th ed. 2002.
96. Sullivan PF. The psychiatric GWAS consortium: big science comes to psychiatry. *Neuron.* 2010;68(2):182-6.
97. Pearson TA, Manolio TA. How to interpret a genome-wide association study. *JAMA : the journal of the American Medical Association.* 2008;299(11):1335-44.
98. Lyssenko V, Nagorny CL, Erdos MR, Wierup N, Jonsson A, Spegel P, et al. Common variant in MTNR1B associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion. *Nature genetics.* 2009;41(1):82-8.
99. Prokopenko I, Langenberg C, Florez JC, Saxena R, Soranzo N, Thorleifsson G, et al. Variants in MTNR1B influence fasting glucose levels. *Nature genetics.* 2009;41(1):77-81.
100. Jonsson A, Ladenvall C, Ahluwalia TS, Kravic J, Krus U, Taneera J, et al. Effects of common genetic variants associated with type 2 diabetes and glycemic traits on alpha- and beta-cell function and insulin action in humans. *Diabetes.* 2013;62(8):2978-83.
101. Replication DIG, Meta-analysis C, Asian Genetic Epidemiology Network Type 2 Diabetes C, South Asian Type 2 Diabetes C, Mexican American Type 2 Diabetes C, Type 2 Diabetes Genetic Exploration by Next-generation sequencing in multi-Ethnic Samples C, et al. Genome-wide trans-ancestry meta-analysis provides insight into the genetic architecture of type 2 diabetes susceptibility. *Nature genetics.* 2014;46(3):234-44.
102. Tuomi T, Nagorny CL, Singh P, Bennet H, Yu Q, Alenkvist I, et al. Increased Melatonin Signaling Is a Risk Factor for Type 2 Diabetes. *Cell metabolism.* 2016;23(6):1067-77.
103. Karamitri A, Renault N, Clement N, Guillaume JL, Jockers R. Minireview: Toward the establishment of a link between melatonin and glucose homeostasis: association of melatonin MT2 receptor variants with type 2 diabetes. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md).* 2013;27(8):1217-33.
104. Gaulton KJ, Ferreira T, Lee Y, Raimondo A, Magi R, Reschen ME, et al. Genetic fine mapping and genomic annotation defines causal mechanisms at type 2 diabetes susceptibility loci. *Nature genetics.* 2015;47(12):1415-25.
105. Gallant A, Lundgren J, Drapeau V. Nutritional Aspects of Late Eating and Night Eating. *Curr Obes Rep.* 2014;3(1):101-7.

106. Nakajima K, Suwa K. Association of hyperglycemia in a general Japanese population with late-night-dinner eating alone, but not breakfast skipping alone. *J Diabetes Metab Disord.* 2015;14:16.
107. Hoogerwerf WA. Biologic clocks and the gut. *Curr Gastroenterol Rep.* 2006;8(5):353-9.
108. Allaman-Pillet N, Roduit R, Oberson A, Abdelli S, Ruiz J, Beckmann JS, et al. Circadian regulation of islet genes involved in insulin production and secretion. *Molecular and cellular endocrinology.* 2004;226(1-2):59-66.
109. Cagnacci A, Arangino S, Renzi A, Paoletti AM, Melis GB, Cagnacci P, et al. Influence of melatonin administration on glucose tolerance and insulin sensitivity of postmenopausal women. *Clinical endocrinology.* 2001;54(3):339-46.
110. Rubio-Sastre P, Scheer FA, Gomez-Abellan P, Madrid JA, Garaulet M. Acute melatonin administration in humans impairs glucose tolerance in both the morning and evening. *Sleep.* 2014;37(10):1715-9.
111. Garaulet M, Gomez-Abellan P, Rubio-Sastre P, Madrid JA, Saxena R, Scheer FA. Common type 2 diabetes risk variant in MTNR1B worsens the deleterious effect of melatonin on glucose tolerance in humans. *Metabolism: clinical and experimental.* 2015;64(12):1650-7.
112. Ordonana JR, Perez-Riquelme F, Gonzalez-Javier F, Carrillo E, Gomez-Amor J, Martinez-Selva JM. An initiative in Spain for the study of women's health: the Murcia Twin Registry. *Twin Res Hum Genet.* 2006;9(6):865-7.
113. Ordonana JR, Rebollo-Mesa I, Carrillo E, Colodro-Conde L, Garcia-Palomo FJ, Gonzalez-Javier F, et al. The Murcia Twin Registry: a population-based registry of adult multiples in Spain. *Twin Res Hum Genet.* 2013;16(1):302-6.
114. Ferrario VF, Sforza C, Schmitz JH, Miani A, Jr., Taroni G. Fourier analysis of human soft tissue facial shape: sex differences in normal adults. *J Anat.* 1995;187 (Pt 3):593-602.
115. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association.* 2006;23(5):469-80.
116. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation.* 2009;120(16):1640-5.
117. Adan A, H A. Adaptation and standardization of a Spanish version of the morningness-eveningness questionnaire: Individual differences. *Pers Indiv Differ.* 1990;11:1223-30.
118. Kirschbaum C, Hellhammer DH. Salivary cortisol in psychoneuroendocrine research: recent developments and applications. *Psychoneuroendocrinology.* 1994;19(4):313-33.
119. Van Someren EJ, Swaab DF, Colenda CC, Cohen W, McCall WV, Rosenquist PB. Bright light therapy: improved sensitivity to its effects on rest-activity rhythms in Alzheimer patients by application of nonparametric methods. *Chronobiology international.* 1999;16(4):505-18.
120. Livak KJ. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Anal.* 1999;14(5-6):143-9.
121. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006;27(2-3):95-125.

122. SR. S, SS. S. Impact of rank-based normalizing transformations on the accuracy of test scores. *Journal of Modern Applied Statistical Methods*. 2009;8:448–62.
123. Falconer D, Mackay T. *Introduction to Quantitative Genetics*: Longman, Harlow, UK; 1996.
124. Posthuma D, Beem AL, de Geus EJ, van Baal GC, von Hjelmberg JB, Iachine I, et al. Theory and practice in quantitative genetics. *Twin Res*. 2003;6(5):361-76.
125. Neale M, Boker S, Xie G, Maes H. *Mx: Statistical modeling (7th Ed)*2006.
126. Lavie P. Ultradian rhythms: Gates of sleep and wakefulness. *Experimental Brain Research*. 1985;12:148–64.
127. Koskenvuo M, Hublin C, Partinen M, Heikkila K, Kaprio J. Heritability of diurnal type: a nationwide study of 8753 adult twin pairs. *Journal of sleep research*. 2007;16(2):156-62.
128. Partinen M, Kaprio J, Koskenvuo M, Putkonen P, Langinvainio H. Genetic and environmental determination of human sleep. *Sleep*. 1983;6(3):179-85.
129. Watson NF, Harden KP, Buchwald D, Vitiello MV, Pack AI, Weigle DS, et al. Sleep duration and body mass index in twins: a gene-environment interaction. *Sleep*. 2012;35(5):597-603.
130. Klei L, Reitz P, Miller M, Wood J, Maendel S, Gross D, et al. Heritability of morningness-eveningness and self-report sleep measures in a family-based sample of 521 hutterites. *Chronobiology international*. 2005;22(6):1041-54.
131. Jauch-Chara K, Hallschmid M, Gais S, Oltmanns KM, Peters A, Born J, et al. Awakening and counterregulatory response to hypoglycemia during early and late sleep. *Diabetes*. 2007;56(7):1938-42.
132. Bandin C, Martinez-Nicolas A, Ordovas JM, Ros Lucas JA, Castell P, Silvente T, et al. Differences in circadian rhythmicity in CLOCK 3111T/C genetic variants in moderate obese women as assessed by thermometry, actimetry and body position. *Int J Obes (Lond)*. 2013;37(8):1044-50.
133. Roenneberg T, Kuehnle T, Juda M, Kantermann T, Allebrandt K, Gordijn M, et al. Epidemiology of the human circadian clock. *Sleep medicine reviews*. 2007;11(6):429-38.
134. Kistler A, Mariauzouls C, von Berlepsch K. Fingertip temperature as an indicator for sympathetic responses. *Int J Psychophysiol*. 1998;29(1):35-41.
135. Raymann RJ, Swaab DF, Van Someren EJ. Skin temperature and sleep-onset latency: changes with age and insomnia. *Physiology & behavior*. 2007;90(2-3):257-66.
136. Corbalan-Tutau D, Madrid JA, Nicolas F, Garaulet M. Daily profile in two circadian markers "melatonin and cortisol" and associations with metabolic syndrome components. *Physiology & behavior*. 2014;123:231-5.
137. van Someren EJ, Mirmiran M, Swaab DF. Non-pharmacological treatment of sleep and wake disturbances in aging and Alzheimer's disease: chronobiological perspectives. *Behav Brain Res*. 1993;57(2):235-53.
138. Luik AI, Zuurbier LA, Hofman A, Van Someren EJ, Tiemeier H. Stability and fragmentation of the activity rhythm across the sleep-wake cycle: the importance of age, lifestyle, and mental health. *Chronobiology international*. 2013;30(10):1223-30.
139. Carvalho-Bos SS, Riemersma-van der Lek RF, Waterhouse J, Reilly T, Van Someren EJ. Strong association of the rest-activity rhythm with well-being in demented elderly women. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2007;15(2):92-100.
140. Schwartz MD, Wotus C, Liu T, Friesen WO, Borjigin J, Oda GA, et al. Dissociation of circadian and light inhibition of melatonin release through forced desynchronization in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(41):17540-5.

141. de la Iglesia HO, Cambras T, Schwartz WJ, Diez-Noguera A. Forced desynchronization of dual circadian oscillators within the rat suprachiasmatic nucleus. *Current biology : CB*. 2004;14(9):796-800.
142. Oosterman JM, van Someren EJ, Vogels RL, Van Harten B, Scherder EJ. Fragmentation of the rest-activity rhythm correlates with age-related cognitive deficits. *Journal of sleep research*. 2009;18(1):129-35.
143. Paudel ML, Taylor BC, Ancoli-Israel S, Stone KL, Tranah G, Redline S, et al. Rest/activity rhythms and cardiovascular disease in older men. *Chronobiology international*. 2011;28(3):258-66.
144. Zuurbier LA, Luik AI, Hofman A, Franco OH, Van Someren EJ, Tiemeier H. Fragmentation and stability of circadian activity rhythms predict mortality: the Rotterdam study. *Am J Epidemiol*. 2015;181(1):54-63.
145. Kolodyazhniy V, Spati J, Frey S, Gotz T, Wirz-Justice A, Krauchi K, et al. Estimation of human circadian phase via a multi-channel ambulatory monitoring system and a multiple regression model. *J Biol Rhythms*. 2011;26(1):55-67.
146. Kolodyazhniy V, Spati J, Frey S, Gotz T, Wirz-Justice A, Krauchi K, et al. An improved method for estimating human circadian phase derived from multichannel ambulatory monitoring and artificial neural networks. *Chronobiology international*. 2012;29(8):1078-97.
147. Barclay NL, Gregory AM. Quantitative genetic research on sleep: a review of normal sleep, sleep disturbances and associated emotional, behavioural, and health-related difficulties. *Sleep medicine reviews*. 2013;17(1):29-40.
148. Lin D, Sun K, Li F, Qi Y, Ren M, Huang C, et al. Association between habitual daytime napping and metabolic syndrome: a population-based study. *Metabolism: clinical and experimental*. 2014;63(12):1520-7.
149. Daan S, Beersma DG, Borbely AA. Timing of human sleep: recovery process gated by a circadian pacemaker. *The American journal of physiology*. 1984;246(2 Pt 2):R161-83.
150. Spiegel K, Tasali E, Penev P, Van Cauter E. Brief communication: Sleep curtailment in healthy young men is associated with decreased leptin levels, elevated ghrelin levels, and increased hunger and appetite. *Annals of internal medicine*. 2004;141(11):846-50.
151. Spiegel K, Leproult R, L'Hermite-Baleriaux M, Copinschi G, Penev PD, Van Cauter E. Leptin levels are dependent on sleep duration: relationships with sympathovagal balance, carbohydrate regulation, cortisol, and thyrotropin. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004;89(11):5762-71.
152. Sayin FK, Buyukinan M. Sleep Duration and Media Time Have a Major Impact on Insulin Resistance and Metabolic Risk Factors in Obese Children and Adolescents. *Childhood obesity*. 2016;12(4):272-8.
153. Covassin N, Singh P. Sleep Duration and Cardiovascular Disease Risk: Epidemiologic and Experimental Evidence. *Sleep Med Clin*. 2016;11(1):81-9.
154. Chan MS, Chung KF, Yung KP, Yeung WF. Sleep in schizophrenia: A systematic review and meta-analysis of polysomnographic findings in case-control studies. *Sleep medicine reviews*. 2017;32:69-84.
155. Langsrud K, Vaaler AE, Kallestad H, Morken G. Sleep patterns as a predictor for length of stay in a psychiatric intensive care unit. *Psychiatry research*. 2016;237:252-6.
156. Supartini A, Honda T, Basri NA, Haeuchi Y, Chen S, Ichimiya A, et al. The Impact of Sleep Timing, Sleep Duration, and Sleep Quality on Depressive Symptoms and Suicidal Ideation amongst Japanese Freshmen: The EQU SITE Study. *Sleep disorders*. 2016;2016:8737654.

157. Linkowski P, Kerkhofs M, Hauspie R, Mendlewicz J. Genetic determinants of EEG sleep: a study in twins living apart. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*. 1991;79(2):114-8.
158. Hida A, Kitamura S, Mishima K. Pathophysiology and pathogenesis of circadian rhythm sleep disorders. *Journal of physiological anthropology*. 2012;31:7.
159. de Castro JM. Heritability of diurnal changes in food intake in free-living humans. *Nutrition*. 2001;17(9):713-20.
160. Steptoe A, van Jaarsveld CH, Semmler C, Plomin R, Wardle J. Heritability of daytime cortisol levels and cortisol reactivity in children. *Psychoneuroendocrinology*. 2009;34(2):273-80.
161. Franz CE, York TP, Eaves LJ, Mendoza SP, Hauger RL, Hellhammer DH, et al. Genetic and environmental influences on cortisol regulation across days and contexts in middle-aged men. *Behavior genetics*. 2010;40(4):467-79.
162. Custodio RJ, Junior CE, Milani SL, Simoes AL, de Castro M, Moreira AC. The emergence of the cortisol circadian rhythm in monozygotic and dizygotic twin infants: the twin-pair synchrony. *Clinical endocrinology*. 2007;66(2):192-7.
163. Lee MJ, Pramyothin P, Karastergiou K, Fried SK. Deconstructing the roles of glucocorticoids in adipose tissue biology and the development of central obesity. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1842(3):473-81.
164. Lucassen EA, Zhao X, Rother KI, Mattingly MS, Courville AB, de Jonge L, et al. Evening chronotype is associated with changes in eating behavior, more sleep apnea, and increased stress hormones in short sleeping obese individuals. *PloS one*. 2013;8(3):e56519.
165. 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;36(11):1436-41.
166. Young EA, Aggen SH, Prescott CA, Kendler KS. Similarity in saliva cortisol measures in monozygotic twins and the influence of past major depression. *Biol Psychiatry*. 2000;48(1):70-4.
167. Matuszek MA, Anton A, Thillainathan S, Armstrong NJ. Increased Insulin following an Oral Glucose Load, Genetic Variation near the Melatonin Receptor MTNR1B, but No Biochemical Evidence of Endothelial Dysfunction in Young Asian Men and Women. *PloS one*. 2015;10(7):e0133611.
168. Foundation NS. Adult sleep habits and styles. *Sleep In America Polls*. 2005.
169. Workers on Flexible and Shift Schedules in 2004 Summary. Washington, DC: Bureau of Labor Statistics. 2005.
170. Mattson MP, Allison DB, Fontana L, Harvie M, Longo VD, Malaisse WJ, et al. Meal frequency and timing in health and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(47):16647-53.
171. Garriguet D. Canadians' eating habits. *Health Rep*. 2007;18(2):17-32.
172. Wang JB, Patterson RE, Ang A, Emond JA, Shetty N, Arab L. Timing of energy intake during the day is associated with the risk of obesity in adults. *Journal of human nutrition and dietetics : the official journal of the British Dietetic Association*. 2014;27 Suppl 2:255-62.
173. Reid KJ, Baron KG, Zee PC. Meal timing influences daily caloric intake in healthy adults. *Nutrition research (New York, NY)*. 2014;34(11):930-5.
174. Haus E, Smolensky M. Biological clocks and shift work: circadian dysregulation and potential long-term effects. *Cancer Causes Control*. 2006;17(4):489-500.

ANEXOS

Tabla 1. Características generales de la población de gemelas estudiada.

	Monozigóticas (n=56)	Dizigóticas (n=50)	Valor P
Edad (años)	51±6	53±6	0,066
Peso (kg)	64,12±8,56	63,44±7,91	0,370
Altura (cm)	156,43±6,84	157,52±5,61	0,369
IMC (kg/m²)	26,30±3,89	25,66±3,65	0,404
Porcentaje de grasa (%)	32,99±5,89	32,96±6,72	0,979
Cintura (cm)	90,56±8,76	90,08±10,66	0,805
Cadera (cm)	103,68±7,15	102,39±8,10	0,379
Metabolismo basal (kcal)	1282±101	1267±79	0,382
Características del sueño diurno			
Duermen siesta (cuestionario) (%)	63%	60%	0,540
Duración siesta (cuestionario) (mm)	51±23	49±26	0,744
Duración siesta (medida por TAP) (mm)	49,3±37,3	41,1±31,6	0,296
Características del sueño nocturno			
Hora de acostarse (cuestionario) (hh:mm)	24:18±00:56	24:28±00:59	0,288
Hora de levantarse (cuestionario) (hh:mm)	07:33±01:09	07:38±01:00	0,684
Duración sueño (cuestionario) (hh:mm)	6:32±0:52	6:47±1:04	0,159
Duración sueño (medido por TAP) (hh:mm)	7:08±0,53	7:13±0:55	0,691
Características de la ingesta de alimentos			
Inicio del desayuno	08:49±00:54	08:36±00:52	0,209
Inicio de la comida	14:31±00:33	14:32±00:30	0,904
Inicio de la cena	21:36±00:40	21:22±00:41	0,072
Características del cortisol			
Cortisol 9:00h	33,77±19,86	21,57±10,07	0,001
Cortisol 14:00h	15,88±8,38	12,16±4,86	0,019
Cortisol 23:00h	7,55±1,15	7,64±1,01	0,024
Ratio del cortisol mañana/noche (nmol/l)	5,06±2,88	4,69±2,61	0,568
Cuestionario vespertino-matutino (SCORE)			
Matutino	20 (36%)	22 (44%)	0,389
Indefinido	33 (59%)	24 (48%)	0,264
Vespertino	3 (5%)	4 (8%)	0,589

Los datos están representados como la media±SD. La hora de acostarse y la duración del sueño están expresados como horas y minutos. Abreviaciones: IMC, índice de masa corporal.

Tabla 2. Características generales de la población ONTIME-DINE.

	Población total (GG+CC) (n=40)	Alelo de riesgo (GG) (n=20)	No alelo de riesgo (CC) (n=20)	Valor <i>P</i>
Edad (años)	42±10	42±9	42±11	0,999
Peso (kg)	75,56±11,30	75,26±9,74	75,86±12,93	0,870
IMC (kg/m)	28,42±4,04	29,34±3,71	27,50±4,23	0,151
Grasa (%)	33,87±5,93	34,72±5,33	33,02±6,50	0,373
Cintura (cm)	97,21±9,75	98,10±7,18	96,32±11,91	0,571
Cadera (cm)	110,36±8,19	110,80±7,65	109,92±8,87	0,740
WHR	0,86±0,07	0,86±0,08	0,86±0,06	0,984
Triglicéridos (mmo l⁻¹)	1,08±0,47	1,11±0,48	1,04±0,46	0,637
Colesterol (mmo l⁻¹)	5,03±1,10	5,32±1,37	4,73±0,63	0,122
Colesterol HDL (mmo l⁻¹)	1,48±0,30	1,54±0,30	1,43±0,29	0,286
Insulina (μUI/ml)	17,21±22,77	14,96±23,92	19,61±22,00	0,564
Glucosa (mmo l⁻¹)	4,84±0,73	4,77±0,71	4,91±0,78	0,597
HOMA	1,59±1,16	1,05±0,65	2,17±2,97	0,161
Presión sistólica (mm Hg)	113,90±19,74	111,80±25,73	116,00±11,37	0,510
Presión diastólica (mm Hg)	74,80±14,21	70,90±16,11	78,70±11,09	0,084
MetS Score	1,35±0,95	1,54±0,66	1,71±0,91	0,574
MEQ Score	54,40±9,65	56,90±9,04	51,90±9,81	0,102

Los datos están representados como la media±SD. Abreviaciones: IMC, Índice de Masa Corporal; WHR, ratio cintura-cadera; HOMA. Evaluación del modelo de Homeostasis; MetS, Síndrome metabólico, MEQ: Cuestionario de vespertino-matutino. Los *P* valor indican la comparación entre los portadores y no portadores del alelo de riesgo mediante la prueba t de Student entre dos muestras.

Tabla 3. Comparación de la melatonina, luz, y el sueño y la ingesta de alimentos del día del experimento entre condiciones de alimentación de pronto (EE) y tarde (LE) dentro de cada grupo de genotipo.

	Alelo de riesgo (GG) (n=20)			No alelo de riesgo (CC) (n=20)		
	EE	LE	Valor <i>P</i>	EE	LE	Valor <i>P</i>
Melatonina (pg/mL)*						
T0'	5,67±1,72	15,45±9,68	<0,0001	5,19±2,61	12,87±5,97	<0,0001
T60'	6,21±1,81	14,13±5,56	<0,0001	5,21±3,84	14,37±4,61	<0,0001
T120'	8,03±4,63	16,83±7,30	<0,0001	6,13±5,69	15,99±5,61	<0,0001
Luz (luxes)*						
T0'	282±248	5±5	<0,0001	317±262	5±5	<0,0001
T60'	290±253	5±5	<0,0001	312±222	4±2	<0,0001
T120'	296±252	6±7	<0,0001	318±262	4±2	<0,0001
Horario de sueño						
Inicio del sueño (hh:mm) ^o	23:56±0:52	24:26±0:59	0,057	23:50±0:52	23:50±0:34	0,966
Fin del sueño (hh:mm) ^o	7:29±0:12	7:34±0:13	0,524	7:36±0:14	7:41±0:14	0,719
Duración del sueño (hh:mm) ^o	7:33±0:11	7:09±0:14	0,154	7:39±0:11	7:45±0:12	0,675
Horario de ingesta						
Inicio comida (hh:mm)	12:08±0:32	15:03±0:28	<0,0001	11:46±0:30	14:48±0:27	<0,0001
Inicio cena (hh:mm)	20:04±0:26	23:02±0:27	<0,0001	19:51±0:28	22:48±0:27	<0,0001

*Antes (T0') y después (T60' y T120') de cenar; ^o Noche anterior al experimento, mañana del experimento y la duración; EE (condición de pronto), LE (condición de tarde). Los *P* valor indican la comparación entre los portadores y no portadores del alelo de riesgo mediante la prueba t de Student entre dos muestras. La significación está mostrada en negrita.

Tabla 4. Comparación del sueño, el tiempo de ingesta de alimentos, la ingesta dietética y la distribución de energía las semanas antes del día del experimento (características habituales) entre EE y LE condiciones de alimentación dentro de cada grupo genotipo.

	Alelo de riesgo (GG) (n=20)			No alelo de riesgo (CC) (n=20)		
	EE	LE	Valor <i>P</i>	EE	LE	Valor <i>P</i>
Horario de sueño						
Inicio del sueño (hh:mm)	24:30±0:46	24:29±0:38	0,897	24:10±0:48	24:04±0:48	0,278
Fin del sueño (hh:mm)	7:58±1:01	7:47±1:00	0,302	7:34±0:40	7:43±0:37	0,227
Duración del sueño (hh:mm)	7:25±0:41	7:17±0:50	0,415	7:24±0:35	7:39±0:35	0,115
Horario de ingesta						
Inicio del desayuno (hh:mm)	8:43±0:53	8:48±0:47	0,330	8:41±0:56	8:42±0:54	0,783
Inicio de la comida (hh:mm)	14:40±0:20	14:46±0:24	0,346	14:31±0:51	14:45±0:23	0,284
Inicio de la cena (hh:mm)	21:31±0:33	21:35±0:33	0,566	21:33±0:24	21:27±0:26	0,169
Ingesta dietética						
Ingesta energética total (Kcal/día)	1391±606	1332±260	0,703	1337±234	1466±74	0,090
Distribución de la energía (día)†						
Desayuno (%)	19±7	19±5	0,870	17±7	17±6	0,987
Comida (%)	39±10	37±7	0,561	42±11	41±11	0,753
Cena (%)	26±9	31±9	0,218	29±11	29±9	0,597

†Distribución de la energía con respecto del total de la energía consumida; la diferencia al 100% corresponde al consumo de aperitivos entre comidas; EE (condición de pronto), LE (condición de tarde). Los *P* valor indican la comparación entre los portadores y no portadores del alelo de riesgo mediante la prueba *t* de Student entre dos muestras.

Tabla 5. Correlaciones intra-clase en **temperatura** de gemelas y proporciones de la varianza explicadas por influencias genéticas y ambientales con un CI del 95%, extraídas a partir de un análisis univariante.

	Correlación Intra-clase		Modelos Genéticos			Bondad del ajuste. Se elimina la diferencia de facto genéticos del modelo complet
	MZr (CI 95%)	DZr (CI 95%)	A (CI 95%)	D (CI 95%)	E (CI 95%)	
Temperatura media	0,497 (0,185/0,701)	0,188 (-0,247/0,535)	0,255 (0/0,694)	0,242 (0/0,700)	0,503 (0,299/0,807)	$\chi^2 = 9,4$; df = 2; $p = 0,009$
Mesor	0,484 (0,176/0,689)	0,059 (-0,373/0,457)	0 (0/0,664)	0,480 (0/0,688)	0,520 (0,312/0,828)	$\chi^2 = 8,5$; df = 2; $p = 0,014$
Amplitud	0,384 (0,068/0,616)	0,083 (-0,347/0,489)	0 (0/0,601)	0,383 (0/0,615)	0,617 (0,385/0,931)	$\chi^2 = 5,7$; df = 2; $p = 0,059$
Acrofase	0,710 (0,476/0,836)	-0,047 (-0,397/0,318)	0 (0/0,742)	0,703 (0/0,835)	0,297 (0,165/0,549)	$\chi^2 = 17,0$; df = 2; $p = 0,000$
Rayleigh	0,739 (0,501/0,856)	0,199 (-0,145/0,489)	0,057 (0/0,828)	0,682 (0/0,856)	0,261 (0,144/0,499)	$\chi^2 = 17,8$; df = 2; $p = 0,000$
Porcentaje del ritmo	0,461 (0,141/0,677)	0,239 (-0,179/0,559)	0,462 (0/0,675)	0 (0/0,672)	0,538 (0,323/0,833)	$\chi^2 = 8,6$; df = 2; $p = 0,013$
Poder del 1 ^{er} armónico	0,336 (0,036/0,571)	0,116 (-0,426/0,554)	0,129 (0/0,566)	0,206 (0/0,571)	0,664 (0,429/0,960)	$\chi^2 = 4,9$; df = 2; $p = 0,085$
Poder del 2 ^o armónico	0,316 (-0,074/0,597)	0,346 (-0,029/0,614)	--	--	--	--
M5	0,499 (0,149/0,712)	0,093 (-0,271/0,427)	0 (0/0,677)	0,495 (0/0,710)	0,504 (0,290/0,851)	$\chi^2 = 7,3$; df = 2; $p = 0,026$
Variabilidad intradiaria	0,624(0,394/0,854)	0,330 (-0,019/0,679)	0,560 (0/0,728)	0 (0/0,703)	0,440 (0,272/0,680)	$\chi^2 = 16,3$; df = 2; $p = 0,000$
Amplitud relativa	0,438 (0,133/0,743)	0,04 (-0,351/0,431)	0 (0/0,615)	0,402 (0/0,638)	0,598 (0,362/0,928)	$\chi^2 = 5,6$; df = 2; $p = 0,060$
	r MZ (CI 95%)	r DZ (CI 95%)	A (CI 95%)	C (CI 95%)	E (CI 95%)	
Estabilidad interdiaria	0,429 (0,097/0,658)	0,351 (-0,052/0,628)	0,156 (0/0,655)	0,273 (0/0,595)	0,571 (0,342/0,850)	$\chi^2 = 9,1$; df = 2; $p = 0,010$
CFI	0,444 (0,141/0,747)	0,308 (-0,047/0,663)	0,170 (0/0,644)	0,247 (0/0,586)	0,583 (0,354/0,863)	$\chi^2 = 8,6$; df = 2; $p = 0,013$

MZr: coeficiente de correlación intra-clase de monocigóticos, r DZ: coeficiente de correlación intra-clase de dicigóticos, CI (95%): intervalo de confianza, A: efecto genético aditivo, D: efecto genético dominante, C: ambiental compartido, E: efecto ambiental no compartido, CFI: índice de funcionalidad circadiana, M5: 5 horas de máxima temperatura.

Nota: La estructura de las correlaciones de MZ y DZ para el *porcentaje del ritmo* y la *variabilidad intradiaria* permite la aplicación de modelos ADE o ACE. Para ambas variables el modelo elegido no era relevante ya que C o D se podían eliminar del respectivo modelo sin pérdida significativa del ajuste y los modelos AE mostraron el mejor ajuste en ambos casos. Sólo los modelos completos de ADE se muestran en la tabla para estas variables.

Tabla 6. Correlaciones intra-clase en **actividad** de gemelas y proporciones de la varianza explicadas por influencias genéticas y ambientales con un CI del 95%, extraídas a partir de análisis univariante.

	Correlación Intra-clase		Modelos Genéticos			
	r MZ (CI 95%)	r DZ (CI 95%)	A (CI 95%)	D (CI 95%)	E (CI 95%)	Bondad del ajuste. Se elimina la diferencia de factores genéticos del modelo completo
Amplitud	0,35 (-0,08/0,66)	0,15 (-0,25/0,52)	0,32 (0,01/0,61)	0 (0,00/0,62)	0,68 (0,38/1)	$\chi^2 = 2,8$; df = 2; $p = 0,245$
Rayleigh	0,57 (0,20/0,79)	-0,33(-0,71/0,08)	0 (0,00/0,61)	0,44 (0,00/0,71)	0,56 (0,28/1)	$\chi^2 = 2,8$; df = 2; $p = 0,243$
Porcentaje del ritmo	0,59 (0,24/0,80)	-0,04 (-0,43/0,36)	0 (0,00/0,71)	0,57 (0,00/0,71)	0,43 (0,23/0,80)	$\chi^2 = 7,8$; df = 2; $p = 0,021$
Variabilidad intradiaria	0,61(0,27/0,80)	0,13 (-0,30/0,54)	0,31 (0,00/0,77)	0,29 (0,00/0,78)	0,40 (0,22/0,72)	$\chi^2 = 11,1$; df = 2; $p = 0,004$
Amplitud relativa	0,63 (0,26/0,82)	0,13 (-0,27/0,49)	0 (0,00/0,79)	0,65 (0,00/0,81)	0,35 (0,18/0,69)	$\chi^2 = 9,9$; df = 2; $p = 0,007$
CFI	0,29(-0,17/0,64)	0,04(-0,36/0,43)	0 (0,00/0,62)	0,35 (0,00/0,67)	0,65 (0,33/1)	$\chi^2 = 8,6$; df = 1,8; $p = 0,409$
	r MZ (CI 95%)	r DZ (CI 95%)	A (CI 95%)	C (CI 95%)	E (CI 95%)	
Mesor	0,42 (-0,01/0,72)	0,43 (0,03/0,78)	0 (0/0,57)	0,38 (0,00/0,61)	0,62 (0,39/0,92)	$\chi^2 = 6,0$; df = 2; $p = 0,050$
Acrofase	0,57 (0,25/0,78)	0,33 (-0,11/0,66)	0,51 (0,19/0,72)	0 (0,00/0,54)	0,49 (0,28/0,17)	$\chi^2 = 8,9$; df = 2; $p = 0,011$
Estabilidad interdiaria	-0,03 (-0,41/0,36)	-0,09 (-0,47/0,32)	0 (0,00/0,06)	0 (0,00/0,05)	1 (0,94/1)	$\chi^2 = 0,0$; df = 2; $p = 1$

MZr: coeficiente de correlación intra-clase de monocigóticos, r DZ: coeficiente de correlación intra-clase de dicigóticos, CI (95%): intervalo de confianza, A: efecto genético aditivo, D: efecto genético dominante, C: efecto ambiental compartido, E: efecto ambiental no compartido, CFI: índice de funcionalidad circadiana.

Nota: La estructura de las correlaciones de MZ y DZ para el *porcentaje del ritmo* y la *variabilidad intradiaria* permite la aplicación de modelos ADE o ACE. Para ambas variables el modelo elegido no era relevante ya que C o D se podían eliminar del respectivo modelo sin pérdida significativa del ajuste y los modelos AE mostraron el mejor ajuste en ambos casos. Sólo los modelos completos de ADE se muestran en la tabla para estas variables.

Tabla 7. Correlaciones intra-clase en **posición** de gemelas y proporciones de la varianza explicadas por influencias genéticas y ambientales con un CI del 95%, extraídas a partir de un análisis univariante.

	Correlación Intra-clase		Modelos Genéticos			Bondad del ajuste. Se elimina la diferencia de factores genéticos del modelo completo
	r MZ (CI 95%)	r DZ (CI 95%)	A (CI 95%)	D (CI 95%)	E (CI 95%)	
Mesor	0,79 (0,58/0,89)	-0,07 (-0,45/0,34)	0 (0,00/0,62)	0,66 (0,00/0,82)	0,34 (0,18/0,66)	$\chi^2 = 11,0$; df = 2; $p = 0,004$
Amplitud	0,32 (-0,77/0,62)	0,01 (-0,40/0,42)	0 (0,01/0,55)	0,30 (0,00/0,58)	0,70 (0,41/1)	$\chi^2 = 2,4$; df = 2; $p = 0,294$
Porcentaje del ritmo	0,38 (-0,04/0,66)	-0,04 (-0,41/0,39)	0 (0,00/0,55)	0,31 (0,00/0,57)	0,69 (0,42/1)	$\chi^2 = 7,8$; df = 2; $p = 0,021$
Estabilidad interdiaria	0,43 (0,04/0,68)	-0,31 (-0,66/0,09)	0 (0,00/0,45)	0,29 (0,00/0,53)	0,71 (0,46/1)	$\chi^2 = 2,1$; df = 2; $p = 0,346$
Amplitud relativa	0,50 (0,21/0,77)	-0,05 (-0,52/0,28)	0 (0,00/0,64)	0,44 (0,00/0,67)	0,56 (0,33/0,88)	$\chi^2 = 6,6$; df = 2; $p = 0,036$
CFI	0,40 (0,09/0,70)	-0,23 (-0,67/0,12)	0 (0,00/0,54)	0,330 (0,00/0,58)	0,670 (0,41/1)	$\chi^2 = 3,8$; df = 1,8; $p = 0,152$
	r MZ (CI 95%)	r DZ (CI 95%)	A (CI 95%)	C (CI 95%)	E (CI 95%)	
Acrofase	0,68 (0,39/0,84)	0,49 (0,11/0,74)	0,30 (0,19/0,77)	0,31 (0,00/0,71)	0,39 (0,22/0,66)	$\chi^2 = 17,0$; df = 2; $p = 0,000$
Rayleigh	0,04 (-0,37/0,44)	-0,07 (-0,57/0,48)	0 (0,04/0,05)	0 (0,00/0,04)	1 (0,94/1)	$\chi^2 = 0$; df = 2; $p = 1$
Variabilidad intradiaria	0,47(0,16/0,75)	0,64 (0,23/0,83)	0 (0,00/0,62)	0,49 (0,12/0,67)	0,51 (0,32/0,77)	$\chi^2 = 11,3$; df = 2; $p = 0,003$

MZr: coeficiente de correlación intra-clase de monocigóticos, r DZ: coeficiente de correlación intra-clase de dicigóticos, CI (95%): intervalo de confianza, A: efecto genético aditivo, D: efecto genético dominante, C: efecto ambiental compartido, E: efecto ambiental no compartido, CFI: índice de funcionalidad circadiana.

Nota: La estructura de las correlaciones de MZ y DZ para el *porcentaje del ritmo* y la *variabilidad intradiaria* permite la aplicación de modelos ADE o ACE. Para ambas variables el modelo elegido no era relevante ya que C o D se podían eliminar del respectivo modelo sin pérdida significativa del ajuste y los modelos AE mostraron el mejor ajuste en ambos casos. Sólo los modelos completos de ADE se muestran en la tabla para estas variables.

Tabla 8. Correlaciones intra-clase en gemelas para los parámetros relacionados con TAP.

	Correlaciones intra-clase	
	MZr (CI 95%)	DZr (CI 95%)
Mesor	0,791 (0,578/0,901)	0,004 (-0,402/0,409)
Amplitud	0,554 (0,192/0,778)	0,003 (-0,403/0,410)
Acrofase	0,710 (0,406/0,866)	0,282 (-0,146/0,622)
Rayleigh	0,484 (0,024/0,757)	0,112 (-0,359/0,552)
Porcentaje del ritmo (PR)	0,437 (0,034/0,710)	0,141 (-0,282/0,517)
Estabilidad interdiaria (IS)	0,562 (0,191/0,787)	0,031 (-0,366/0,419)
Variabilidad intradiaria (IV)	0,591 (0,263/0,794)	0,263 (-0,163/0,603)
Amplitud relativa (RA)	0,590 (0,255/0,795)	-0,109 (-0,484/0,299)
CFI	0,599 (0,239/0,807)	-0,003 (-0,401/0,396)

MZr: coeficiente de correlación intra-clase de monozigóticas. DZr: coeficiente de correlación intra-clase de dizigóticas. CI (95%): intervalo de confianza.

Tabla 9. Resultados del modelo de ajuste para modelos univariados de los diferentes parámetros del **TAP**; y las proporciones de varianza explicadas por: efectos genéticos aditivos (A), efectos genéticos dominantes (D) o efectos ambientales compartidos (C) y efectos ambientales no compartidos (E) con intervalos de confianza del 95%.

	Índice de bondad del ajuste							Estimas de los parámetros (CI = 95%)		
	Modelo	-2LL	df	AIC	ΔX^2	Δdf	p	A	D	E
Mesor	ADE	237,49	86	65,49	-	-	-	0 (0/0,82)	0,72 (0/0,85)	0,28 (0,15/0,33)
	AE	239,48	87	65,48	1,99	1	0,158	0,70 (0,41/0,85)	-	0,30 (0,15/0,59)
	E	255,05	88	79,05	17,56	2	< 0,001	-	-	1
Amplitud	ADE	249,30	86	77,30	-	-	-	0 (0/0,67)	0,48 (0/0,69)	0,52 (0,30/0,85)
	AE	249,88	87	75,88	0,58	1	0,446	0,45 (0,12/0,68)	-	0,55 (0,31/0,87)
	E	256,82	88	80,82	7,52	2	0,023	-	-	1
Acrofase	ADE	243,89	86	71,89	-	-	-	0,08 (0/0,79)	0,56 (0/0,80)	0,36 (0,19/0,67)
	AE	244,27	87	70,27	0,38	1	0,538	0,62 (0,31/0,80)	-	0,38 (0,20/0,69)
	E	256,13	88	80,13	12,24	2	0,002	-	-	1
Rayleigh	ADE	228,33	78	72,33	-	-	-	0,20 (0/0,66)	0,39 (0/0,67)	0,41 (0,32/0,98)
	AE	228,44	79	70,44	0,11	1	0,740	0,40 (0,01/0,67)	-	0,60 (0,33/0,98)
	E	232,57	80	72,57	4,24	2	0,120	-	-	1
Porcentaje del ritmo	ADE	252,06	86	80,16	-	-	-	0,27 (0/0,64)	0,13 (0/0,65)	0,60 (0,35/0,98)
	AE	252,07	87	78,07	0,01	1	0,920	0,39 (0,78/0,66)	-	0,61 (0,34/0,92)
	E	256,93	88	80,93	4,87	2	0,088	-	-	1
Estabilidad interdiaria	ADE	250,34	86	78,34	-	-	-	0 (0/0,67)	0,48 (0/0,71)	0,52 (0,29/0,87)
	AE	251,01	87	77,01	0,67	1	0,413	0,44 (0,09/0,69)	-	0,56 (0,31/0,91)
	E	256,81	88	80,81	6,47	2	0,039	-	-	1
Variabilidad intradiaria	ADE	243,30	86	71,30	-	-	-	0,53 (0/0,72)	0 (0/0,71)	0,47 (0,27/0,74)
	AE	243,34	87	69,34	0,00	1	0,999	0,53 (0,25/0,72)	-	0,47 (0,27/0,75)
	E	255,2	88	79,02	11,86	2	0,003	-	-	1
Amplitud relativa	ADE	245,83	86	73,83	-	-	-	0 (0/0,65)	0,50 (0/0,71)	0,50 (0,28/0,83)
	AE	247,17	87	73,17	1,34	1	0,247	0,45 (0,11/0,69)	-	0,55 (0,30/0,89)
	E	253,62	88	77,62	7,79	2	0,020	-	-	1
CFI	ADE	247,95	86	75,95	-	-	-	0 (0/0,69)	0,50 (0/0,72)	0,50 (0,28/0,84)
	AE	248,61	87	74,61	0,66	1	0,417	0,47 (0,13/0,70)	-	0,53 (0,29/0,86)
	E	255,64	88	79,64	7,69	2	0,021	-	-	1

-2LL: dos veces negativo el log-probabilidad; df: grados de libertad; AIC: criterio de información de AKaike; ΔX^2 : diferencia en X^2 del modelo completo; Δdf : diferencia de grados de libertad con el modelo completo. Los valores en negrita indican el mejor modelo de ajuste.

Tabla 10. Asociación entre la duración del sueño diurno (min) y variables antropométricas ajustadas por edad.

	B (CI 95%)	<i>p</i> values
IMC (kg/m)	2,054 (-0,002,4,109)	0,050
Peso (kg)	0,827 (-0,031,1,684)	0,059
Grasa total (%)	1,504 (0,193,2,815)	0,025
Grasa total (Kg)	1,386 (0,246,2,527)	0,017
Grasa visceral	4,290 (0,382, 8,199)	0,031
Ratio cintura cadera	-63,694 (-193,49,66,104)	0,336

Los datos están representados como B (95% intervalo de confianza).

Abreviaciones: IMC, índice de masa corporal; WHR, ratio cintura cadera. Las asociaciones significativas están representadas en negrita.

Tabla 11. Correlaciones de gemelos intra-clase para los parámetros de sueño relacionados.

	Correlación intra-clase	
	MZr (CI 95%)	DZr (CI 95%)
Siesta (cuestionario)	0,694 (0,196/0,932)	0,156 (-0,443/0,672)
Duración sueño diurno	0,671 (0,379/0,839)	-0,014 (-0,427/0,408)
Duración sueño nocturno	0,706 (0,419/0,844)	-0,116 (-0,495/0,314)
Mesor	0,749 (0,478/0,884)	0,100 (-0,331/0,495)
Acrofase	0,700 (0,387/0,861)	0,060 (-0,349/0,451)
Duración sueño total	0,730 (0,444/0,874)	-0,124 (-0,513/0,309)
Profundidad del sueño (%)	0,648 (0,341/0,827)	0,246 (-0,186/0,594)
Porcentaje del ritmo (PR)	0,572 (0,029/0,785)	-0,057 (-0,440/0,345)
Estabilidad interdiaria (IS)	0,644 (0,322/0,828)	0,028 (-0,373/0,422)
Variabilidad intradiaria (IV)	0,436 (0,029/0,712)	-0,117 (-0,503/0,309)
Amplitud relativa (RA)	0,655 (0,349/0,831)	0,398 (-0,031/0,698)
Índice de funcionalidad circadiana (CFI)	0,653 (0,335/0,832)	0,040 (-0,365/0,435)

Tabla 12. Resultados del modelo de ajuste para modelos univariados de los diferentes fenotipos del **sueño**; y las proporciones de varianza explicadas por: efectos genéticos aditivos (A), efectos genéticos dominantes (D) o efectos ambientales compartidos (C) y efectos ambientales no compartidos (E) con intervalos de confianza del 95%.

	Índice de bondad del ajuste							Estimas de los parámetros (CI = 95%)		
	Modelo	-2LL	df	AIC	ΔX^2	Δdf	p	A	D/C	E
Siesta (cuestionario)	ADE	136,91	103	-69,09	-	-	-	0 (0/0,91)	0,69 (0/0,93)	0,31 (0,07/0,80)
	AE	137,27	104	-70,73	0,36	1	0,549	0,65 (0,17/0,92)	-	0,35 (0,08/0,83)
	E	143,88	105	-66,12	6,97	2	0,031	-	-	1 (1, 1)
Duración del sueño diario	ADE	239,31	86	67,31	-	-	-	0 (0/0,76)	0,64 (0/0,80)	0,36 (0,20/0,66)
	AE	240,75	87	66,75	1,44	1	0,230	0,61 (0,29/0,79)	-	0,39 (0,21, 0,71)
	E	252,23	88	76,23	12,92	2	0,002	-	-	1 (1/1)
Duración del sueño nocturno	ADE	223,28	85	53,28	-	-	-	0 (0/0,77)	0,70 (0/0,84)	0,30 (0,16/0,62)
	AE	226,15	86	54,15	2,87	1	0,090	0,65 (0,26/0,84)	-	0,35 (0,16/0,74)
	E	234,95	87	60,95	16,05	2	0,001	-	-	1 (1/1)
Mesor	ADE	-298,8	86	-470,80	-	-	-	0 (0/0,82)	0,71 (0/0,85)	0,29 (0,15/0,56)
	AE	-297,32	87	-471,32	1,48	1	0,224	0,69 (0,38/0,85)	-	0,31 (0,15/0,62)
	E	-284,57	88	-460,57	14,23	2	0,001	-	-	1 (1/1)
Acrofase	ADE	232,68	85	62,84	-	-	-	0 (0/0,72)	0,53 (0/0,73)	0,47 (0,27/0,78)
	AE	233,13	86	61,12	0,45	1	0,502	0,52 (0,19/0,73)	-	0,48 (0,27/0,80)
	E	242,13	87	68,13	9,45	2	0,009	-	-	1 (1, 1)
Duración del sueño total	ADE	279,15	86	107,15	-	-	-	0 (0/0,82)	0,69 (0/0,84)	0,31 (0,16/0,59)
	AE	280,32	87	106,32	1,17	1	0,279	0,67 (0,35/0,84)	-	0,33 (0,16/0,65)
	E	292,54	88	116,54	13,39	2	0,001	-	-	1 (1/1)
Profundidad del sueño (%)	ADE	510,39	86	338,39	-	-	-	0 (0/0,65)	0,53 (0/0,74)	0,47 (0,26/0,81)
	AE	512,41	87	338,41	2,02	1	0,155	0,46 (0,11/0,72)	-	0,54 (0,28/0,89)
	E	518,69	88	342,69	8,30	2	0,016	-	-	1 (1/1)
Porcentaje del ritmo	ADE	681,39	86	509,39	-	-	-	0 (0/0,68)	0,54 (0/0,74)	0,46 (0,26/0,81)
	AE	682,90	87	508,90	1,51	1	0,219	0,48 (0,12/0,72)	-	0,52 (0,28/0,88)
	E	689,55	88	513,60	8,16	2	0,017	-	-	1 (1/1)
Estabilidad interdiaria	ADE	-146,58	86	-318,58	-	-	-	0 (0/0,74)	0,61 (0/0,79)	0,39 (0,21/0,72)
	AE	-144,99	87	-318,99	1,59	1	0,207	0,57 (0,21/0,78)	-	0,43 (0,22/0,79)
	E	-136,28	88	-312,28	10,30	2	0,006	-	-	1 (1, 1)
Variabilidad intradiaria	ADE	-168,00	86	-340,00	-	-	-	0 (0/0,63)	0,47 (0/0,73)	0,53 (0,27/1)
	AE	-166,54	87	-340,54	0,00	1	0,227	0,36 (0/0,68)	-	0,64 (0,31/1)
	E	-164,05	88	-340,05	11,86	2	0,139	-	-	1 (1/1)
Amplitud relativa	ACE	232,28	86	60,28	-	-	-	0,47 (0/0,79)	0,15 (0/0,67)	0,37 (0,20/0,67)
	AE	232,42	87	58,42	0,14	1	0,708	0,63 (0,36/0,80)	-	0,37 (0,20/0,64)
	CE	233,65	87	59,65	1,37	1	0,242	-	0,52 (0,27/0,71)	0,48 (0,29/0,73)
	E	247,04	88	71,04	14,76	2	0,001	-	-	1 (1/1)
CFI	ADE	-235,99	86	-407,99	-	-	-	0 (0/0,75)	0,63 (0/0,80)	0,37 (0,20/0,70)
	AE	-234,39	87	-408,39	1,60	1	0,206	0,58 (0,23/0,79)	-	0,42 (0,21/0,77)
	E	-224,96	88	-400,96	11,03	2	0,004	-	-	1 (1/1)

-2LL: dos veces negativo el log-probabilidad; df: grados de libertad; AIC: criterio de información de Akaike; ΔX^2 : diferencia en X^2 del modelo completo; Δdf : diferencia de grados de libertad con el modelo completo. Los valores en negrita indican el mejor modelo de ajuste.

Tabla 13. Correlaciones intra-clase en **horarios de comida y variables relacionadas** de gemelas y proporciones de la varianza explicadas por influencias genéticas y ambientales con un CI del 95%, extraídas a partir de un análisis univariante.

	Correlación Intra-clase		Modelos genéticos			Bondad del ajuste. Se elimina la diferencia de factores genéticos del modelo completo
	MZr (CI 95%)	DZr (CI 95%)	A (CI 95%)	D (CI 95%)	E (CI 95%)	
Horario de la ingesta						
Inicio del desayuno	0,566 (0,272/0,746)	0,316 (-0,088/0,605)	0,570 (0,302/0,746)	0	0,430 (0,254/0,698)	$\chi^2 = 0,04$; df = 1; $p = 0,84$
Inicio de la comida	0,401 (0,069/0,746)	0,168 (-0,249/0,512)	0,394 (0,085/0,628)	0	0,607 (0,372/0,915)	$\chi^2 = 0,00$; df = 1; $p = 1,00$
Inicio de la cena	0,344 (-0,041/0,613)	0,438 (0,087, 0,670)	0 (0/0,589)	0,392 (0/0,595)	0,608 (0,381/0,858)	$\chi^2 = 0,00$; df = 1; $p = 1,00$
Horario del cortisol						
Cortisol 9:00 h	0,582 (0,206/ 0,803)	0,047 (-0,461/0,531)	0,530 (0,176/0,748)	0	0,470 (0,251/0,823)	$\chi^2 = 0,12$; df = 1; $p = 0,72$
Cortisol 14:00 h	0,678 (0,316/0,860)	-0,027 (-0,474/0,434)	0,600 (0,193/0,811)	0	0,400 (0,189/0,807)	$\chi^2 = 1,13$; df = 1; $p = 0,28$
Cortisol 23:00 h	0,356 (-0,042/0,655)	-0,149 (-0,631/0,426)	0,320 (0/0,596)	0	0,680 (0,403/0,772)	$\chi^2 = 0,12$; df = 1; $p = 0,72$
Ratio mañana/noche	0,266 (-0,183/0,618)	-0,071 (-0,615/0,521)	0,250 (0/0,590)	0	0,750 (0,400/1)	$\chi^2 = 0,17$; df = 1; $p = 0,68$
Horario del sueño						
Hora de acostarse	0,462 (0,123/0,704)	0,070 (-0,317/ 0,437)	0,380 (0,061/0,632)	0	0,620 (0,368/0,939)	$\chi^2 = 0,61$; df = 1; $p = 0,43$
Hora de despertarse	0,581 (0,281/0,778)	0,349 (-0,034/0,643)	0,550 (0,294/ 0,729)	0	0,450 (0,270/0,705)	$\chi^2 = 0,25$; df = 1; $p = 0,61$
MEQ	0,496 (0,166/0,725)	0,203 (-0,191/0,540)	0,430 (0,133/0,645)	0	0,570 (0,355/0,866)	$\chi^2 = 0,01$; df = 1; $p = 0,92$

MZr: coeficiente de correlación intra-clase de monocigóticos, r DZ: coeficiente de correlación intra-clase de dicigóticos, CI (95%): intervalo de confianza, A: efecto genético aditivo, D: efecto genético dominante, C: efecto ambiental compartido, E: efecto ambiental no compartido, CFI: índice de funcionalidad circadiana. Ratio mañana/noche: ratio entre el cortisol de las 9:00h y las 23:00, MEQ: Cuestionario vespertino-matutino.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

1.-ARTICULO 1:

**“CIRCADIAN SYSTEM HERITABILITY AS ASSESSED BY WRIST
TEMPERATURE: A TWIN STUDY”**

J. Lopez-Minguez, Juan R. Ordoñana, Juan F. Sánchez-Romera, Juan A. Madrid,
Marta Garaulet

Chronobiology International (2014), 1–10

(Índice de Impacto=3,343; cuartil:1º)

<http://www.tandfonline.com/toc/icbi20/current>

Circadian system heritability as assessed by wrist temperature: A twin study

Jesus Lopez-Minguez, Juan R. Ordoñana, Juan F. Sánchez-Romera, Juan A. Madrid,
Marta Garaulet

Resumen

Introducción. Investigaciones previas demuestran que la temperatura periférica medida en la muñeca es un buen marcador para evaluar la salud del sistema circadiano en diferentes circunstancias. Sin embargo, no se han realizado estudios para conocer el componente genético de este marcador circadiano. Para ello, se buscó determinar, utilizando modelos clásicos en gemelos, las características genéticas y las influencias ambientales en la temperatura periférica medida en la muñeca.

Métodos. El estudio se realizó en 53 pares de gemelas (28 monocigóticas (MZ) y 25 dicigóticas (DZ)), con un índice de masa corporal de $25,9 \pm 3,78$ y una edad media de 52 ± 6 años. La muestra se seleccionó del Registro de Gemelos de Murcia. Los patrones circadianos se estudiaron analizando la temperatura periférica durante una semana cada 10 min “Circadianware®”. Las influencias genéticas de la temperatura periférica se estimaron mediante la comparación de las correlaciones de MZ y DZ y el ajuste de los modelos genéticos de ecuaciones estructurales en las variables medidas.

Resultados. Las gemelas MZ mostraron mayores correlaciones intra-clase que las gemelas DZ para la mayoría de los parámetros estudiados. Los factores genéticos fueron

responsables de entre el 46% y el 70% de la varianza (heredabilidad en sentido amplio) en parámetros tales como la temperatura media, el mesor, la acrofase, el Rayleigh, el porcentaje de ritmicidad y las cinco horas de máxima temperatura.

Conclusión. El patrón de correlaciones y los modelos genéticos apuntan a una heredabilidad de moderada a alta para la mayoría de los parámetros de la temperatura periférica, lo que sugiere una influencia genética importante. La presencia de estos factores genéticos apunta a la endogenicidad como la principal causa de la coincidencia de los ritmos de temperatura periférica. Sin embargo, algunos parámetros de temperatura siguen dependiendo del medio ambiente en un cierto grado y, por lo tanto, son más susceptibles de ser modificados a través de intervenciones externas.

2.-ARTICULO 2:

**“APPLICATION OF MULTIPARAMETRIC PROCEDURES FOR
ASSESSING THE HERITABILITY OF CIRCADIAN HEALTH”**

J. Lopez-Minguez, L. Colodro-Conde, C. Bandín, J. R. Ordoñana, M. Garaulet, J. A. Madrid

Chronobiology International (2016), 1–12

(Índice de Impacto=3,343; cuartil:1º)

<http://www.tandfonline.com/toc/icbi20/current>

Application of multiparametric procedures for assessing the heritability of circadian health

J. Lopez-Minguez, L. Colodro-Conde, C. Bandín, J. R. Ordoñana, M. Garaulet, J. A. Madrid

Resumen

Introducción. En la actualidad, la medición del estado del sistema circadiano bajo condiciones de vida libre a través del uso de sensores, es una técnica relativamente nueva. Los datos obtenidos utilizando estos métodos están influenciados fuertemente por factores de enmascaramiento ambiental y errores que pueden afectar a su registro. Por lo tanto, es necesario el uso de variables integradoras como el TAP, una medida que incluye temperatura, actividad y posición para reducir estos inconvenientes y el número de parámetros obtenidos. Sin embargo, la contribución genética relativa a este marcador circadiano es desconocida. El objetivo de nuestro estudio fue determinar la importancia relativa de las influencias genéticas en el TAP, utilizando modelos gemelos clásicos.

Métodos. El estudio se realizó en 53 pares de gemelas (28 monocigóticas (MZ) y 25 dicigóticas (DZ)), con un índice de masa corporal de $25,9 \pm 3,78$ y una edad media de 52 ± 6 años. La muestra se seleccionó del Registro de Gemelos de Murcia. Los patrones circadianos se estudiaron analizando la temperatura periférica cada diez minutos y la actividad y la posición cada minuto durante una semana “Circadianware®”. Las influencias genéticas se estimaron mediante la comparación de las correlaciones de MZ y DZ y el ajuste de los modelos genéticos de ecuaciones estructurales en las variables medidas.

Resultados. Las gemelas MZ mostraron mayores correlaciones intra-clase que las gemelas DZ para la mayoría de los parámetros analizados. Los factores genéticos (heredabilidad en sentido amplio) fueron responsables de aproximadamente el 40-72% de la varianza del TAP en parámetros tales como el mesor, la acrofase, la amplitud, el Rayleigh, el porcentaje de ritmicidad y el índice de funcionalidad circadiana circadiana (CFI).

Conclusión. Encontramos estimaciones de heredabilidad del sistema circadiano más homogéneas cuando se utiliza una técnica de integración como es el TAP que con las variables individuales (temperatura, actividad o posición), lo que sugiere que esta medición puede ser más fiable y estar menos sujeta a las influencias ambientales y errores.

3.-ARTICULO 3:

**“LATE DINNER IMPAIRS GLUCOSE TOLERANCE IN MTNR1B RISK ALLELE
CARRIERS: A RANDOMIZED, CROSS-OVER STUDY”.**

Lopez-Minguez J, Saxena R, Bandín C, Scheer FA, Garaulet M

Clinical Nutrition (2017), 1–8

(Índice de Impacto=4.487; cuartil:1º)

<http://www.elsevier.com/locate/clnu>

Late dinner impairs glucose tolerance in *MTNR1B* risk allele carriers: A randomized, cross-over study

Lopez-Minguez J, Saxena R, Bandín C, Scheer FA, Garaulet M

Resumen

Introducción. La cena tardía se asocia con un mayor riesgo de diabetes tipo 2, pero el mecanismo subyacente no está claro. Una hipótesis explicativa es que la concurrencia entre la melatonina circulante y elevadas concentraciones de glucosa (que caracterizan el consumo tardío) alteran la tolerancia a dicha glucosa. Sin embargo, hasta la fecha ningún estudio ha probado la influencia de las concentraciones fisiológicas de melatonina sobre la tolerancia a la glucosa. El descubrimiento del receptor de melatonina *MTNR1B* como un gen de riesgo para la diabetes tipo 2, proporciona una evidencia de un papel de los niveles fisiológicos de melatonina en el control de la glucosa. El objetivo de nuestro estudio fue probar la hipótesis de que las concentraciones elevadas de melatonina endógena empeoran la tolerancia a la glucosa cuando se cena tarde.

Métodos. Se realizó un ensayo cruzado, aleatorizado para comparar la tolerancia a la glucosa en presencia (cena tardía) o ausencia (cena temprana) de elevadas concentraciones fisiológicas de melatonina. Además se compararon los resultados entre portadores homocigóticos y no portadores del alelo de riesgo del *MTNR1B*.

Resultados. La concurrencia del horario de la cena con concentraciones elevadas de melatonina endógena resultó en un empeoramiento en la tolerancia a la glucosa. Este

efecto fue más fuerte en los portadores del alelo de riesgo del *MTNR1B* que en los no portadores.

Conclusión. La interacción del horario de cena con el *MTNR1B* apoya un papel causal de melatonina en el deterioro de la tolerancia a la glucosa. Estos resultados sugieren que cambiar la cena a un horario temprano puede resultar en una mejor tolerancia a la glucosa especialmente en los portadores del alelo de riesgo del *MTNR1B*.

CUESTIONARIOS

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

Instrucciones

- Antes de contestar a cada pregunta léala atentamente, por favor.
- Conteste a todas las preguntas.
- Conteste las preguntas consecutivamente una tras otra.
- Debe contestar cada pregunta independientemente de las demás. No vuelva atrás para verificar sus respuestas.
- Todas las preguntas contienen respuestas preestablecidas. En cada pregunta ponga una cruz al lado de una sola respuesta. Algunas preguntas muestran una escala, en este caso ponga una cruz en el lugar apropiado de la escala.
- Conteste con toda sinceridad. Tanto las respuestas como los resultados se mantendrán en estricta reserva.

Código: _____ Edad: _____

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1. Nada alerta.
2. Poco alerta.
3. Bastante alerta.
4. Muy alerta.

P6. Una vez levantado por las mañanas. ¿Cómo es tu apetito durante 1a primera media hora?

1. Muy escaso.
2. Bastantes escaso.
3. Bastante bueno.
4. Muy bueno.

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

1. Muy cansado.
2. Bastante cansado.
3. Bastante descansado.
4. Muy descansado.

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

4. Raramente o nunca más tarde.
3. Menos de 1 hora más tarde.
2. De 1 a 2 horas más tarde.
1. Más de 2 horas más tarde.

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

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

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

5. 13 Alas 8-9 p.m.
4. A las 9-10:30 p, m.
3. A las 10:30-12:30 p.m.
2. A las 1-2 a.m.
1. A las 2-3 a.m.

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

6. De 8 a 10 de la mañana.
4. De 11 de la mañana a la 1 de] mediodía.
2. De 3 a las 5 de la tarde.
1. De 7 de la tarde a 9 de la noche.

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

0. Ningún cansancio.
2. Algún cansancio.
3. Bastante cansancio.
5. Mucho cansancio.

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

4. A la hora habitual y ya no dormiría más.
3. A la hora habitual y luego dormiría.
2. A la hora habitual y volvería a dormirme.
1. Más tarde de lo habitual.

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

1. No acostarme hasta pasada la guardia.
2. Echar un sueño antes y dormir después.
3. Echar un buen sueño antes y un sueñecito después,
4. Hacer toda la dormida antes de la guardia.

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

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

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

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

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

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

Considera la casilla marcada para escoger entre los siguientes rangos.

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

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

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

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

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

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

La puntuación obtenida ha sido: _____ puntos

<i>Puntuación</i>	<i>Carácter</i>
70-86	Matutinidad extrema
59-69	Matutinidad moderada
42-58	Indefinido
31-41	Vespertinidad moderada
Menos de 30	Vespertinidad extrema

UNIVERSIDAD DE
MURCIA



Región de Murcia

Consejería de Sanidad
y Consumo



Registro de
Gemelos
de Murcia

ESTUDIO SOBRE CRONODISRUPCION EN MUJERES ADULTAS

Factores Genéticos, Índice de Masa Corporal y Alteración del
sueño

HOJA DE CONTROL SEMANAL

CÓDIGO EDAD

FECHA INICIO FECHA FIN

MENOPAUSIA

¿Ha comenzado/pasado ya la menopausia?:

DÍA 1

Fecha de hoy:

¿A qué hora se acostó anoche?:
¿A qué hora se ha despertado?:
Duración del sueño:
¿Ha tomado algo para dormir?.....

Desayuno

Hora inicio; Hora fin: Comensales:

Lugar:

Alimentos	Cantidad (g)

Almuerzo

Hora inicio; Hora fin: Comensales:

Lugar:

Alimentos	Cantidad (g)

Comida

Hora inicio; Hora fin: Comensales:

Lugar:

Alimentos	Cantidad (g)

Siesta

Hora inicio; Hora fin: Duración:

Merienda

Hora inicio; Hora fin: Comensales:

Lugar:

Alimentos	Cantidad (g)

Cena

Hora inicio; Hora fin: Comensales:

Lugar:

Alimentos	Cantidad (g)

DÍA 2

Fecha de hoy:

¿A qué hora se acostó anoche?:
¿A qué hora se ha despertado?:
Duración del sueño:
¿Ha tomado algo para dormir?.....

Desayuno

Hora inicio; Hora fin: Comensales:

Lugar:

Alimentos	Cantidad (g)

Almuerzo

Hora inicio; Hora fin: Comensales:

Lugar:

Alimentos	Cantidad (g)

Comida

Hora inicio; Hora fin: Comensales:

Lugar:

Alimentos	Cantidad (g)

Siesta

Hora inicio; Hora fin: Duración:

Merienda

Hora inicio; Hora fin: Comensales:

Lugar:

Alimentos	Cantidad (g)

Cena

Hora inicio; Hora fin: Comensales:

Lugar:

Alimentos	Cantidad (g)

DÍA 3

Fecha de hoy:

¿A qué hora se acostó anoche?:
¿A qué hora se ha despertado?:
Duración del sueño:
¿Ha tomado algo para dormir?.....

Desayuno

Hora inicio; Hora fin: Comensales:

Lugar:

Alimentos	Cantidad (g)

Almuerzo

Hora inicio; Hora fin: Comensales:

Lugar:

Alimentos	Cantidad (g)

Comida

Hora inicio; Hora fin: Comensales:

Lugar:

Alimentos	Cantidad (g)

Siesta

Hora inicio; Hora fin: Duración:

Merienda

Hora inicio; Hora fin: Comensales:

Lugar:

Alimentos	Cantidad (g)

Cena

Hora inicio; Hora fin: Comensales:

Lugar:

Alimentos	Cantidad (g)

DÍA 4

Fecha de hoy:

¿A qué hora se acostó anoche?:
¿A qué hora se ha despertado?:
Duración del sueño:
¿Ha tomado algo para dormir?.....

Desayuno

Hora inicio; Hora fin: Comensales:

Lugar:

Alimentos	Cantidad (g)

Almuerzo

Hora inicio; Hora fin: Comensales:

Lugar:

Alimentos	Cantidad (g)

Comida

Hora inicio; Hora fin: Comensales:

Lugar:

Alimentos	Cantidad (g)

Siesta

Hora inicio; Hora fin: Duración:

Merienda

Hora inicio; Hora fin: Comensales:

Lugar:

Alimentos	Cantidad (g)

Cena

Hora inicio; Hora fin: Comensales:

Lugar:

Alimentos	Cantidad (g)

DÍA 5

Fecha de hoy:

¿A qué hora se acostó anoche?:
¿A qué hora se ha despertado?:
Duración del sueño:
¿Ha tomado algo para dormir?.....

Desayuno

Hora inicio; Hora fin: Comensales:

Lugar:

Alimentos	Cantidad (g)

Almuerzo

Hora inicio; Hora fin: Comensales:

Lugar:

Alimentos	Cantidad (g)

Comida

Hora inicio; Hora fin: Comensales:

Lugar:

Alimentos	Cantidad (g)

Siesta

Hora inicio; Hora fin: Duración:

Merienda

Hora inicio; Hora fin: Comensales:

Lugar:

Alimentos	Cantidad (g)

Cena

Hora inicio; Hora fin: Comensales:

Lugar:

Alimentos	Cantidad (g)

DÍA 6

Fecha de hoy:

¿A qué hora se acostó anoche?:
¿A qué hora se ha despertado?:
Duración del sueño:
¿Ha tomado algo para dormir?.....

Desayuno

Hora inicio; Hora fin: Comensales:

Lugar:

Alimentos	Cantidad (g)

Almuerzo

Hora inicio; Hora fin: Comensales:

Lugar:

Alimentos	Cantidad (g)

Comida

Hora inicio; Hora fin: Comensales:

Lugar:

Alimentos	Cantidad (g)

Siesta

Hora inicio; Hora fin: Duración:

Merienda

Hora inicio; Hora fin: Comensales:

Lugar:

Alimentos	Cantidad (g)

Cena

Hora inicio; Hora fin: Comensales:

Lugar:

Alimentos	Cantidad (g)

DÍA 7

Fecha de hoy:

¿A qué hora se acostó anoche?:
¿A qué hora se ha despertado?:
Duración del sueño:
¿Ha tomado algo para dormir?.....

Desayuno

Hora inicio; Hora fin: Comensales:

Lugar:

Alimentos	Cantidad (g)

Almuerzo

Hora inicio; Hora fin: Comensales:

Lugar:

Alimentos	Cantidad (g)

Comida

Hora inicio; Hora fin: Comensales:

Lugar:

Alimentos	Cantidad (g)

Siesta

Hora inicio; Hora fin: Duración:

Merienda

Hora inicio; Hora fin: Comensales:

Lugar:

Alimentos	Cantidad (g)

Cena

Hora inicio; Hora fin: Comensales:

Lugar:

Alimentos	Cantidad (g)

