

La hora de nuestro cuerpo. Monitorización Ambulatoria Circadiana

A. Martínez-Nicolás y A. Blázquez-Manzanera

Laboratorio de Cronobiología, Cronolab. Departamento de Fisiología.

Facultad de Biología. Universidad de Murcia. IMIB-Arrixaca

antilas@um.es

INTRODUCCIÓN.

Debido a la localización dentro del cerebro del reloj circadiano principal en los seres humanos, es imposible realizar un estudio directo de sus características y propiedades. Por ello, determinados ritmos manifiestos especialmente fiables, cómodos, fáciles de medir y que dependen directamente del reloj principal, se utilizan como ritmos marcadores, es decir, nos permiten inferir el funcionamiento interno del reloj sin necesidad de intervenciones quirúrgicas. Se trataría de analizar el funcionamiento de un reloj a partir del movimiento de sus agujas. Además, es recomendable que estos ritmos se puedan medir durante varios días completos con una frecuencia de muestreo elevada para disminuir la variabilidad inherente al estilo de vida de las personas. Los ritmos marcadores más utilizados son actividad física, temperatura corporal central y la secreción plasmática o salivar de melatonina y cortisol.

Desgraciadamente, y aunque son ritmos fiables, no están exentos de los efectos moduladores de otras variables como la actividad, la luz o el sueño, por lo que es además recomendable registrar más de un ritmo marcador a la vez y así corregir los artefactos entre variables. En este capítulo se abordarán las diferentes técnicas utilizadas para la monitorización, de forma ambulatoria, del funcionamiento del reloj biológico humano.

LUZ Y TEMPERATURA AMBIENTAL.

Como sincronizadores principales del sistema circadiano, la exposición a luz y temperatura ambientales proporcionan información de cómo se pone en hora cada día el reloj. De hecho, son los principales factores que afectan o enmascaran los ritmos marcadores teniendo efectos medibles a corto, medio y largo plazo (desde minutos hasta semanas) sobre, por ejemplo, los ritmos de alerta, temperatura corporal central o de secreción de melatonina. Por ello, cuantificar el nivel de exposición de los individuos a estos sincronizadores es de gran interés.

Los sistemas de monitorización de la luz ambiental más utilizados son *data logger* con células fotosensibles que se sitúan en la muñeca, en la montura de unas gafas o en un colgante alrededor del cuello, en función del modelo, con diferentes especificaciones según su finalidad y que registran periódicamente la luz que recibe el sujeto. Así, existen sensores que miden el espectro solar visible, mientras que otros se centran en la luz de un determinado color. De entre los que restringen el espectro de medición, cabría destacar los que miden la longitud de onda azul, ya que es la luz para la cual el sistema circadiano es más sensible.

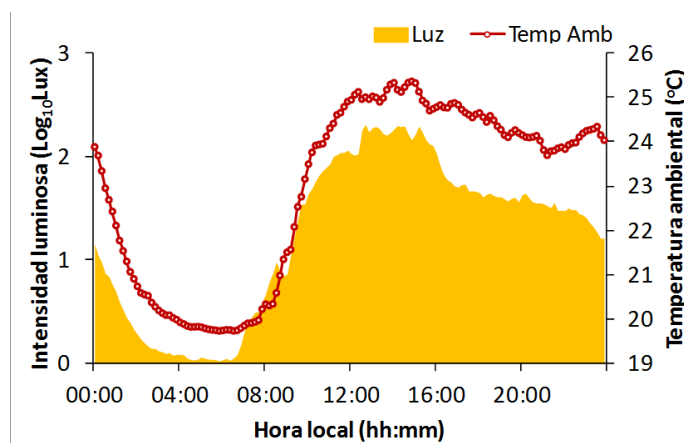


Figura 1. Onda media de exposición a la luz y temperatura ambiental de una muestra de voluntarios de la Región de Murcia. El patrón diario de exposición a la luz se muestra con un área amarilla y el de temperatura ambiental con una línea roja. Redibujada de Martínez-Nicolás *et al.* (2013). Uncovering different masking factors on wrist skin temperature rhythm in free-living subjects. PLoS ONE. 8:e61142.

En términos generales, la exposición a la luz debería corresponderse con valores de iluminancia en exteriores durante el día que superen los 1000 luxes mientras que durante la noche deberían ser cercanos a 0 luxes, puesto que la oscuridad o una iluminación de baja intensidad disminuye la temperatura central y el nivel de alerta en comparación con intensidades superiores. Sin embargo, la población en sociedades desarrolladas vive mayoritariamente en interiores, controlando la intensidad luminosa a voluntad. De esta forma

en el interior de edificios, la luz medida suele encontrarse en torno a 200 luxes durante el día y 40 luxes durante la noche en vigilia hasta pasada la medianoche, y valores que se reducen a 0 luxes durante el centro del sueño nocturno (figura 1).

En el caso de la temperatura ambiental, el sistema de registro más utilizado consiste en un termómetro situado en el interior de una cámara estanca para protegerlo del medio ambiente. Suele colocarse en un collar, colgando del cinturón o en la solapa de la chaqueta con el fin de monitorizar la temperatura ambiental en torno a la persona. El patrón de temperatura ambiental es muy variable en función de la estación, pero suele oscilar unos 15 ó 20 grados centígrados entre el día y la noche. Sin embargo, el estilo de vida actual en el que los individuos pasan la mayor parte del tiempo en interiores, la diferencia entre el día y la noche se reduce a 5-10 grados centígrados debido sobre todo al aumento de temperatura nocturna (figura 1). Lo que en algunos casos impide la disipación de calor necesaria para iniciar el sueño.

TEMPERATURA CORPORAL.

El ritmo de temperatura corporal central es uno de los ritmos marcadores más utilizados, con lo que su patrón circadiano se encuentra ampliamente estudiado. Fue descrito por primera vez en 1845, y muestra valores altos durante el día que comienzan a disminuir en la zona de mantenimiento de la vigilia (alrededor de las 20:00 h) para alcanzar el mínimo a las 06:00 h aproximadamente (zona de máxima somnolencia), momento en el cual comienzan a aumentar de nuevo (figura 2). Además, este ritmo está muy asociado con el patrón de sueño, ya que para iniciar el sueño es necesario que el cuerpo comience a enfriarse para lo que la sangre se redistribuye hacia la periferia. Así, al inicio del sueño, la superficie de la piel, sobre todo en algunas zonas que actúan como ventanas térmicas (manos, pies, cara y orejas), se vasodilata, produciéndose su calentamiento y favoreciéndose así la pérdida de calor por convección. Lo contrario (vasoconstricción de vasos sanguíneos de la piel y enfriamiento de la piel) sucede en los momentos previos al despertar (figura 2).

El ritmo de temperatura corporal central se mide normalmente mediante sondas rectales, que producen una cierta incomodidad en los sujetos. Estas sondas deben llevarse durante varios días y pueden ser desechables o no (en cuyo caso llevan una funda desechable). Con el fin de evitar estas sondas, se han desarrollado píldoras desechables, que se ingieren y transmiten teleméricamente a un dispositivo de almacenamiento que se encuentra fuera del cuerpo (normalmente sobre el abdomen). Este sistema plantea dos problemas, el periodo de registro se reduce a uno o dos días (en función del tránsito intestinal del individuo) y el

coste de las píldoras es alto lo que hace que no se utilicen demasiado entre la comunidad científica.

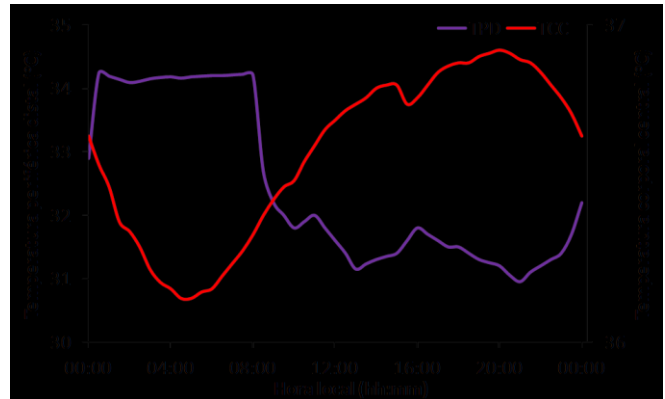


Figura 2. Onda media del ritmo diario de la temperatura periférica distal y temperatura corporal central. El patrón diario temperatura periférica distal (TPD) se representa con la línea morada mientras que el de temperatura corporal central (TCC) con la línea roja. Redibujada de Sarabia *et al.* (2008). Circadian rhythm of wrist temperature in normal-living subjects: A candidate of new index of the circadian system. *Physiol Behav.* 95:570-80.

Por otra parte, el ritmo de temperatura de la piel está en camino de convertirse en un nuevo ritmo marcador por su estrecha relación con otros ritmos marcadores clásicos. Su estabilidad y robustez en multitud de situaciones o circunstancias, su fiabilidad para predecir la fase del ritmo de melatonina, su importancia en la regulación de la temperatura corporal central, añadido a que puede predecir diversas alteraciones de la salud (apnea del sueño, patrones no reductores de hipertensión, ...) está permitiendo que este ritmo se esté imponiendo en los estudios circadianos. El ritmo de temperatura de la piel está asociado al balance simpático-parasimpático, de tal forma que la predominancia de la actividad simpática durante el día se asocia a menores temperaturas, mientras que su inhibición y la activación simultánea de la rama parasimpática se asocia con mayores temperaturas. Es más, el aumento de la temperatura de la piel constituye una señal que favorece el inicio del sueño nocturno mediante la estimulación de áreas hipotalámicas. Además, muestra un perfil inverso al de temperatura corporal central con un adelanto de unos 100 minutos con respecto a él (figura 2). Presenta valores elevados durante el sueño, que disminuyen al despertar, se mantienen temperaturas bajas durante todo el día, a excepción de la elevación postprandial en torno a las 16:00 h, después de lo cual empieza a bajar de nuevo hasta alcanzar el mínimo en la zona de mantenimiento de la vigilia (alrededor de las 20:00 h), un momento en el que es difícil dormirse en circunstancias normales y de ahí su nombre, para a continuación elevar sus valores con el fin de disipar el calor y poder iniciar el sueño.

Para medir el ritmo de temperatura de la piel se utilizan termistores conectados a un ordenador o bien *data*

loggers que almacenan la información autónomamente. Además, existen parches que transmiten la información por Bluetooth al dispositivo que almacena los datos. Los sensores pueden colocarse en cualquier área de la piel, pero las zonas más utilizadas son tobillos y muñecas para la temperatura periférica distal, y abdomen, esternón y la zona infraclavicular para la temperatura periférica proximal.

MELATONINA.

La melatonina es una hormona segregada por la glándula pineal, su ritmo circadiano plasmático está considerado como el ritmo marcador más robusto y que mejor representa el funcionamiento del marcapasos principal, ya que su síntesis depende directamente del marcapasos principal. Esta hormona se eleva durante el periodo de oscuridad, con lo que también se la conoce como la "oscuridad química". Así, en invierno, cuando las noches son largas, la secreción de melatonina se prolonga más en el tiempo que en verano, donde la noche es más corta, por lo que sirve tanto de reloj como de calendario endocrino.

El patrón de melatonina plasmática presenta valores bajos durante el día, mientras que por la noche alcanza valores elevados, con un máximo durante la madrugada (entre las 02:00 y las 04:00 h). Su perfil se ve afectado, además de por la luz, por la actividad, la cafeína, y fármacos como algunos antiinflamatorios y beta bloqueantes. El ritmo de secreción de melatonina determina la fase de otros ritmos como es el caso del ritmo de temperatura corporal central y de temperatura de la piel distal y, por tanto, el de alerta y el de sueño-vigilia. En especies diurnas, la melatonina promueve la vasodilatación periférica aumentando la temperatura de la piel distal para enfriar el cuerpo y reducir la temperatura corporal central, con lo cual se aumenta la somnolencia, favoreciendo el inicio del sueño. Sin embargo, en especies nocturnas sucede exactamente lo contrario, promueve el aumento de la temperatura del cuerpo, aumenta la alerta y favorece el despertar.

Se puede medir el perfil de melatonina en sangre, saliva y en orina, en cuyo caso se mide la 6-sulfatoximetatonina a lo largo de la noche. Sin embargo, si lo que se necesita es determinar la fase, el método más utilizado es el *dim light melatonin onset* (DLMO), que mide el inicio de la secreción de melatonina en condiciones de luz tenue y se basa en el rápido aumento de los niveles de melatonina al anochecer. Para el DLMO se comienza a tomar muestras dos o tres horas antes de la hora habitual de inicio del sueño durante cuatro o cinco horas. Una vez obtenidas las muestras, la concentración de esta hormona se puede cuantificar por RIA (radioinmunoanálisis) y ELISA (análisis por enzoinmunoanálisis), aunque también se utilizan el análisis inmunoluminométrico (LIA), análisis inmunoradiométrico

(IRMA) o la cromatografía líquida de alta presión (HPLC). La elección del método dependerá del tipo de muestra, de la concentración de melatonina de la muestra y de la sensibilidad del método.

CORTISOL.

El cortisol es una hormona glucocorticoide segregada por la glándula adrenal, que presenta un ritmo muy marcado y robusto con valores elevados alrededor del momento del despertar que van disminuyendo a lo largo del día hasta alcanzar el mínimo unas dos horas después de iniciar el sueño. Este aumento al principio del periodo de actividad prepara al organismo para el comienzo de la actividad diaria, aumentando la presión arterial, el gasto cardíaco y la glucosa en sangre, además de movilizar las células sanguíneas. Este patrón se ve afectado por la luz, ingesta hiperproteica, situaciones de estrés, determinadas patologías, o incluso el propio el ciclo de sueño-vigilia. Así, la privación de sueño, el sueño ligero o un cierto número de despertares nocturnos aumentan los niveles de cortisol.

El perfil circadiano de cortisol se obtiene mediante extracción de sangre o de saliva, en este caso al empapar una torunda de algodón siguiendo el protocolo que dicte el fabricante. Los momentos característicos del patrón de cortisol y, por tanto, los más indicados para su cuantificación comienzan con el momento del despertar, continuando hasta las 9-15 horas tras el despertar, en intervalos de 3 horas, lo que permite describir la normal caída de sus valores hasta llegar al mínimo al final del día o principio de la noche. Las técnicas de análisis son similares a las descritas en el caso de la melatonina con las modificaciones pertinentes al tratarse de una molécula distinta. Cabe destacar que en función de la especie de estudio el glucocorticoide puede ser diferente, de hecho en la mayoría de animales de experimentación se analiza la corticosterona, y también es importante considerar que en las especies nocturnas el pico del corticoide correspondiente tendrá lugar justo antes del comienzo de su actividad, que en ese caso será en la noche.

ACTIVIDAD.

El ritmo de actividad es uno de los ritmos más utilizados en la práctica clínica como marcador del funcionamiento del sistema circadiano por la comodidad y facilidad del registro, lo que permite una monitorización más prolongada. Sin embargo, la comunidad científica aún no acepta la inclusión de este ritmo como ritmo marcador. El patrón de actividad-reposo está muy asociado al ciclo sueño-vigilia, lo que le otorga su popularidad, pero se relaciona también con salud tanto física como mental y con la maduración y envejecimiento del sistema circadiano. Así,

cuando el individuo está despierto los valores son más elevados que durante el descanso.

La actimetría (o actigrafía) es un método nada invasivo para estudiar el patrón actividad-reposo y guarda, evidentemente, una estrecha relación con el patrón de sueño, ya que durante el sueño la actividad es mucho menor (casi nula) y menos variable que durante la vigilia (figura 3). Para el registro de la actividad física se utilizan actímetros (o actígrafos) colocados en la muñeca, en el brazo (no dominante) o en la cadera; de hecho algunas aplicaciones para *smartphone* utilizan el acelerómetro que estos incorporan para convertir el propio teléfono móvil en un actímetro. Aunque el método más común es la monitorización de la actividad en la muñeca, los sistemas que lo miden en el brazo se están haciendo más frecuentes. La mayoría de los sistemas registran cuentas de actividad, algunos añaden información de cuánto se ha desplazado el acelerómetro entre un movimiento y el siguiente, unos pocos informan además de cuánto tiempo ha estado el individuo moviéndose en el intervalo entre una medida y la siguiente, y en escasas ocasiones proporcionan información acerca de la posición actual del acelerómetro (solamente algunos modelos de colocación en cadera o brazo). El mayor problema de la actimetría reside en que la inmensa mayoría de los dispositivos comerciales preprocesan la información registrada, de forma que no se puede acceder a los datos reales de actividad del sujeto sino a la interpretación que de ellos realiza el software del fabricante.

Al igual que todos los ritmos circadianos, la actividad está sujeta a la influencia de multitud de variables, incluyendo situaciones que alteran el registro como puede ser la vibración del coche, el movimiento del compañero de cama o a la retirada voluntaria del sensor. Por ello, su registro debe ser suficientemente largo (al menos 5-7 días), pero a pesar de estas desventajas, su bajo coste y su comodidad le han convertido en método de elección para evaluar trastornos circadianos del sueño.

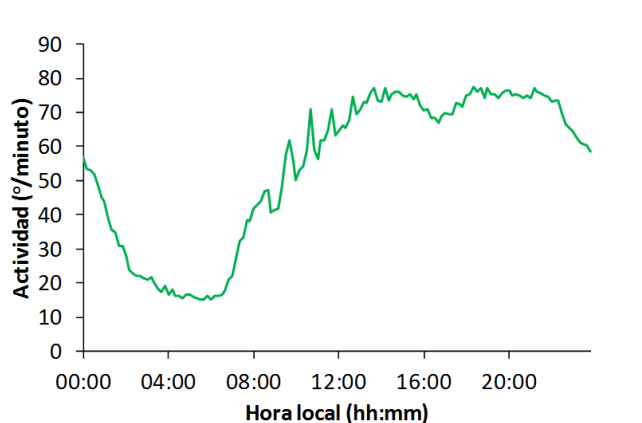


Figura 3. Patrón medio de actividad física de una población joven. La actividad se ha medido como los grados que se han desplazado los tres ejes del espacio. Redibujada de Martínez-Nicolás et al. (2014). Day-night contrast as source of health for the human circadian system. *Chronobiol Int.* 31:382-93.

SUEÑO E INTEGRACIÓN DE VARIABLES.

El patrón de sueño-vigilia es uno de los ritmos circadianos más importantes, está asociado al ciclo luz-oscuridad y está determinado por dos componentes principales, uno homeostático dependiente del tiempo que llevamos despiertos y otro circadiano dependiente del ritmo de temperatura corporal central y mediado por la secreción de melatonina. Este ritmo es crucial para la salud, prueba de ello es que existen multitud de alteraciones del patrón sueño-vigilia que conllevan la aparición de graves patologías directas, como enfermedades cardiovasculares o demencias, o indirectas, como las derivadas de la falta de atención y rendimiento que produce una mala calidad de sueño. De hecho, uno de los problemas sanitarios más importantes e infradiagnosticado es la apnea obstructiva del sueño, que consiste en la interrupción de la respiración, lo que provoca una disminución del oxígeno en sangre y el despertar consiguiente. Dependiendo del número de episodios de apneas/hipoapneas en la noche se fragmenta la normal arquitectura del sueño nocturno lo que a su vez genera somnolencia diurna.

El sueño se divide en dos tipos principales, no-REM (de inglés, *non-Rapid Eye Movement*), en la que descansa y se recupera el cuerpo, y REM en la que descansa la mente y se estructura la memoria durante los sueños o ensoñaciones. El sueño no-REM se subdivide en 4 fases (de la 1 a la 4 en orden creciente de profundidad), pero funcionalmente se puede dividir en 2, sueño superficial (fases 1 y 2) y sueño profundo (fases 3 y 4). Cada noche se producen entre 3 y 4 ciclos de sueño de 90 a 120 minutos de duración, durante los cuales se pasa de vigilia a fase 1, 2, 3 y 4 para entrar después en fase REM como si de escalones se tratase.

La técnica por excelencia para el análisis y detección de alteraciones del sueño es la polisomnografía (PSG). Consiste en una prueba no invasiva de laboratorio con registros de actividad cerebral, respiratoria, muscular y cardiovascular durante toda una noche. El EEG (electroencefalograma) permite analizar la función del cerebro durante el sueño y distinguir las fases en el que se encuentra el sujeto. El EOG (electrooculograma) analiza el movimiento de los ojos con el fin de diferenciar el sueño no-REM (por el movimiento ocular característico). El EMG (electromiograma) informa de la actividad muscular gracias a los sensores colocados, por regla general, en el mentón y en las piernas con el fin de detectar ronquidos y síndrome de piernas inquietas, respectivamente. Los registros cardiovasculares y respiratorios son muy importantes para la detección de anomalías como la apnea del sueño. Están compuestos por registros de actividad cardíaca (electrocardiograma y presión arterial), saturación de O₂, flujos respiratorios nasal y bucal, movimientos respiratorios de tórax y abdomen y nivel de ruido en el ronquido. Como resultado, se obtiene un hipnograma que es un registro donde puede apreciarse toda la arquitectura del sueño de la noche de estudio.

Debido a su alto coste y a la elevada incidencia de patologías del sueño se han desarrollado multitud de técnicas ambulatorias como alternativa a una noche de registro en el hospital. Entre ellas cabe destacar la poligrafía, que guarda una estrecha relación con la PSG, pero solamente mide variables cardiorespiratorias y/o de actividad cerebral en función del tipo de patología que se sospeche. Son mucho menos costosas, al reducir el número de variables, y se pueden realizar ambulatoriamente. En los últimos años, se ha desarrollado una alternativa en el Laboratorio de Cronobiología de la Universidad de Murcia, basado en el cálculo de la variable integrada TAP (calculada a partir de la normalización de los ritmos de Temperatura de la piel, Actividad y Posición) que diferencia de manera muy precisa sueño y vigilia (con una precisión del 90%) y aunque no llega a diferenciar entre fases de sueño, si disminuye su valor con la profundidad del mismo (figura 4). Además de aumentar la fiabilidad de la monitorización circadiana al corregir los artefactos que introduce el registro aislado de una única variable, permite considerar diversos aspectos del funcionamiento del sistema circadiano. Así por ejemplo, se evalúa la temperatura distal que presenta un componente con un fuerte control endógeno y la actividad y la posición que dependen más del control voluntario. Esta variable TAP constituye la base de la monitorización circadiana ambulatoria (MCA), que se ha aplicado recientemente para evaluar el envejecimiento circadiano o determinadas patologías como el síndrome metabólico.

Actualmente se están desarrollando aplicaciones para Smartphone que valoran la calidad y arquitectura del sueño en base a su acelerómetro y micrófono. Con ellas pueden determinarse patologías asociadas con apnea, que producen ronquido, y los despertares nocturnos.

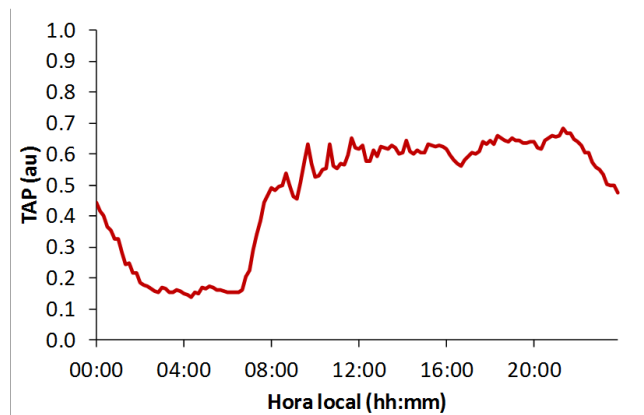


Figura 4. Patrón medio poblacional de la variable TAP (integrada por Temperatura, Actividad y Posición). Redibujada de Ortiz-Tudela et al. (2010). A new integrated variable based on thermometry, actimetry and body position to evaluate circadian system status in humans. PLoS Comp Biol. 6e1000996.

PRESIÓN ARTERIAL Y FRECUENCIA CARDIACA.

La presión arterial y la frecuencia cardíaca mantienen un patrón circadiano similar y estrechamente relacionado con el ritmo de actividad con valores elevados durante la vigilia y menores durante el descanso (figura 5). De hecho, el patrón muestra dos elevaciones durante el día, una en la mañana y otra en la tarde con un pequeño valle en la hora de la siesta y una reducción importante durante el descanso nocturno (figura 5). Este patrón es un reflejo del balance entre el sistema nervioso simpático y el sistema nervioso parasimpático. El sistema cardiovascular es el mayor efector de los cambios térmicos que se producen en nuestro cuerpo, de modo que cuando la temperatura central del cuerpo ha de bajar, (por temperaturas ambientales cálidas y durante el sueño), y el calor corporal debe disiparse, se produce una vasodilatación periférica y la consiguiente bajada de temperatura corporal central y subida de la temperatura de la piel en la periferia, mientras que ocurre exactamente lo contrario con temperaturas ambientales frías y durante la vigilia.

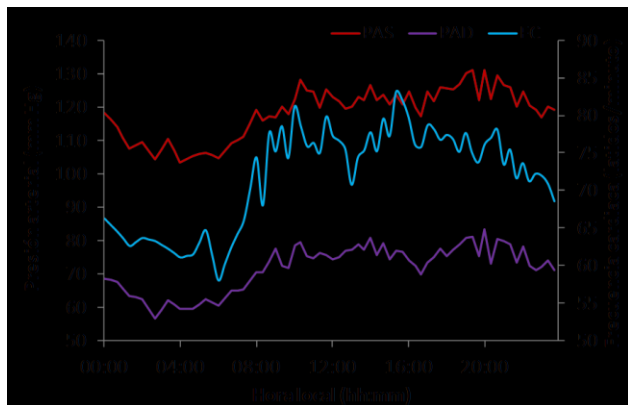


Figura 5. Patrones medios de presión arterial y frecuencia cardíaca. La presión arterial sistólica (PAS) se muestra en rojo, la presión arterial diastólica (PAD) en morado y la frecuencia cardíaca (FC) en azul. Redibujada de Blázquez *et al.* (2012). Wrist skin temperature, motor activity and body position as determinants of the circadian pattern of blood pressure. *Chronobiol Int.* 29:747-56.

La reducción nocturna de presión arterial es un parámetro de elevada importancia clínica y debe encontrarse entre un 10% y un 20% (patrón *dipper* o reductor). Sin embargo, existen otros patrones patológicos. Así, descensos de entre un 0% y 10% (patrón *no-dipper* o no reductor) están relacionados con eventos cardiovasculares como hipertrofia ventricular izquierda. Peores consecuencias tienen los sujetos con valores nocturnos que se elevan entre un 0% y un 10% (patrón *riser* o con elevación nocturna). Por último, hay un grupo cuyos descensos nocturnos superan el 20% (extreme dipper o reductores extremos), con lo que la brusca elevación al inicio de la fase activa puede dar lugar, también, a eventos cardiovasculares.

El método más preciso para evaluar la presión arterial de forma continua es la Monitorización Ambulatoria de la Presión Arterial (MAPA), que es una técnica ambulatoria no invasiva en la que el sujeto porta un dispositivo (*holter*) que realiza medidas automáticas de presión arterial en frecuencias preprogramadas (cada 15-20 minutos durante el día y cada 30-40 durante la noche). Así, se obtiene el patrón circadiano de presión arterial disminuyendo el efecto hipertensor de la "bata blanca" o reduciendo la subjetividad o autoengaño de la automedida por parte de los pacientes. Pero la MAPA no está exenta de limitaciones. Por un lado, la incomodidad de portar el dispositivo con el constante inflado del manguito las 24 horas puede alterar el sueño y, por tanto, el patrón de presión arterial. Además, actualmente, en la clínica diaria los periodos de actividad y reposo se determinan según patrones estándar que no se ajustan necesariamente al patrón individual del paciente, por lo que en algunos casos el patrón detectado mediante la MAPA puede no ser el correcto. Esto podría dar lugar a falsos diagnósticos por adelantos o retrasos de fase y por despertares en mitad de la

fase de descanso. Por este motivo, hay una clara tendencia a incorporar sensores de posición en los *holter* para obtener una información más precisa de las fases de actividad y descanso de forma personalizada.

EXPRESIÓN DE GENES RELOJ EN LEUCOCITOS Y MUCOSA ORAL.

Las neuronas que constituyen el núcleo supraquiasmático y las células de los osciladores periféricos muestran ritmicidad autónoma que está controlada por la expresión cíclica de los genes reloj (Clock, Bmal1, Per 1, Per 2, Per 3, Cry 1 y Cry 2). La implicación de estos genes en numerosos procesos fisiológicos (regulación del ciclo celular, adipogénesis, síntesis de glucocorticoides, maduración de células B, etc.) y su posible desincronización en ciertas patologías aumenta el interés para cuantificar su expresión. Para ello, generalmente se utilizan técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (*polymerase chain reaction*). La más fiable es la RT-PCR, que permite evaluar de forma cualitativa qué genes se están expresando en el momento de la toma de la muestra. Para saber qué genes se están expresando y cuantificarlos, hay que recurrir a la PCR cuantitativa (Q-PCR) o a la PCR en tiempo real.

Puesto que no es posible evaluar la expresión de los genes reloj del núcleo supraquiasmático in vivo, se utilizan muestras de tejido periférico. En ese caso, tenemos dos opciones: evaluar la expresión en leucocitos o en la mucosa oral. En el primer caso se toman muestras de sangre con una determinada frecuencia, se aíslan los leucocitos del resto de las células sanguíneas y se aplica una de las técnicas anteriormente mencionadas. En el segundo caso, la práctica más habitual consiste en realizar una pequeña biopsia bajo anestesia local, aunque más recientemente se han obtenido muestras mediante raspado de la mucosa con puntas de pipeta.

PERSPECTIVAS FUTURAS.

El futuro de las técnicas para la evaluación del sistema circadiano pasa necesariamente por el desarrollo de tecnologías que permitan la monitorización de forma no invasiva y cómoda de múltiples variables, en dispositivos integrados en la propia vestimenta del sujeto (*wearable devices*). Estas variables deberán ser procesadas, bien mediante aplicaciones de *Smartphones* o bien mediante plataformas on-line como la disponible en la Universidad de Murcia (plataforma Kronowizard), que permitirán hacer accesible a los clínicos o a los particulares el complejo análisis cronobiológico. Finalmente, la modificación de hábitos saludables, desde un punto de vista cronobiológico, solo se podrá implementar si disponemos de aplicaciones interactivas donde el sujeto pueda observar en tiempo real cuáles son sus progresos y cuáles son los cambios a realizar

en sus hábitos de vida. Este último desarrollo permitirá cerrar el círculo: monitorización-análisis-intervención, favoreciendo el desarrollo de la cronobiología como una potente herramienta en el campo del diagnóstico, prevención y tratamiento de patologías médicas.

REFERENCIAS:

Blazquez A, Martínez-Nicolás A, Salazar F J, Rol M A, Madrid J A. (2012). Wrist skin temperature, motor activity, and body position as determinants of the circadian pattern of blood pressure. *Chronobiol Int.* 29:747-756.

Bonmati-Carrión MA, Middleton B, Revell V, Skene DJ, Rol MA, Madrid JA. (2014). Circadian phase assessment by ambulatory monitoring in humans: Correlation with dim light melatonin onset. *Chronobiol Int.* 31:37-51.

Kräuchi K. (2002). How is the circadian rhythm of core body temperature regulated? *Clin Auton Res.* 12:147-149.

Martínez-Nicolás A, Ortiz-Tudela E, Madrid J A, Rol M A. (2011). Crosstalk between environmental light and internal time in humans. *Chronobiol Int.* 28:617-629.

Ortiz-Tudela E, Martínez-Nicolás A, Campos M, Rol M A, Madrid J A. (2010). A new integrated variable based on thermometry, actimetry and body position (TAP) to evaluate circadian system status in humans. *PLoS Comput Biol.* 6:e1000996.

Touitou Y, Selmaoui B. (2012). The effects of extremely low-frequency magnetic fields on melatonin and cortisol, two marker rhythms of the circadian system. *Dialogues Clin Neurosci.* 14:381-99.

Van Someren EJW. (2000). More than a marker: Interaction between the circadian regulation of temperature and sleep, age-related changes, and treatment possibilities. *Chronobiol Int.* 17:313-54.