



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Environmental Light: Measurements and
Effects on the Human Circadian System**

**Luz Ambiental: Medidas y Efectos sobre el
Sistema Circadiano Humano**

D^a Raquel Argüelles Prieto

2019



Chronobiology Laboratory
Department of Physiology
Faculty of Biology
University of Murcia

**ENVIRONMENTAL LIGHT: MEASUREMENTS AND
EFFECTS ON THE HUMAN CIRCADIAN SYSTEM**

D^a Raquel Argüelles Prieto

2019



Laboratorio de Cronobiología

Departamento de Fisiología

Facultad de Biología

Universidad de Murcia

**LUZ AMBIENTAL: MEDIDAS Y EFECTOS SOBRE EL
SISTEMA CIRCADIANO HUMANO**

D^a Raquel Argüelles Prieto

2019



D. Juan Antonio Madrid Pérez, Catedrático de Universidad del Área de Fisiología Animal en el Departamento de Fisiología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Environmental light: measurements and effects on the human circadian system", realizada por D^a. Raquel Argüelles Prieto, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia a 24 de Septiembre de 2019
Dr. Juan A. Madrid
GRUPO DE CRONOBIOLOGIA
DPTO. DE FISIOLOGIA Y
FARMACOLOGIA
FACULTAD DE BIOLOGIA
UNIVERSIDAD DE MURCIA
30100 - MURCIA ESPAÑA



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D^a. María de los Ángeles Rol de Lama, Profesora Titular de Universidad del Área de Fisiología Animal en el Departamento de Fisiología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Environmental light: measurements and effects on the human circadian system", realizada por D^a. Raquel Argüelles Prieto, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 24 de Septiembre de 2019

Profa. M. A. Rol de Lama



UNIVERSIDAD DE MURCIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA
UNIDAD DOCENTE DE
FISIOLÓGIA ANIMAL

ÍNDICE

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

1.1. PROPIEDADES DE LOS RITMOS BIOLÓGICOS

1.2. EL SISTEMA DE SINCRONIZACIÓN CIRCADIANA

1.2.1. VÍAS DE ENTRADA

1.2.2. MAQUINARIA OSCILATORIA

1.2.3. VÍAS DE SALIDA

1.2.3.1. MELATONINA

1.3. SISTEMA CIRCADIANO Y SALUD

1.3.1. CRONODISRUPCIÓN

1.3.2. FACTORES IMPLICADOS EN LA CRONODISRUPCIÓN

1.3.2.1. CRONODISRUPCIÓN DESPUÉS DEL CAMBIO HORARIO

1.3.3. LUZ CIRCADIANA SALUDABLE

1.4. CÓMO MEDIR EL IMPACTO DE LA LUZ EN EL SISTEMA CIRCADIANO

1.4.1. CALIFICAR LA LUZ SEGÚN SUS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS

1.4.2. MARCADORES BIOLÓGICOS DEL IMPACTO DE LA LUZ EN EL SISTEMA CIRCADIANO

1.4.2.1. INHIBICIÓN DE MELATONINA

1.4.2.2. CURVA DE RESPUESTA DE FASE A LA LUZ

1.4.2.3. PUPILOMETRÍA

1.4.2.4. MONITORIZACIÓN CIRCADIANA AMBULATORIA

2. OBJETIVOS

3. CAPÍTULOS EXPERIMENTALES

3.1. CAPÍTULO 1. DETERMINACIÓN DE LA INTENSIDAD, EL HORARIO Y EL TIPO DE LUZ VISIBLE Y CIRCADIANA A PARTIR DE UN DISPOSITIVO DE MONITORIZACIÓN CIRCADIANA AMBULATORIA

- 3.2. CAPÍTULO 2. EFECTOS DE LA LUZ CON ALTO Y BAJO CONTENIDO EN AZUL SOBRE MARCADORES CIRCADIANO. RELACIÓN CON INHIBICIÓN DE MELATONINA Y REFLEJO PUPILAR A LA LUZ**
- 3.3. CAPÍTULO 3. UN NUEVO MÉTODO INTEGRAL PARA EVALUAR FUENTES DE ILUMINACIÓN ARTIFICIAL BASADO EN CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y EN MARCADORES BIOLÓGICOS Y PSICOLÓGICOS**
- 3.4. CAPÍTULO 4. EFECTOS DEL CAMBIO HORARIO SOBRE RITMOS CIRCADIANOS HUMANOS Y LA CURVA DE RESPUESTA DE FASE A LA LUZ**
- 4. DISCUSIÓN GENERAL**
- 5. CONCLUSIONES**
- 6. REFERENCIAS**
- 7. ANEXO**
- 8. RESUMEN EN ESPAÑOL**
- 9. SUMMARY IN ENGLISH**

1. INTRODUCCIÓN

Since life appeared on Earth, the rotation of our planet on its own axis originates the light-dark (day-night) cycle with a duration of 24 hours, while the Earth's orbit around the Sun generates the annual cycle of seasons. This implies that since their origin, living beings have been subjected to evolve in conditions of rhythmic environmental fluctuations, and, therefore natural selection has favored the development of endogenous timing mechanisms to allow anticipatory changes to adjust physiology and behavior, for example, when preparing for breeding, hibernation and migration, improving this way survival rate and waste of energy. Chronobiology, a word derived from Greek "*kronos-bios-logos*" meaning literally "time-life-science" (DeCoursey, 2004) studies all these rhythmic variations, and it has been defined as the branch of Human Physiology that study biological rhythms throughout different structural levels in organisms.

1.1. PROPERTIES OF THE BIOLOGICAL RHYTHMS

The parameter that best characterizes a biological rhythm is periodicity, and, according to it, rhythm can be classified in three groups (Madrid & Rol, 2006):

- **Ultradian rhythms:** those whose frequency is higher than one oscillation per day (period < 20 hours). For example, several hormonal rhythms, as Follicle Stimulating Hormone (FSH) and Luteinizing Hormone (LH), heart beats, respiratory rates or brain electrical activity.
- **Circadian rhythms:** rhythms with an oscillation frequency of approximately 24 hours (from 20 to 28 hours). Most biological rhythms are englobed in this category, such as sleep-wake cycle, body temperature, blood pressure and secretion of melatonin and cortisol.
- **Infradian rhythms:** their frequency is lower than one cycle per day (period > 28 hours). This category includes circalunar rhythms, with a period of approximately 28 days, as menstrual cycle, and circannual rhythms, with a period about 365 days, such as reproduction or breeding cycles in some species.

The first main characteristic of biological rhythms is their persistency without external clues, i.e. they are endogenous and are generated by an internal clock (Pittendrigh, 1954, 1960). The endogenous period, known as free-running period (τ = tau), is specie-specific, being for humans slightly longer than 24 h, and is barely different to the period of the external cyclic signals (T). The second property of the endogenous rhythms is that they present temperature compensation, i.e., the central pacemaker oscillates with a period independent of temperature change (Pittendrigh, 1960). Other characteristic of biological rhythms is that they can adjust to

their environment through external agents, called *zeitgebers* (from German, literally “time giver”). The most important *zeitgeber* is the light-dark cycle, however, for human beings there are several synchronizers as temperature cycles, physical exercise, feeding time and social contacts. Under synchronization conditions, the endogenous period adjusts to the *zeitgeber* one with a determined stable phase angle, known as phase relationship (psi, ψ) (Pittendrigh, 1981) (Figure 1).

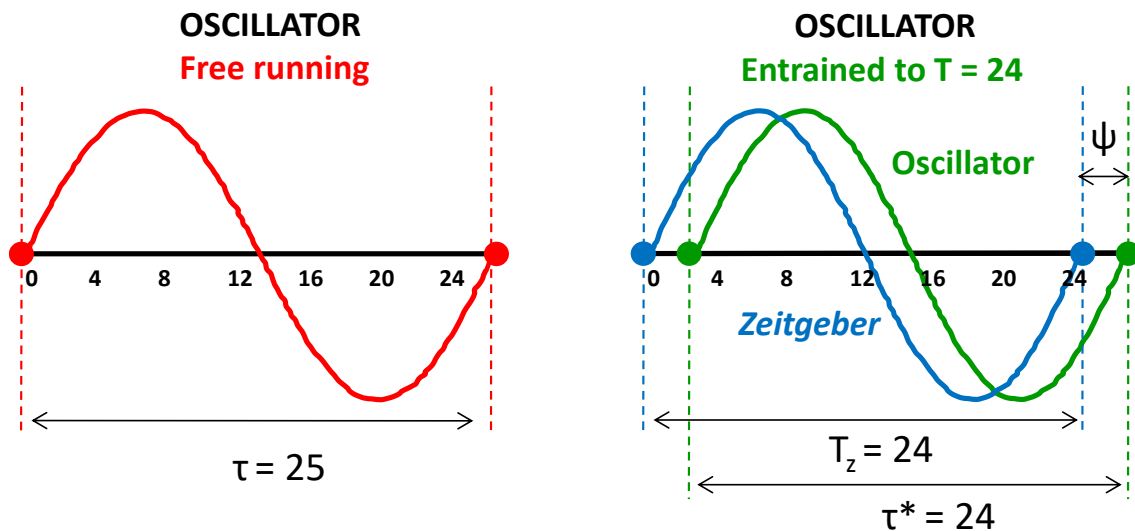


Figure 1. Entrainment. In absence of external synchronizers, the oscillator period is under free-running conditions. In this example with a period (τ) of 25 hours. However, the oscillator can be entrained by a *zeitgeber* (such as light-dark cycle) to a period of 24 h ($T_z = 24$). Then, τ changes to τ^* and becomes equal to T_z , establishing a unique phase relationship (ψ) between the oscillator and the *zeitgeber*. Modified from Pittendrigh, 1981.

Nevertheless, a *zeitgeber* not only entrains the rhythm by controlling its phase, it also can influence the rhythm manifestation with or without a relationship to the process of entrainment (Aschoff et al., 1982; Mrosovsky, 1999). As a result, the overt rhythm overrides the endogenous signals from the pacemaker generating a reactive response that the organism is not able to predict (Marques & Waterhouse, 1994; Minors & Waterhouse, 1989; Rietveld et al., 1993). This phenomenon is called masking and forms part of the circadian system, since it complements clock control, helping individuals for example to specialize as nocturnals or diurnals (Aschoff & von Goetz, 1988; Mrosovsky, 1999). To difference this masked response from the endogenous rhythm, it will suffice with eliminating the exogenous cyclical stimulus.

1.2. THE CIRCADIAN TIMING SYSTEM IN MAMMALS

The circadian timing system (CS) is an ensemble of elements composed by a hierarchically organized network of structures whose main pacemaker, in mammals, is located in the suprachiasmatic nuclei (SCN) of the hypothalamus. The CS is constituted of three components: input pathways, oscillatory machinery, including the suprachiasmatic nucleus and peripheral oscillators, and output pathways (Garaulet & Madrid, 2010) (Figure 2).

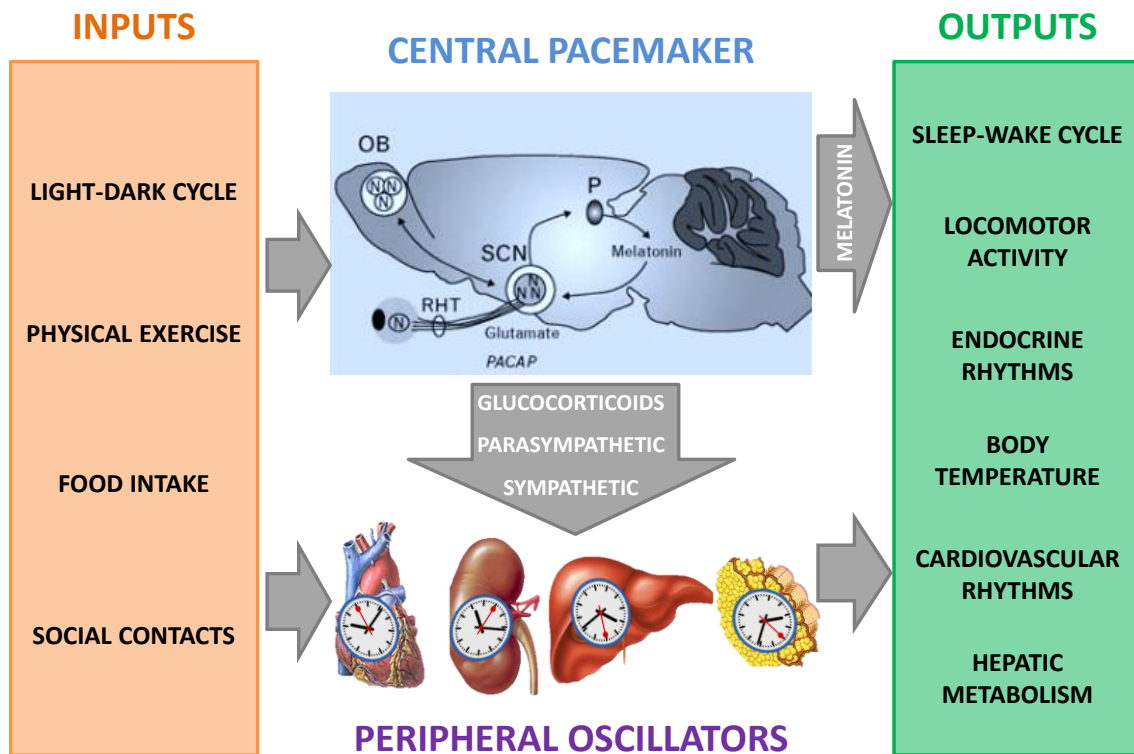


Figure 2. Organization of the circadian system and its components: inputs, central pacemaker and peripheral oscillators, output pathways and several overt rhythms. Modified from Garaulet, M., & Madrid, J. A. (2009). Chronobiology, genetics and metabolic syndrome. *Current opinion in lipidology*, 20(2), 127-134.

The central pacemaker receives information from external cues or *zeitgebers* through input pathways adjusting its activity. Thus, the synchronized activity of the main clock generates a circadian signal that, by output pathways, communicates with peripheral oscillators to settle their rhythms. At the same time, these rhythms may have a feedback effect on the CS, modifying its activity.

1.2.1. INPUT PATHWAYS

Input pathways are responsible of carrying information from *zeitgebers*, both photic and non-photoc, to the central pacemaker in order to maintain clock synchronization (Morin & Allen, 2006). The start point of this pathway begins with light perception in the retina. While most of the retinal ganglion cells are involved in visual processing, there is a small subpopulation, known as intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (ipRGCs), which contains a pigment that is especially photosensitive to light between 460-480 nm called melanopsin (Berson et al., 2002; Brainard et al., 2001; Provencio et al., 2000), and whose axons constitute the retinohypothalamic tract that project information to the SCN (Hattar et al., 2002) (Figure 3).

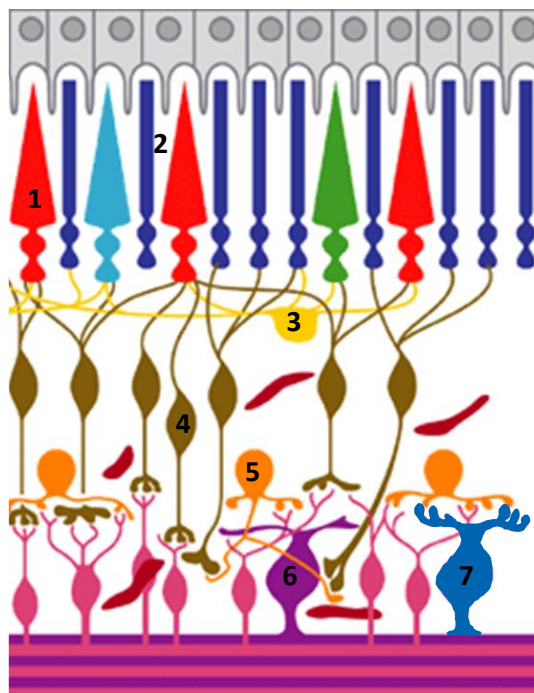


Figure 3. Schematic cellular organization of the mammalian retina. It consists of several types of cells: the classical photoreceptors, cones (1) and rods (2); horizontal cells (3), responsible of lateral connections between rods and cones; bipolar cells (4), which transmit light information from rods and cones to retinal ganglion cells (6), amacrine cells (5), in charge of lateral connections between bipolar cells and ganglion cells, and ipRGCs (7), a subpopulation of retinal cells that contain melanopsin. Modified from Wilkinson-Berka, (2004).

Melanopsin consists of an opsin protein linked to a chromophore which is a specific form of vitamin A called 11-cis-retinal (Hankins et al., 2008; Panda et al., 2005). Its phototransduction pathway has several differences with classical photoreceptors channels. It starts when light reaches the ipRGCs, converting 11-cis-retinal into all-trans-retinal, then activation of a G protein produces phospholipase C activation (Fain et al., 2010). From here, phototransduction

path remains unclear, but it is known that involves protein kinase C through transient receptor potential channels (Yau & Hardie, 2009).

Notwithstanding, ipRGCs not only receive light information, but also interact with rods and cones (Peirson & Foster, 2006). Intracellular recording from ipRGCs have shown that the short-wavelength (S) cones attenuate the light responses of ipRGCs, while inputs from the rods, medium (M) and long (L) wavelength cones provide an excitatory input (Dacey et al., 2005). However, according to the phototransduction model developed by Rea et al., (2005), it depends on the color of the light source (Rea et al., 2012; Rea et al., 2005). The S cone bipolar gives a bivalent depolarizing ON (blue) and hyperpolarizing OFF (yellow) response to light (Dacey, 1996). In the proposed model, the S cone bipolar is a giant bistratified bipolar exhibiting b-ON versus y-OFF spectral opponency but not spatial opponency (Mariani, 1983). When the S cone bipolar is stimulated with short-wavelength radiation, it contributes to the excitatory depolarizing response of the ipRGC through a bipolar/ RGC synapse in the proximal ON layer of the IPL (Belenky et al., 2003). However, with long-wavelength radiation, the S cone bipolar cannot directly influence the ipRGC through the ON layer of the IPL because the ipRGC is a depolarizing ON RGC and cannot interpret a hyperpolarizing OFF signal from bipolar cells (Masland, 2001). The ecological explanation for this interaction remains unclear, but may relate to twilight detection (Roenneberg & Foster, 1997).

Light information perceived by ipRGCs is transmitted to the SCN through the retinohypothalamic tract (Berson et al., 2002; Gooley et al., 2003; Hattar et al., 2002) using glutamate and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as neurotransmitters (Hannibal, 2002), but they also project its axons to other locations with a very important function, such as the olivary pretectal nucleus, which is involved in pupil light reflex regulation (Baver et al., 2008; Chen et al., 2011; Hattar et al., 2002), the ventral lateral geniculate nucleus and the intergeniculate leaflet, which contributes to circadian photoentrainment, as well through the geniculohypothalamic tract, using GABA and neuropeptide Y as neurotransmitters (Harrington, 1997).

On the other hand, beyond light-dark cycle, there are other synchronizers that participate in circadian adjustment, such as feeding cycles (Mendoza, 2007), physical exercise (Atkinson et al., 2007), social contacts (Mistlberger & Skene, 2004) and scheduled sleep (Van Someren & Riemersma-Van Der Lek, 2007). However, only the light-dark cycle has been demonstrated to be a necessary and sufficient condition for circadian synchronization (Bonmati-Carrion et al., 2014; Roenneberg et al., 2003; Roenneberg & Foster, 1997).

1.2.2. OSCILLATORY MACHINERY

The oscillatory machinery includes the central pacemaker, the SCN and peripheral oscillators located in most tissues and cells (Stratmann & Schibler, 2006). Their rhythms are generated by negative and positive transcriptional-translational feedback loops (Figure 4). In mammals, as positive elements (transcriptional activators), the circadian locomotor output cycles kaput (*Clock*) and brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (*Bmal1*) are responsible for the synthesis of two transcription factors that heterodimerize in the cytoplasm and induce the expression of negative elements of the molecular clock.

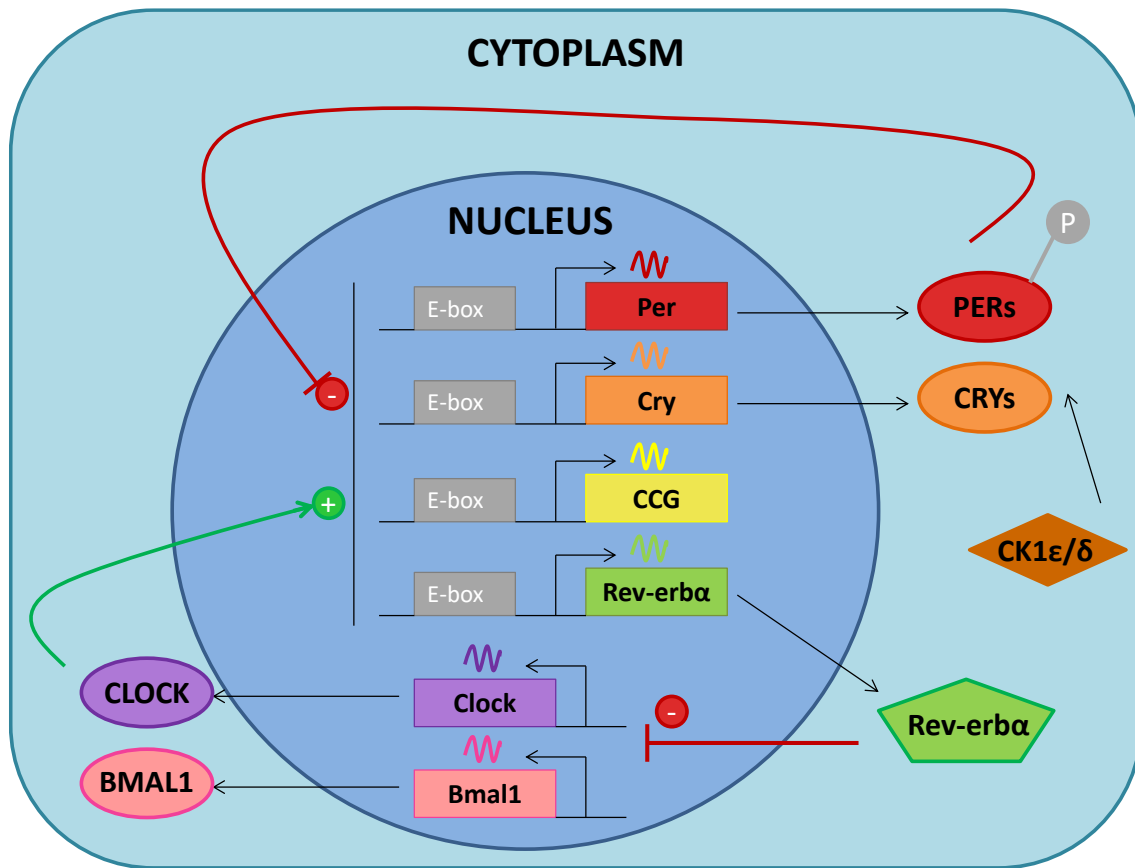


Figure 4. Simplified model of the mammalian molecular clock. The positive elements CLOCK and BMAL1 heteromerize in the cytoplasm, forming a protein complex. The heterodimer translocates to the nucleus and binds on the promoter of certain genes (*Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2*, *Rev-erba* and many clock-controlled genes (CCGs: *Clock Controlled Genes*), controlling its expression. The negative feedback depends mainly on PER and CRY, which heteromerize in the cytoplasm, translocating to the nucleus and inhibiting the transcription of CLOCK / BMAL1.

The negative loop is composed of (Ko & Takahashi, 2006) isoforms of Period (*Per 1, 2, 3*) and Cryptochrome (*Cry1* and *Cry2*), that translocate to the nucleus to inhibit the activity of *Clock-Bmal1*, a nuclear receptor subfamily 1 (*Rev-Erba*), which represses *Bmal1* transcription by

binding to *Reverba*/*ROR* response elements in its promoter region (Ueda et al., 2005), and a new clock gene, known as *Chrono*, that acts as a transcriptional repressor of the negative feedback loop (Goriki et al., 2014).

Variants of the central pacemaker use both orthologs (*Per 1, 2, 3*, *Cry1, 2*, *Bmal1, 2*) and paralogs genes, as neuronal PAS domain protein 2 (NPAS2) that can replace *Clock*. These variants are able to coexist in the same organ, functioning in parallel (Hardeland, 2012). Besides, the central nucleus is associated with several accessory tissue specific proteins, which are also subjected to circadian rhythms and feed into the core oscillator. Among these nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) (Ramsey et al., 2009), peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) (Chen & Yang, 2014), sirtuin 1 (SIRT1) (Grimaldi et al., 2009), AMP-activated protein kinase (AMPK) (Di Milia et al., 2013) and protein kinase C α (PKC α) (Bonmati-Carrion et al., 2014; Nam et al., 2014; Robles et al., 2010) can be mentioned, since they connect oscillators with metabolic detection and mitochondria function, and are modulated by melatonin as well (Hardeland, 2015). Their function as metabolic sensors is also relevant to health, since they are related to metabolic syndrome and diabetes type 2, but they are also important with regard to ageing (Hardeland, 2013), and prevention and suppression of cancer (Chini et al., 2013; Fu et al., 2002; Jung et al., 2013; Mullenders et al., 2009; Yang et al., 2009).

1.2.3. OUTPUT PATHWAYS

The output pathways of the central pacemaker are responsible for the coordination of circadian rhythms between different functions and components of the organism. The SCN acts as an orchestra conductor synchronizing the organism by neural or humoral efferences to other brain regions or peripheral organs. Among humoral mediators, prokineticin-2 is able to produce the locomotor activity rhythm (Zhou & Cheng, 2005), but the most important is melatonin secretion during darkness (Moore, 1995); among neural efferences, the rhythmic change in the parasympathetic/sympathetic balance (Buijs et al., 2003) is of considerable importance.

The SCN neural connections also reach several hypothalamus zones: the dorsal and ventral subparaventricular zone (dSPZ and vSPZ, respectively), dorsomedial hypothalamus (DMH) and paraventricular nucleus (PVN) as well (Saper et al., 2005). The dSPZ is responsible for circadian body temperature regulation by projections to the medial preoptic area (MPO) (Saper et al., 2005). The vSPZ, on the contrary, sends the information to the DMH and is in charge of controlling several circadian rhythms outputs: sleep-wake cycle through the ventrolateral

preoptic area (VLPO), activity and feeding patterns by connections with the lateral hypothalamus (LHA) and the orexygenic system (Abrahamson & Moore, 2001; Deboer et al., 2004; Saper et al., 2001). Finally, SCN also regulates the secretion of a variety of hormones such as corticoid, gonadotropin or thyrotropin (Buijs & Kalsbeek, 2001) among others.

Among the wide range of circadian rhythms, the most commonly used as marker ones are core body temperature, motor activity, and cortisol and melatonin secretion patterns (Benloucif et al., 2005; Bonmati-Carrion et al., 2013; Mormont et al., 2002; Touitou & Selmaoui, 2012; Van Someren, 2000). Among these, the melatonin circadian rhythm is considered the gold standard because its synthesis and release is directly controlled by the SCN (Van Someren & Nagtegaal, 2007).

1.2.3.1. MELATONIN (Arguelles-Prieto & Bonmati-Carrion, 2015)

Melatonin is a ubiquitous molecule present in all biological domains and it has been adopted during evolution as a “darkness molecule”. It is an indolamine that, in mammals, is produced and released by the pineal gland during night (although other tissues and organs are also capable of producing it). Its secretion from the pineal gland indicates to our body the night is about to come, and prepares it to sleep. But melatonin has a wide variety of functions in the organism (for a review, see Guerrero et al., 2007).

It was isolated and identified for the very first time in 1958 (Lerner et al., 1958) in the bovine pineal gland tissue. In 1965, Hoffman & Reiter (1965) observed that fluctuations in reproductive capacity according to the season of the year could be related to the duration of high melatonin plasma concentration (longer nights during winter, longer periods of high melatonin concentration; shorter nights during summer, shorter periods of high melatonin concentration). Since then, melatonin presence was discovered in practically all taxonomic groups: bacteria, protozoa, plantae, fungi and members of all invertebrates groups. Due to the fact that melatonin reacts with all reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS), it was thought that its main function was protection against oxidative stress. In fact, melatonin levels are directly related to the total antioxidant capacity of the blood and it is involved in the regulation of the activity of antioxidant enzymes, such as glutathione peroxidase or glutathione synthesis. Besides, its ability to eliminate free radicals extends to its secondary, tertiary and even quaternary metabolites, making it a very effective antioxidant at low concentrations. This hypothesis has been proved in several species and results are consistent (Reiter et al., 2000).

Therefore, during the day, unicellular organisms would be subjected to a high ultraviolet radiation, which would produce a rise of ROS and RNS levels and the direct photolysis of melatonin. Therefore, during light phase, melatonin is depleted, and during dark phase the maximum levels appear. Thus, it seems obvious why organisms adopted this molecule as a night signal. In multi-cellular organisms, where internal cells do not receive direct light-dark information, it was even more necessary to have a chemical signal of the night. Thereby, these organisms adopted the already existing in unicellular ancestors, the melatonin circadian rhythm. This is the reason why all species, no matter if they are diurnal or nocturnal, present the melatonin peak during night phase. However, there are organisms, such as *Escherichia coli* or *Saccharomyces cerevisiae* where melatonin does not undergo a circadian rhythm. In these cases, melatonin probably lost this property, since circadian oscillation would not be an adaptive advantage (Byeon & Back, 2016; Hardeland & Poeggeler, 2003; Rodriguez-Naranjo et al., 2012).

In higher organisms, melatonin is produced by the pineal gland, formed by cells differentiated from neurons that are able to produce a rhythmic signal (Arendt, 1994). Nevertheless, pineal melatonin is only a proportion of the total amount produced by other tissues, such as gastrointestinal tract, retina and lymphocytes (Szczepanik, 2007). However, in mammals, the non-pineal melatonin does not undergo a circadian rhythm and neither is secreted to bloodstream (Pandi-Perumal et al., 2006). Thus, it seems this melatonin is used at local level as antioxidant or as tissue factor with other functions. Therefore, in mammals, the only melatonin employed as a light-dark cycle signal is the one released by the pineal gland.

The melatonin biosynthetic pathway (Acuña-Castroviejo & Escames, 2006; Hardeland et al., 2012) (Figure 5) starts taking the amino acid tryptophan (Trp) from the bloodstream. Trp is hydroxylated in the mitochondria by Trp-hydroxylase. Most of the resulting 5-hydroxytryptophan is converted to serotonin in the cytosol, through the intervention of a decarboxylase enzyme. Once released by the neuron, norepinephrine binds to specific receptors (specifically β -type adrenergic receptors) in the pinealocyte membrane. When norepinephrine binds to these receptors, an intracellular cascade is triggered that ultimately produces an increase in the activity of the enzyme serotonin N-acetyl transferase (NAT), which N-acetylates serotonin to N-acetyl serotonin, the immediate precursor melatonin. N-acetylserotonin undergoes rapid O-methylation thanks to the enzyme hydroxyindole-O-methyl transferase, which generates N-acetyl-5-methoxytryptamine, better known as melatonin. Once synthesized, it is released to the vascular system, being able to cross membranes and barriers, such as the blood brain, reaching inside the cellular organelles (mitochondria, nucleus...).

Melatonin is rapidly metabolized, mainly in the liver, being eliminated in the urine. Its most important metabolite in humans is 6-sulfatoxymelatonin, being a good indicator of plasma melatonin levels.

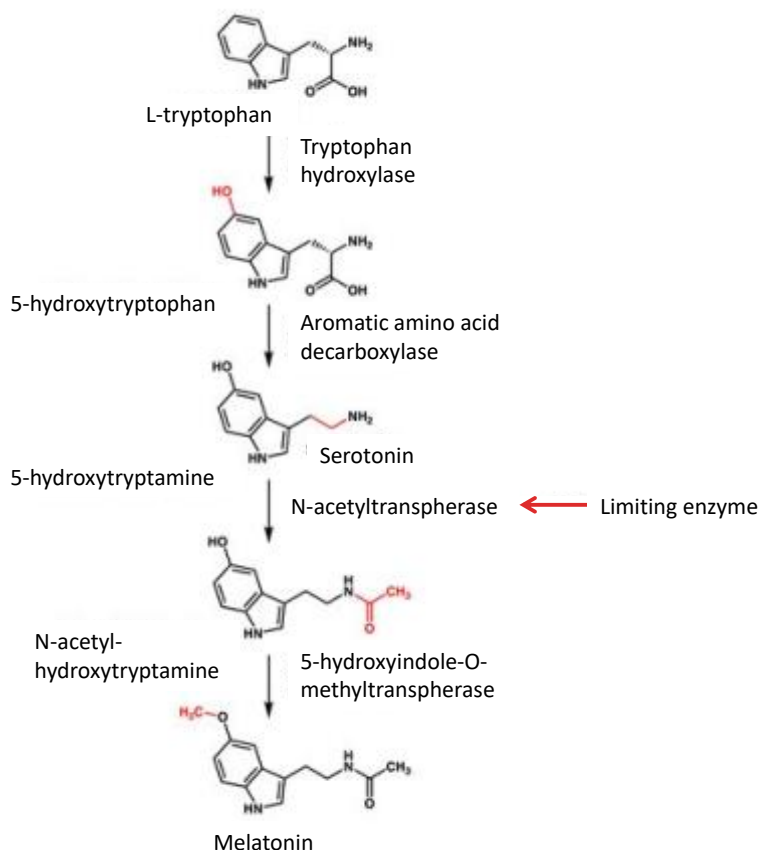


Figure 5. Biosynthetic pathway of melatonin, including its molecular structure and those for its precursors.

The synthesis of this hormone in the pineal gland is directly controlled by the SCN, but also is regulated by the light-dark cycle through the retinohypothalamic tract and ipRGCs, as already mentioned. During the night, the SCN, through a sympathetic multisynaptic pathway that relieves the paraventricular nucleus of the hypothalamus and the upper cervical ganglion, releases norepinephrine and allows melatonin synthesis to be activated (Simonneaux & Ribelayga, 2003).

There are several mechanisms of action of melatonin, although fundamentally they can be summarized in four types (Dubocovich & Markowska, 2005):

1. Melatonin can bind to plasma membrane receptors MT1 and MT2. The MT1 receptor is present in all body tissues, while MT2 is more restricted. They are receptors coupled to G protein in the membrane.
2. Due to its lipophilic nature, it can easily enter into the cell, reaching the nucleus, being melatonin nuclear receptors those of the RZR / ROR type.
3. It can bind to receptors and cytosolic proteins such as calmodulin, PKC and MT3 (quinone reductase 2).

Regarding transduction signals, melatonin, in general, induces the following signaling pathways when interacting with the different receptors (Dubocovich et al., 2003; Emet et al., 2016):

- MT1. Inhibition of adenylate cyclase activity (reduction of cAMP formation, activation of protein kinase A and phosphorylation of CREB transcription factor) and activation of phospholipase C.
- MT2. Production of phosphoinositides, inhibition of adenylate cyclase, and inhibition of the guanylate cyclase pathway.
- MT3, or quinone reductase 2. It participates in the protective effect against oxidative stress of melatonin, preventing the electron transfer reactions of quinones.

The involvement of these melatonin receptors on tumor proliferation is widely documented (Cutando et al., 2012; Ekmekcioglu, 2006). Specifically, in melanoma, several studies demonstrate the participation of MT1 and MT2 receptors in the antiproliferative effect of melatonin on cultures of these tumor cells (Fischer et al., 2006; Slominski et al., 2005). In general, MT1 receptors explain phase changes to a greater extent, while MT2, which have a more restricted distribution, have been related with the modulation of the amplitude of circadian rhythms and in the regulation of inflammatory responses and microcirculation. As for the MT3 or quinone reductase 2 receptors, they participate in detoxification processes and are expressed in liver, kidney, heart, skeletal muscle, lung, intestine, spleen and CNS, and their participation in the regulation of inflammatory processes has been verified (Emet et al., 2016).

With regard to melatonin functions, its chronobiotic effects are especially important. As said before, melatonin is released following a marked circadian rhythm, whose maximum peak occurs during the dark phase of the day. When we expose to artificial lighting at night, the rise of melatonin is delayed in time and also, the secretion of this hormone is lower (Lewy et al., 1985; Pandi-Perumal et al., 2007; Touitou et al., 2017; Wright & Lack, 2001; Wright et al., 2001). The magnitude of the delay and the decrease in secretion depend on the duration of

exposure to light, as well as the spectral composition and intensity (Brainard et al., 2001; McIntyre et al., 1989; Rea et al., 2002; Rea et al., 2005). Similarly, light exposure during the morning, causes advances, that can be greater when exposure to light occurs earlier. These advances and delays cause phase changes in the secretion of melatonin, which in turn produces alterations in the rhythm of sleep (Arendt & Skene, 2005).

But melatonin has other important functions as well (for a review, see Acuña-Castroviejo & Escames, 2006; Hardeland et al., 2012). This hormone also has potent effects on the immune system due to its immunomodulatory and anti-inflammatory properties. The ability of melatonin to modulate the immune system seems to have been developed to regulate immunological physiology throughout the year. As explained above, the duration of the increase in melatonin levels is determined by seasonal changes in the length of the day, and this provides a signal to distinguish the seasons of the year. Therefore, it is possible that this signal was adopted by the immune system to adapt to the environmental conditions of the different stations. Melatonin also seems to help reaching a balance between normal inflammatory reactions and their excessive manifestation. On the one hand, this hormone reduces injuries to organs and tissues caused by exaggerated inflammatory reactions, while on the other hand, it does not inhibit the antiviral and antibacterial activity of leukocytes related to inflammation. Both the antioxidant and the immunomodulatory function of this hormone are related to another important effect: the antitumoral. This is not uncommon, since being an antioxidant agent protects against oxidative damage, which can lead to the appearance of tumors, and also prevents the suppression of the immune response, thus providing immunological protection against the development of cancer. However, melatonin also has antitumor effects *per se*. Melatonin, at physiological concentrations, can reduce the rate of cell proliferation, while elevated concentrations tend to be cytostatic or cytotoxic in certain tumor cell lines (Bonmati-Carrion et al., 2013). Melatonin can alter the cell balance from proliferation to differentiation, thus avoiding the multiplication of tumor cells, and also, promoting apoptosis of cancer cells. There are already several studies that show the beneficial effects of melatonin treatment in patients with certain types of cancer.

Inhibition of melatonin secretion, since it also relates to certain metabolic functions, also has effects at this level (Cipolla-Neto et al., 2014; Garaulet & Madrid, 2010; Reiter et al., 2012). It has been related to the regulation of body mass, digestive efficiency, metabolic rate and thermogenesis without chills in some species of mammals, and also improves the synthesis of ATP in the heart (Escames et al., 2007; Rodríguez et al., 2007). In addition, melatonin promotes the formation of brown adipose tissue that is responsible for burning a large amount of

calories and reducing the deposits of white adipose tissue. Thus, the inhibition of melatonin by light can lead to a series of metabolic disorders, including for example, obesity, type II diabetes or coronary heart diseases. Finally, in the reproductive field, melatonin also has a small role, since seasonal changes in this hormone regulate annual fluctuations in reproductive capacity in some species. In this sense, melatonin acts as a progonadotropic hormone, favoring reproduction in species such as lamb or deer; while in others, such as the hamster, it is antigonadotropic, inhibiting the gonadal axis. In humans, it is believed that it would act in the latter way (Brzezinski et al., 1987; Kauppila et al., 1987; Silman et al., 1979).

1.3. CIRCADIAN SYSTEM AND HEALTH

The circadian timing system not only generates circadian rhythms, but also is responsible for maintaining a stable internal temporal order in the physiology of the organism, that is an essential condition for good health (Waterhouse & DeCoursey, 2004). When a misalignment between the different circadian rhythms or between the internal clock and external signals occurs, a recently described syndrome known as “chronodisruption” (CD) appears.

1.3.1. CHRONODISRUPTION

Chronodisruption has been defined as an impairment of internal phasing relative to the external, i.e. environmental changes, leading to several disorders (Erren & Reiter, 2009a, 2013). This concept refers to a prolonged deterioration of the physiological, behavioral and biochemical rhythms of the organism (Erren & Reiter, 2009b). This deterioration can be reflected in a phase advance or delay, a fragmentation of the rhythms, a loss of rhythmicity or the loss of the stable phase relationship between the different rhythms of an individual (Garaulet & Madrid, 2010). Numerous studies have demonstrated the relation of these alterations and several types of cancer (Ben-Shlomo & Kyriacou, 2010a; Hansen, 2001; Ortiz-Tudela et al., 2012; Schernhammer et al., 2001; Schernhammer et al., 2003; Viswanathan et al., 2007), as well as an increased risk of obesity and metabolic syndrome (Garaulet & Madrid, 2009; Knutsson & Bøggild, 2000). It has also been linked to the development of premature aging due to the accumulation of oxidative damage (Ortiz-Tudela et al., 2012; Reiter et al., 2000), and to the appearance of affective, cognitive and mood disorders (Cochrane et al., 2012; Evans & Davidson, 2013). However, measuring chronodisruption is still an unresolved challenge, since it implies quantifying the relationship between the different “times” (internal, social and environmental) that determine the temporal order of our biological rhythms. In this sense, Erren & Reiter (2013) have proposed the calculation of the degree of chronodisruption

based on the comparison between internal time (sleep time), and the external one, obtained from work schedules.

1.3.2. FACTORS INVOLVED IN CHRONODISRUPTION

Mainly, CD appears as a result of alterations in the inputs to the central pacemaker. The invention of artificial lighting, approximately 150 years ago, and lifestyle in modern societies have led to many alterations in the inputs to the biological clock:

- **Light at night (LAN)** and inadequate light exposure: as said before, melatonin secretion is suppressed by light, and this is the main effect of inadequate exposure to light. However, inadequate exposure to light has a wide variety of effects, such as locomotor activity arrhythmicity and glucocorticoids and body temperature rhythms flattening (Fonken & Nelson, 2014). Exposure to LAN affects the transcription level of a substantial number of genes associated with cell cycle progression, cell proliferation and tumorigenesis (Ben-Shlomo & Kyriacou, 2010b; Bonmati-Carrion et al., 2014). Moreover, LAN not only disrupts the circadian rhythm of melatonin, it alters other hormones release as well, such as leptin (Escribano et al., 2014), whose disruption could be additionally aggravated by synchronizing cues applied at non-usual times, as food intake (Stokkan et al., 2001). Nonetheless, LAN and inadequate light exposure not only have effects on human beings, they also affect other species, influencing migration, reproductive cycles and feeding (for reviews, see Erren & Reiter, 2009b; Navara & Nelson, 2007).

- **Jet lag and social jet lag:** The International Classification of Sleep Disorders (ICSD-2) considers jet lag as a Circadian Sleep disorder (CRSD) (American Academy of Sleep Disorders, 2005). It is not only generated by travelling through several time zones, preventing us from adapting to local time (Waterhouse et al., 2007), but also by the social schedules established by shift work and leisure activities during the days off (Wittmann et al. , 2006). In addition, we do not adapt in the same way when travelling from west to east than the other way around. Our circadian system has greater flexibility to delay our rhythms than to advancing them (Kolla & Auger, 2011). Since our period tends to exceed 24 hours, an advance implies going against the natural tendency of our circadian system. However, if we travel from east to west, we need to delay our clock, so adaptation to the new situation is easier, but shifting our clock is not as fast in both directions. Our internal clock can move later by about 2 hours per day, but it can move earlier by only 1 to 1.5 hours (Eastman et al., 2005; Kolla & Auger, 2011). The more time zones crossed, the longer it takes the circadian pacemaker to re-entrain and the longer-lasting and more severe are the symptoms of jet lag (Kolla & Auger, 2011). The most common symptoms

of jet lag in particular include: increased sleep latency, decreased REM sleep time the first night after the trip and dizziness (Brown et al., 2009).

- **Shift work:** the International Agency for Research on Cancer (IARC) classified shift work as a possible human carcinogen (group 2A). In fact, several studies have proven the association between shift work and colorectal cancer (Schernhammer et al., 2003), breast cancer (Hansen, 2001; Schernhammer et al., 2001), prostate cancer (Haim & Portnov, 2013) and endometrial cancer (Viswanathan et al., 2007).

1.2.3.1. CHRONODISRUPTION AFTER DAYLIGHT SAVING TIME TRANSITIONS

One particular situation that produces chronodisruption and, recently, has been matter of discussion are the daylight saving time (DST) transitions, especially since in 2018, the European Union made a public consultation to modify it. DST was firstly adopted in 1916 and was originally created to save energy by making better use of natural light and, therefore, reducing the use of artificial lighting during night time. Nevertheless, the efficiency of DST in this aspect is still not clear, since energy and human lifestyles have substantially changed along time. During the last years, several studies have investigated the effects of both DST transitions on psychiatric illness (Shapiro et al., 1990), traffic accidents (Coren, 1996; Ferguson, Preusser et al., 1995; Lambe & Cummings, 2000; Varughese & Allen, 2001) and even on cardiovascular events (Manfredini et al., 2018; Tarquini et al., 2019), all of them with unclear results. However, only a very few have studied the effects of DST on sleep parameters with a variety of results. Most of them found March DST transition on the north hemisphere results more disruptive than the October one (Lahti et al., 2006; Lahti et al., 2006; Tonetti et al., 2013) but the effects seems to be chronotype dependent (Kantermann et al., 2007; Lahti et al., 2008).

1.3.3. CIRCADIAN HEALTHY LIGHT

To counteract the detrimental effects of chronodisruption especially on mood, sleep and cognitive performance, scheduled bright light exposure constitutes a powerful measurement. To be effective, light therapy intensities of at least 1000 lux at the eye level have been described to be necessary (Aries, 2005; Van Bommel, 2006). However, to maintain synchronization at least 100 luxes at the eye level have been proven to suffice (Gronfier et al., 2007). In fact, it has been described that light during the day increases melatonin nocturnal secretion (Hashimoto et al., 1997) and protects against the detrimental effects of nocturnal light exposure (Hébert et al., 2002). Unfortunately, it is true that people spend most of their time indoors and this light intensity is not available in most office, homes and industrial areas (Aries, 2005; Martinez-Nicolas et al., 2011; Van Bommel, 2006).

The circadian system is particularly sensitive to light between 460-480 nm, and it is true that blue radiation is associated with high levels of luminous energy that can have toxic effects and cause injuries in the eye (Godley et al., 2005; Nakanishi-Ueda et al., 2013; Shang et al., 2014). However, synchronization by diurnal light (with a high blue component) can be achieved with only one hour of bright light (Martinez-Nicolas et al., 2011). In the same way this spectrum band should be elude during night (Brainard et al., 2008; R. Reiter et al., 2011; Reiter et al., 2012) in order to avoid suppressing melatonin secretion leading to the appearance of chronodisruption (Rahman et al., 2011; Sasseville & Hébert, 2010). Therefore, more recently, emphasis is made in contrast in light exposure between day and night as an important factor for maintain circadian health (Bonmati-Carrion et al., 2014; Martinez-Nicolas et al., 2011).

Nevertheless, not only intensity and spectrum need to be considered to obtain a healthy light. Spatial distribution, timing and duration of exposure, as well as previous photic history are also important variables to take into account, since the lower part of the retina shows greater sensitivity for circadian regulation than the upper part of the retina, light given at different times of the day will result in either phase advances or delays, and the higher the duration of the exposure, the higher the impact on circadian system (Rea et al., 2002).

Thus, a circadian healthy light and in practical terms, should modify its spectrum and intensity throughout the day. There are two procedures to do that: filtering the 460-480 nm band of the spectrum during the night, or generate different light patterns depending on the time of the day by modulating intensity and spectrum, using for example, red, green and blue LED sources (Bonmati-Carrion et al., 2014).

1.4. MEASURING THE IMPACT OF LIGHT ON THE CIRCADIAN SYSTEM

As said before (section 1.2.1.), light is the main *zeitgeber* to adjust the circadian system, and when inadequate, light exposure can also have detrimental effects on this system. Thus, it becomes essential to deep in our knowledge of the magnitude of these effects by implementing objective measurements including also light physical properties. During last years, several advances have been achieved in this direction.

1.4.1. SCORING LIGHT ACCORDING TO PHYSICAL CHARACTERISTICS

Since the circadian system sensitivity to light depends on its spectral distribution, it seems obvious that the first attempt to evaluate light impact implies to measure its spectrum and intensity. In this sense, several studies have developed models and functions to estimate the activation of ipRGCs and even expected melatonin suppression based on intensity and spectral

distribution of a light source. Brainard et al. (2001) and (Thapan et al., 2001), proved for the first time that melatonin secretion was suppressed by blue light by exposing health volunteers to monochromatic lights of different wavelengths and different intensities.

Based on these estimations, Rea et al., (2005) developed a mathematical model of circadian sensitivity according to the neuroanatomy and electrophysiology of ipRGCs and traditional photoreceptors, including for the first time, the influence of spectral opponency. This model has been subsequently improved and modified in several experiments (Rea & Figueiro, 2018; Rea et al., 2010) giving rise to two metrics: the circadian stimulus (CS), which is equivalent to nocturnal melatonin suppression in percentage, and circadian light (CL_A), a scale measured in terms of spectrally weighted flux per unit area (Rea & Figueiro, 2018; Rea et al., 2010). Circadian light assumes that all known photopigments contribute to the spectral sensitivity of circadian system but it depends on the spectral opponency mechanism. If a light source is “cold” or “blue” (blue-yellow > 0) the cones response is added to the ipRGCs response, but if a light source is “warm” or “yellow” (b-y ≤ 0) only the ipRGCs are responding (for more details, see section 1.2.1.). Moreover, this model has also been employed to predict melatonin suppression with encouraging results (Nagare et al., 2019a, 2019b), helping to advance in circadian sensitivity investigation.

Other perspective in this direction is to estimate the different photoreceptors activation directly from a spectral power distribution of a light source. In this way, Lucas et al., (2014) developed a software toolbox that allows to insert a determined spectrum in irradiance units and obtain the theoretical lux of activation of L-cones, M-cones, S-cones, rods and ipRGCs, based on the sensitivity curves of each of them. Some years later, this toolbox was standardized and unified by CIE S 026/E:2018 (2018) to make lighting units conversion easier. However, in spite of the utility of this software, it is not extent of limitations, since it does not consider interactions between photoreceptors.

Other mathematical models have been designed by filtering a band of the spectrum. The one developed by Falchi et al. (2011) proposed to completely eliminate outdoor emissions of light at wavelengths shorter than 540 nm and, in cases where accurate color perception was needed, at least protect the band between 440-540 nm. Nevertheless, this model was designed to limit light pollution but not to evaluate light effects on the circadian system.

1.4.2. BIOLOGICAL MARKERS OF LIGHT IMPACT ON THE CIRCADIAN SYSTEM

A circadian rhythm that is especially reliable, depends directly from the central pacemaker and is an objective measurement and easy to assess is known as a marker rhythm, and is used to characterize a subject's circadian phase (Touitou & Haus, 1992). Among them, melatonin or cortisol secretion rhythms, and core body temperature are the most employed. Core body temperature (CBT) circadian rhythm has been widely described (Kräuchi, 2002; Waterhouse et al., 2005) and its originated by a balance between heat production and heat loss. In this way, minimum levels of CBT manifests during nighttime while during the day the maximum levels are reached. Cortisol secretion also follow a circadian pattern peaking in the morning at the usual awakening time and keeping a stable phase relationship with melatonin (De Weerth et al., 2003). Melatonin onset under dim light condition, as said before (section 1.2.3.1.), is considered as the “gold standard” to assess the circadian phase but to assess the light impact on them, melatonin suppression needs to be determined.

1.4.2.1. MELATONIN DETERMINATION

Melatonin levels can be determined both in saliva and plasma, and its metabolite 6-sulfatoxymelatonin, in urine (Hofstra & de Weerd, 2008). Although melatonin concentration is approximately three times lower in saliva than in plasma, its determination procedure in the first case is more comfortable and less invasive for volunteers, since it does not require blood extraction. The timing at which melatonin levels start increasing during the evening (melatonin onset) is the most frequently used variable as circadian phase marker (Lewy et al., 1999; Lewy & Sack, 1989). Since melatonin is highly sensitive to light, the determination procedure of this parameter must be performed under dim light conditions, so it is known as dim light melatonin onset protocol (DLMO) (Bonmati-Carrion et al., 2013; Lewy et al., 1999; Lewy & Sack, 1989; Pandi-Perumal et al., 2007; Sack et al., 1986). The DLMO generally appears between 2 and 3 hours before habitual bed time in individuals with a normal phase (Lewy et al., 1999) and it can be measured from a partial melatonin profile (not over the entire 24 hours) (Hofstra & de Weerd, 2008). Once the DLMO is determined, it results easier to assess the impact of a light source on circadian rhythm by exposing a volunteer to the tested light at a moment when melatonin secretion is high (according to their dim light melatonin profile) and obtaining saliva samples with the desired frequency. However, melatonin determination is not extent of limitation, as high variation between individuals have been widely described (Arendt et al., 1979; Bouwmans et al., 2015; Follenius et al., 1995).

1.4.2.2. PHASE RESPONSE CURVES TO LIGHT

A phase response curve (PRC) is a plot of phase shifts as a function of circadian phase of a stimulus. Stimuli include different types of pulses: light, temperature, or drugs or chemicals. PRC to light was first established by De Coursey in 1960 in a rodent, but since then, many PRCs to light in human have been published (Duffy et al., 2007; Khalsa et al., 2003; Minors et al., 1991; Rüger et al., 2013; St Hilaire et al., 2012; Zeitzer et al., 2000). They exhibit delay phase shifts in the early subjective night and advance phase shifts in the late subjective night (Johnson, 1992). A phase shift in circadian rhythms means that your bedtime and wake-up time will move earlier in the day (phase advance) or later in the day (phase delay) (Mansbach, 2019). When a PRC is plotted, the circadian time of the stimulus (the duration of the endogenous period) is represented in the abscissa and it is essential to standardized time scales of PRCs among different organisms. The circadian time zero (CT0) is the breakpoint of the PRC, i.e., the circadian time at which phase shifts change from delays to advances and *vice versa*. The definition of the circadian time zero (CT0) has been the least standardized variable of PRCs.

Among all PRCs to light, those measuring core temperature and melatonin phase shifts to light are of especial importance. The one established by Khalsa et al. (2003) (Figure 6) used melatonin as circadian phase marker in response to 6.7 h of bright light exposure as stimulus.

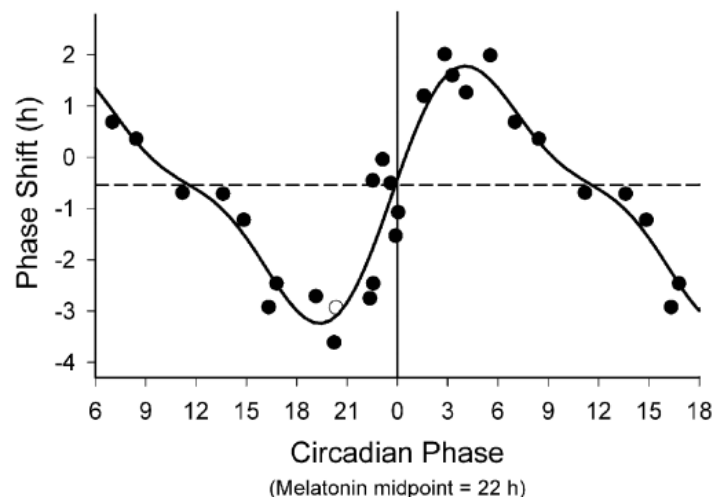


Figure 6. The phase response curve (PRC) to a bright light stimulus using melatonin midpoint as the circadian phase marker and the minimum of core body temperature to establish the circadian time zero (from Khalsa et al., 2003). Phase advances are indicated as positive values and delays as negative values. Data points from circadian phases 6–18 are double plotted. The solid curve is a dual harmonic function fitted through all of the data points for plasma melatonin.

They plotted advances and delays against the timing of the center of the light exposure relative to the melatonin midpoint on the pre-stimulus constant routine in dim light. However, the breakpoint of this curve was established at the minimum of core body temperature, assumed to occur 2 hours later. According to this PRC, phase delays would reach a maximum of about 3 hours prior to the temperature minimum and phase advances at approximately 2 hours after.

Apart from the moment, intensity must also be considered. In this sense, Zeitzer et al. (2000) (Figure 7) determined melatonin phase shifts in response to different light intensities.

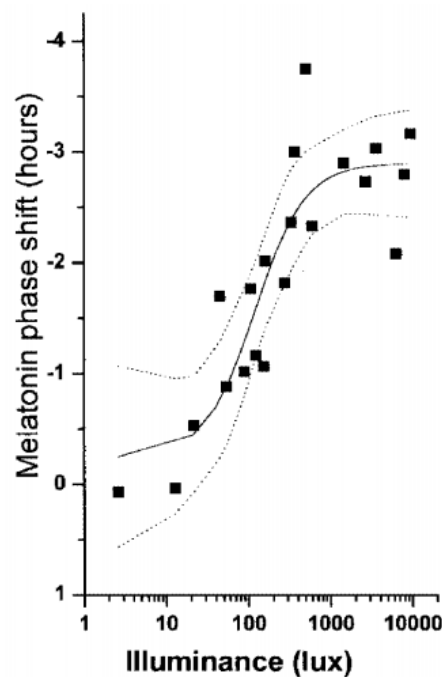


Figure 7. Melatonin illuminance-response curve of the human circadian pacemaker (Zeitzer et al., 2003). The shift in the phase of the melatonin rhythm, as assessed on the day following exposure to a 6.5 h experimental light stimulus has been fitted with a four parameter logistic model using a non-linear least squares analysis. Individual subjects are represented by black squares, the model by the continuous line, and the 95% confidence intervals by the dotted lines.

According to their fit model, melatonin shifts would start saturating above 1000 lux of light intensity, with a maximum delay of about 3 hours while low illuminances (below 15 lux) evoked little phase shift

1.4.2.3. PUPILLOMETRY FOR PUPIL LIGHT REFLEX

Pupil light reflex is an easy measurement and has been proposed as useful tool evaluate the impact of a light source on the circadian system. It light reflex represents the changes on pupil

diameter in response to a light stimulus, and depending on the stimulus duration, the dynamics of the response are slightly different (Adhikari et al., 2015; Bonmati-Carrion et al., 2014) whose main characteristics are shown in Figure 8.

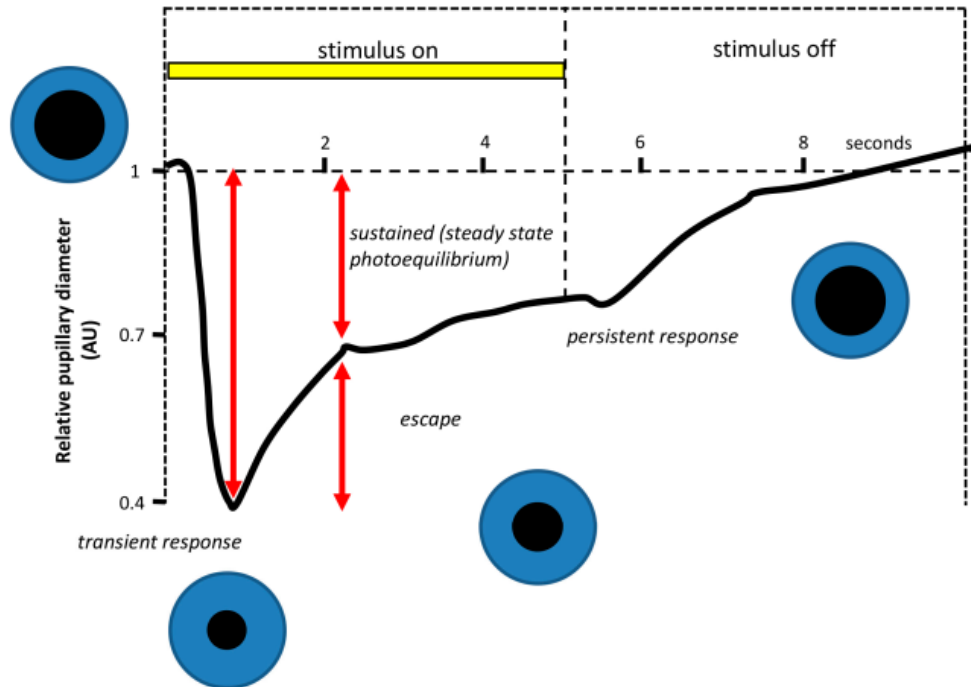


Figure 8. Example of a pupillographic recording in response to a 5-s bright white light stimulus in a normal human subject. The response waveform during the constriction phase has two components. When the light is turned on, there is a transient phase characterized by a short-latency, high-velocity maximal change in pupil size. Thereafter, the pupil partly redilates, or escapes, to a state of partial pupil constriction that represents the sustained phase of the pupil light reflex. When the light stimulus ends, the pupil starts to recover its original size after a period (which does not always occur) in which some degree of contraction persists after the light stimulus (from Bonmati-Carrion et al., 2014).

When the stimulus is turned on, there is a rapid and short-latency maximal pupil constriction known as transient response. Then, the pupil diameter partially recover its previous size (escape), reaching a steady state of partial constriction called sustained phase. When the light stimulus is turned off, pupil starts getting back to its initial size through a period in which some degree of contraction still appears (persistent response). If the light stimulus is shorter, some steps of pupil response may not appear, such as the steady state equilibrium (sustained response) (Bonmati-Carrion et al., 2014).

Pupil light reflex have been widely used to assess the ipRGCs response, since these cells project their axons both to the olivary pretectal nucleus (Baver et al., 2008; Chen et al., 2011; Gamlin et al., 1995; Trejo & Cicerone, 1984) and to the suprachiasmatic nucleus (Adhikari et

al., 2016; Adhikari et al., 2015). Concretely, the first seconds after the stimulus is off have been proven to be controlled by ipRGCs, although some contribution from rods seems to exist at least during the first 1.7 seconds (Adhikari et al., 2016; Adhikari et al., 2015b; Bonmati-Carrion et al., 2018, 2016; Feigl & Zele, 2014; Joyce et al., 2015; Markwell et al., 2010; McDougal & Gamlin, 2010). To measure this response, it suffices with applying a light stimulus of just one second after a period of darkness and record pupil response at least one minute (Park et al., 2011), thus the whole assessment takes no more than 20 minutes and it does not require pupil dilation.

1.4.3. AMBULATORY CIRCADIAN MONITORING (ACM)

To assess the light impact on circadian system, in the last years the multivariable recording of marker rhythms in ambulatory conditions has been proposed (Kolodyazhniy et al., 2011; Ortiz-Tudela et al., 2014; Ortiz-Tudela et al., 2010). These ambulatory circadian monitoring procedures integrate a combination of variables, such as temperature, activity and body position, which provide complementary information about circadian system functionality. The peripheral skin temperature rhythm has been validated as a marker rhythm (Ortiz-Tudela et al., 2010). It presents an inverse pattern to that from core body temperature, with high values during nighttime and low values during the day, and the breakpoint coinciding with the moment of awakening. High values of wrist skin temperature are associated with sleep and rest period, while low values are related to activity (Sarabia et al., 2008). This marker rhythm is driven by the suprachiasmatic nucleus and is the result of a balance between vasoconstriction and vasodilation on peripheral skin blood vessels (Kräuchi et al., 2005; Van Someren, 2004). Other marker rhythm that constitutes a simple and non-invasive measurement is the activity-rest cycle. It has been widely employed to indirectly evaluate the sleep-wake cycle, but since it is a variable that responds to behavior demands, it is subjected to masking and artifacts (Ancoli-Israel et al., 2003; Madrid-Navarro et al., 2018; Morgenthaler et al., 2017). Thus, its combination with other variables would help to improve the study of circadian rhythms. The activity-rest cycle is intimately linked with the body position variable. Body position itself has rarely been employed for this purpose, but its combination with activity recording allows identifying daily habits, and permits distinguishing when the subject is lying down or sitting (Blazquez et al., 2012; Ortiz-Tudela et al., 2010). The simultaneous recording of these three marker rhythms allows to accurately evaluate the sleep-wake rhythm status (Ortiz-Tudela, 2014; Ortiz-Tudela et al., 2014). In order to deep in our knowledge about circadian entrainment, the incorporation of ambulatory light exposure recording has been recently proposed to traditional ACM (Arguelles-Prieto et al., 2019; Madrid-Navarro et al., 2018).

Simultaneous recording of light exposure with circadian marker rhythms monitoring allows to better understand its synchronizing and disrupting effects. ACM constitutes a reliable, non-invasive and accurate method to evaluate the circadian system status and the effects of light on it, and it allows monitoring of large populations under free living conditions (Arguelles-Prieto et al., 2019; Madrid-Navarro et al., 2018; Ortiz-Tudela et al., 2014).

2. OBJECTIVES

El principal objetivo de esta Tesis Doctoral fue investigar los efectos de la luz, tanto natural como artificial, en el sistema circadiano humano. Para ello, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

1. Mejorar y validar las nuevas características de Kronowise® para permitir el registro no invasivo de luz visible y circadiana en condiciones de vida libre.
2. Desarrollar un algoritmo para diferenciar entre exposición a luz natural y artificial, así como para calcular la fotoestimulación circadiana y visible exactas.
3. Determinar la influencia de la temperatura de color correlacionada (CCT) de la luz en dos marcadores circadianos: inhibición de melatonina y reflejo pupilar a la luz, en voluntarios jóvenes y ancianos.
4. Investigar la posible relación entre la inhibición de la secreción de melatonina y el reflejo pupilar a la luz.
5. Desarrollar un método práctico para evaluar fuentes de iluminación artificial, basándose no solo en su potencia espectral y la correspondiente estimulación de los fotorreceptores circadianos, sino también en la discriminación cromática, la comodidad y los efectos sobre marcadores circadianos, como inhibición de melatonina y reflejo pupilar a la luz, en voluntarios sanos.
6. Explorar los efectos de una situación cronodisruptiva, como los cambios horarios de marzo y octubre, en la sincronización circadiana según la curva de respuesta de fase a la luz en condiciones de vida libre.

3. CAPÍTULOS EXPERIMENTALES

3.1. CAPÍTULO EXPERIMENTAL 1:

DETERMINACIÓN DE LA INTENSIDAD DE LUZ, HORARIO Y TIPO DE LUZ VISIBLE Y CIRCADIANA A PARTIR DE UN DISPOSITIVO DE MONITORIZACIÓN CIRCADIANA AMBULATORIA

Arguelles-Prieto R., Bonmati-Carrion M.A., Rol M.A., Madrid J.A.

Publicado en *Frontiers in Physiology* (2019) 10, 10.3389/fphys.2019.00822

3.1. DETERMINACIÓN DE LA INTENSIDAD, EL HORARIO Y EL TIPO DE LUZ VISIBLE Y CIRCADIANA A PARTIR DE UN DISPOSITIVO DE MONITORIZACIÓN CIRCADIANA AMBULATORIA

RESUMEN

Durante las últimas décadas, el modo de vida las sociedades modernas ha modificado profundamente el ajuste temporal del sistema circadiano, principalmente debido al uso inapropiado de iluminación artificial y a la alta prevalencia del jet-lag social. Por lo tanto, se hace necesario diseñar herramientas prácticas y no invasivas para monitorizar ritmos circadianos marcadores pero también su principal sincronizador, el ciclo de luz-oscuridad, en condiciones de vida libre. El objetivo de este trabajo fue mejorar las capacidades del dispositivo de monitorización circadiana ambulatoria (ACM, Kronowise®) desarrollando un algoritmo que permita determinar la intensidad de la luz, el horario y la estimulación de luz circadiana, diferenciando entre luz visible, luz circadiana, luz infrarroja, así como discriminar entre distintas fuentes de luz (natural, artificial con alto contenido infrarrojo, artificial con bajo contenido infrarrojo) en voluntarios en condiciones de vida libre.

El dispositivo de ACM está provisto de tres sensores de luz: i) un sensor de amplio espectro (380-1100 nm); ii) un sensor infrarrojo (700-1100 nm) y iii) un sensor equipado con un filtro azul que mimetiza la curva de sensibilidad de la melanopsina y la curva de supresión de melatonina por luz. Para calibrar el dispositivo de ACM, la luz solar y diferentes fuentes de luz comerciales se midieron a cuatro distancias estandarizadas, tanto con un espectrorradiómetro (SPR) como con el dispositivo de ACM. La herramienta desarrollada por CIE S 026/E:2018 se utilizó para calcular la estimulación melanópica a partir de los datos medidos por el SPR.

Aunque la correlación entre los datos brutos de iluminancia medidos con el ACM y el SPR eran bastante fuertes tanto para el espectro completo ($r = 0,946$, $p < 0,0001$) como para el canal circadiano ($r = 0,902$, $p < 0,0001$), se obtuvieron correlaciones aún más fuertes ($r = 0,997$, $p < 0,0001$ y $r = 0,998$, $p < 0,0001$, respectivamente) cuando las luces se clasificaron en tres grupos: natural, artificial con alto infrarrojo y artificial con bajo infrarrojo, y se aplicaron las correspondientes correlaciones lineales.

Nuestros resultados muestran que el dispositivo de ACM provisto de los tres sensores de luz y el algoritmo desarrollado en este estudio permiten una detección exacta del tipo, la intensidad y el horario de luz tanto para luz visible como circadiana, junto con la monitorización

simultánea de varios ritmos circadianos marcadores, que abren la posibilidad de explorar la sincronización por luz en grandes grupo poblacionales mientras mantiene su modo de vida habitual.

INTRODUCCIÓN

Desde la aparición de la vida en la Tierra, la existencia de mecanismos celulares endógenos que registraban el paso del tiempo ha permitido a los individuos anticiparse y adaptarse a cambios cíclicos ambientales, garantizando que los procesos bioquímicos, fisiológicos y comportamentales ocurrieran diariamente en momentos apropiados y específicos de cada especie, incluyendo el horario del ciclo de sueño-vigilia. Esta sincronización interna a señales ambientales es un requerimiento fundamental para la supervivencia de los seres vivos (Panda et al., 2002). En mamíferos, el sistema circadiano consiste en una red de estructuras jerárquicamente organizadas impulsadas por un marcapasos central, que está situado en el núcleo suprasquiasmático del hipotálamo, y es responsable de enviar señales temporales rítmicas a una gran variedad de órganos y tejidos (Garaulet & Madrid, 2010). En condiciones normales, estos ritmos circadianos están sincronizados a un ciclo de 24 horas mediante “zeitgebers” (literalmente, “dadores de tiempo”), de entre los cuales el más potente es el ciclo de luz-oscuridad (Roenneberg & Foster, 1997). Este “zeitgeber” sincroniza el sistema circadiano mediante las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles de la retina (ipRGCs), que contienen melanopsina, un fotopigmento sensible a luz de entre 460-480 nm (Berson et al., 2002; Brainard et al., 2001).

A partir de la invención de la luz eléctrica, hace aproximadamente 150 años, los patrones de exposición a luz se han modificado y, por lo tanto, el ajuste temporal del sistema circadiano se ha alterado profundamente (Bonmati-Carrion et al., 2014; Reiter et al., 2012). Los avances tecnológicos en iluminación, al igual que el estilo de vida de las sociedades modernas, que implican iluminación durante la noche, pasar demasiado tiempo en interiores, trabajo a turnos, actividades de ocio durante la noche, viajes alrededor del mundo y, especialmente, el uso de iluminación artificial inapropiada, han alterado nuestra fisiología, dando lugar a una gran variedad de afecciones de la salud de origen circadiano (Erren & Reiter, 2009; Navara & Nelson, 2007; Pauley, 2004). Todos estos efectos se engloban en el concepto de “cronodisrupción” (CD), definida como el estado temporal o crónico de desincronización interna, ya sea entre los diferentes ritmos circadianos o entre componentes circadianos endógenos y exógenos (Erren & Reiter, 2009).

Para evaluar el impacto de la iluminación en el sistema circadiano, se hace necesario desarrollar herramientas nuevas, prácticas y no invasivas para detectar patrones de luz-oscuridad que sean cronodisruptivos y permitir así el tratamiento de pacientes con alteraciones circadianas. En los últimos años, muchos estudios se han centrado en la monitorización ambulatoria de ritmos circadianos en humanos. Sin embargo, solo algunos de ellos han evaluado la exposición a luz visible (Berger et al., 2010; Bonmati-Carrion et al., 2013; Kolodyazhniy et al., 2011; Lemmer et al., 2016), y muy pocos incluyen la estimulación melanópica (Bierman et al., 2005; Cao et al., 2015; Figueiro et al., 2013). Por ello, nuestro laboratorio propuso hace unos años, por primera vez, el registro multivariable de distintas vías de salida (tiempo en movimiento, aceleración, temperatura distal de la piel y posición corporal) junto con la exposición a luz en un único dispositivo de monitorización circadiana ambulatoria (ACM, denominado Kronowise®; Kronohealth SL; University of Murcia, Spain; Madrid-Navarro et al., 2018) para evaluar globalmente el estado del sistema circadiano humano en condiciones de vida libre (Bonmati-Carrion et al., 2013; Ortiz-Tudela et al., 2010).

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue implementar validar las nuevas características de la ACM para permitir el registro no invasivo de luz visible y circadiana en condiciones de vida libre. Para ello, en primer lugar, se seleccionó un filtro azul que mimetiza el espectro melanópico; después, las medidas del SPR y del ACM se compararon para calibrar los sensores de ACM y finalmente, se desarrollaron algoritmos para diferenciar entre exposición a luz natural y artificial, así como para calcular la fotoestimulación visible y circadiana exactas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Dispositivo de monitorización circadiana ambulatoria

Para llevar a cabo este estudio, se empleó un dispositivo de monitorización circadiana ambulatoria (ACM) desarrollado por nuestro grupo de investigación: Kronowise® (Kronohealth SL, Spain) (Figura 1).

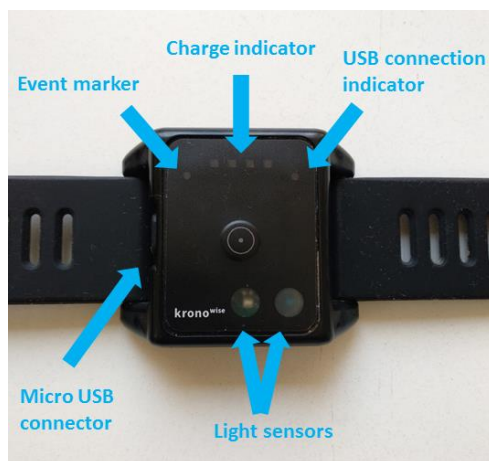


Figura 1. Dispositivo de ACM Kronowise®.

Kronowise® es un dispositivo de muñeca que proporciona información sobre diferentes variables relacionadas con los ritmos circadianos, como muestra la Figura 2.

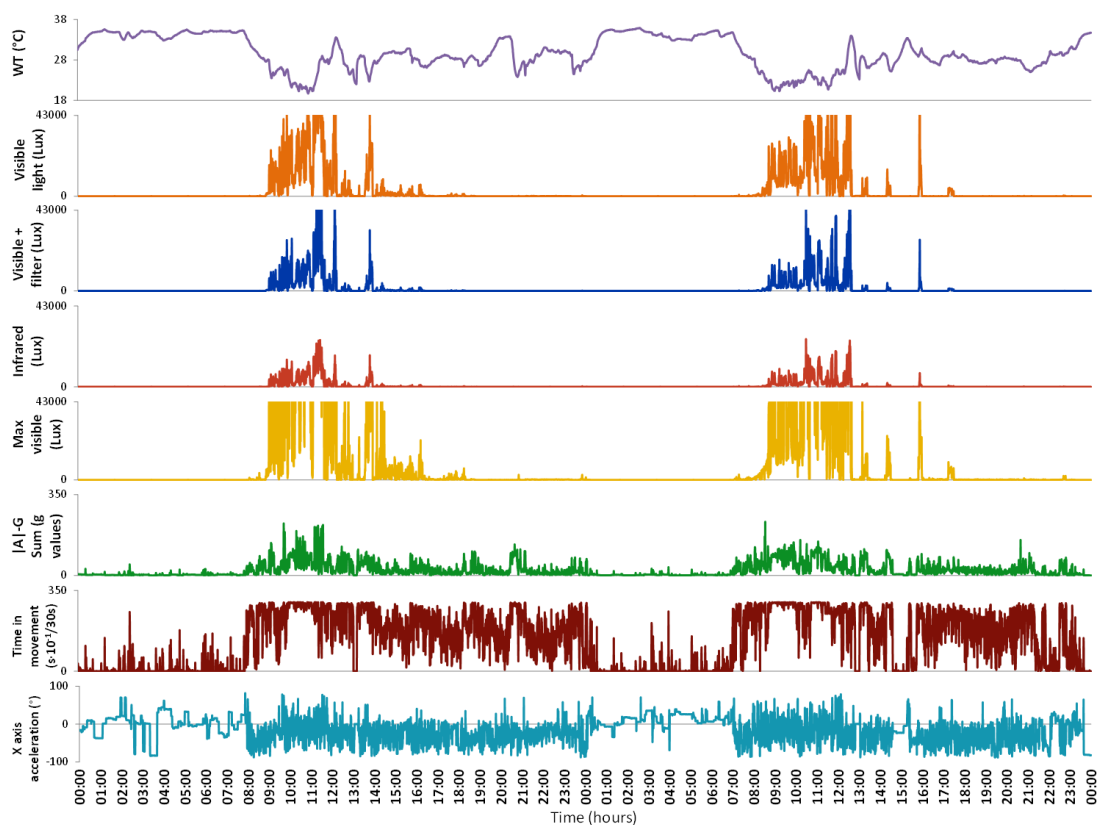


Figura 2. Variables monitorizadas por Kronowise® exportadas por su software de programación (Kronoware 10.0) de un registro representativo. De arriba a abajo: temperatura de la muñeca (en ° C), luz visible, luz azul filtrada, luz infrarroja, luz visible máxima (todo en lux), aceleración integrada (expresada en valores de g), tiempo en movimiento integrado (expresado como movimiento en

intervalos de 30 segundos) e inclinación del eje X en grados. El gráfico de tiempo en movimiento está saturado porque, en condiciones naturales, nunca podría superar los $300 \text{ s} \cdot 10^{-1} / 30\text{s}$. Las variables de luz se cortan porque el dispositivo es lineal hasta 43000 lux y por encima se satura.

Su peso es de aproximadamente 60 g, su batería tiene una duración de 21 días, e incluye los siguientes sensores (Madrid-Navarro et al., 2018):

- Un sensor de temperatura, con una precisión de $\pm 0,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y una resolución de $0,0635 \text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Un acelerómetro MEMS de tres ejes calibrado con una sensibilidad lineal e igual a lo largo de los tres ejes, con un rango de $\pm 2 \text{ g}$ y una sensibilidad de $0,001 \text{ g}$. La frecuencia de muestreo está establecida por defecto a 10 Hz.
- Tres sensores de luz, en el frontal, determinan espectro total, infrarrojo y luz azul, con un rango de entre 0,01 y 43000 lux, 16 bits de resolución, autoajuste interno según el nivel de luminancia, y supresión de parpadeo a 50/60 Hz. El sensor infrarrojo es sensible a radiación de 800 a 1700 nm, mientras que el detector de luz azul está equipado con un filtro Gaussiano que elimina toda la radiación visible por debajo de 440 nm y por encima de 500 nm (Figura 3) pero deja pasar radiación infrarroja. Además, el tiempo de integración para las medidas puede configurarse a 50, 100 y 400 ms, aunque si no se especifica, está predeterminado a 100 ms (suficiente para filtrar el ruido de parpadeo, típico de lámparas fluorescentes).

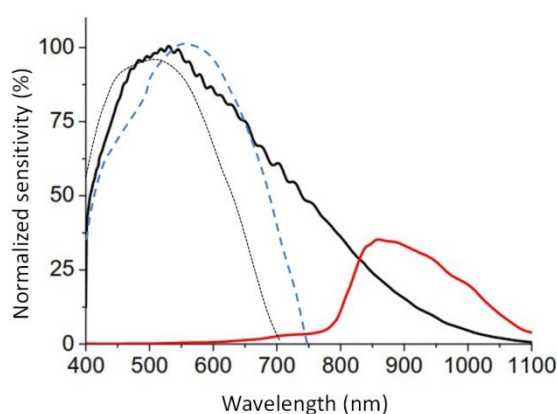


Figura 3. Respuesta espectral relativa de los canales de espectro completo (línea negra) e infrarrojo (línea roja) del sensor de luz visible de ACM Kronowise® proporcionado por el fabricante, en comparación con la curva normalizada de visión fotópica humana (línea discontinua azul, Vos 1978) y visión escotópica (línea punteada negra, CIE 1951).

La comunicación entre Kronowise® y un ordenador se establece utilizando el software Kronoware 10.0 (Kronohealth SL, Spain) mediante un puerto USB para extraer los datos. Este software permite la inspección visual de los datos antes de su análisis para eliminar posibles artefactos, así como el cálculo de parámetros circadianos y de sueño básicos. El coeficiente de variación intra-dispositivo es del 0,11 % e inter-dispositivo del 2,5 % para luz visible, mientras que para luz azul son del 0,14 % y 3,14 % respectivamente.

2. Rendimiento fotométrico de los canales de luz

La sensibilidad de los sensores de luz de Kronowise® en el espectro de luz visible es muy similar a la sensibilidad fotópica de la retina humana y, además, permanece estable a lo largo de todos los canales humanos fotópicos de luz (azul, verde o rojo, Figura 3).

El filtro azul fue seleccionado entre muchos otros para mimetizar la respuesta melanópica y la respuesta inhibitoria de la melatonina por luz. La Figura 4 representa la irradiancia espectral de la luz del sol cuando se aplica el filtro medida con el SPR.

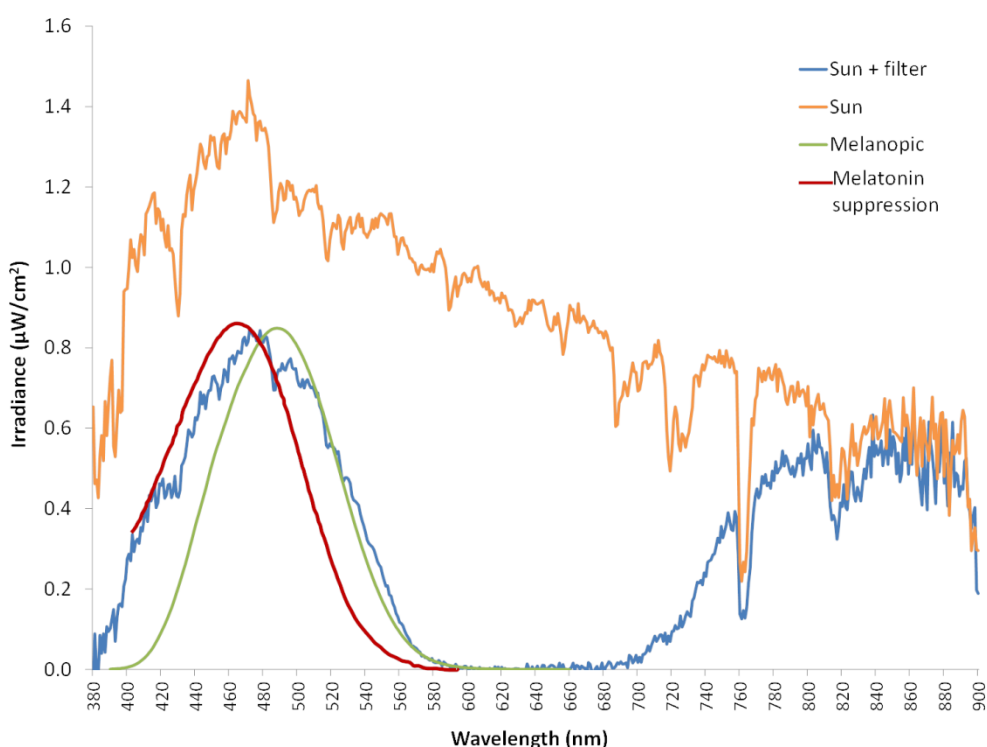


Figura 4. Espectro de luz solar medido en irradiancia con el espectroradiómetro (línea naranja). La línea azul representa el espectro de luz solar medido con el filtro azul (también con el espectroradiómetro), mientras que la línea verde corresponde a la curva de sensibilidad de ipRGCs según el modelo de Enezi et al. (2011), y la línea roja indica la curva de supresión de melatonina por luz según el modelo de Brainard et al. (2001).

La respuesta direccional de los sensores de luz en un plano es muy similar a una curva Gaussiana sin depender del ángulo incidente, ya que más del 80 % de la intensidad de luz máxima se detecta en el rango central de 50°, y a medida que el ángulo aumenta en ambas direcciones, la sensibilidad cae drásticamente (Figura 5), lo que se asemeja a la curva de sensibilidad de tres dimensiones del ojo humano a la luz incidente (Figueiro et al., 2013). Esto se debe a que los sensores están localizados en el centro de una ventana cubierta por un cristal difusor de ópalo.

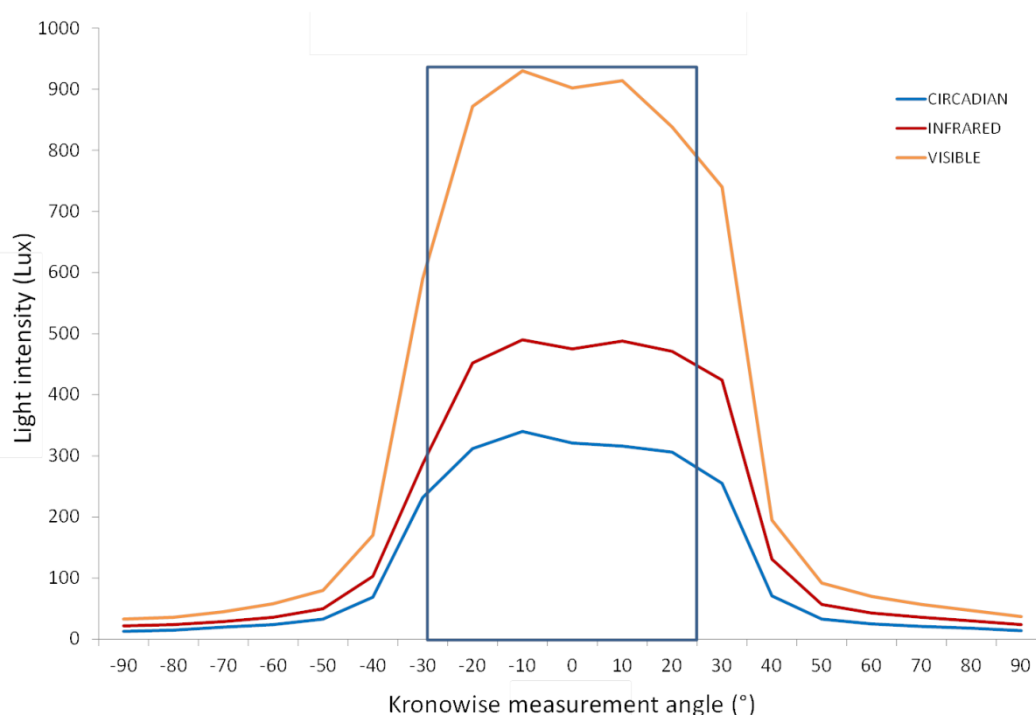


Figura 5. Intensidad de la luz según el ángulo de medida para los tres canales de luz de Kronowise® de una fuente de luz colocada a 50 cm del dispositivo. Los tres canales detectaron más del 80% de la intensidad máxima de la luz en un rango de 50°. La línea azul representa las medidas del canal circadiano, la línea roja indica las del canal infrarrojo y la línea naranja corresponde a las medidas del canal visible.

3. Evaluación de las fuentes de iluminación

Los sensores de luz del ACM se calibraron con un espectrorradiómetro (SPR) visible-infrarrojo cercano (Ocean Optics Inc, FL, USA) utilizado como dispositivo de referencia. Este SPR mide gran variedad de parámetros además de los empleados en este estudio: irradiancia e iluminancia. Además, incorpora un corrector coseno (modelo CC-3, Ocean Optics Inc., FL, USA) con un cristal opalino como difusor y un ángulo de medida de 180 °.

La exposición a luz en condiciones de laboratorio se realizó con una amplia variedad de fuentes de iluminación artificiales comerciales, incluyendo (Figura 6): LED de 5700 K (LuciPanel Evo from Lucibel SA, France), LED de 3000 K (LuciPanel Evo from Lucibel SA, France), LED ámbar (Ingnialight Sacopa S.A.U., Spain) LED rojo-verde-azul (RGB, prototipo fabricado en la Universidad de Murcia), LED rojo-verde-violeta (RGV, prototipo fabricado en la Universidad de Murcia), vapor de mercurio (Luxten, Romania), incandescente (KDE Group, Spain), fluorescente (ADEO, France) y luz del sol medida desde una ventana que daba al suroeste entre las 11 AM y las 12:20 PM durante un día parcialmente nublado.

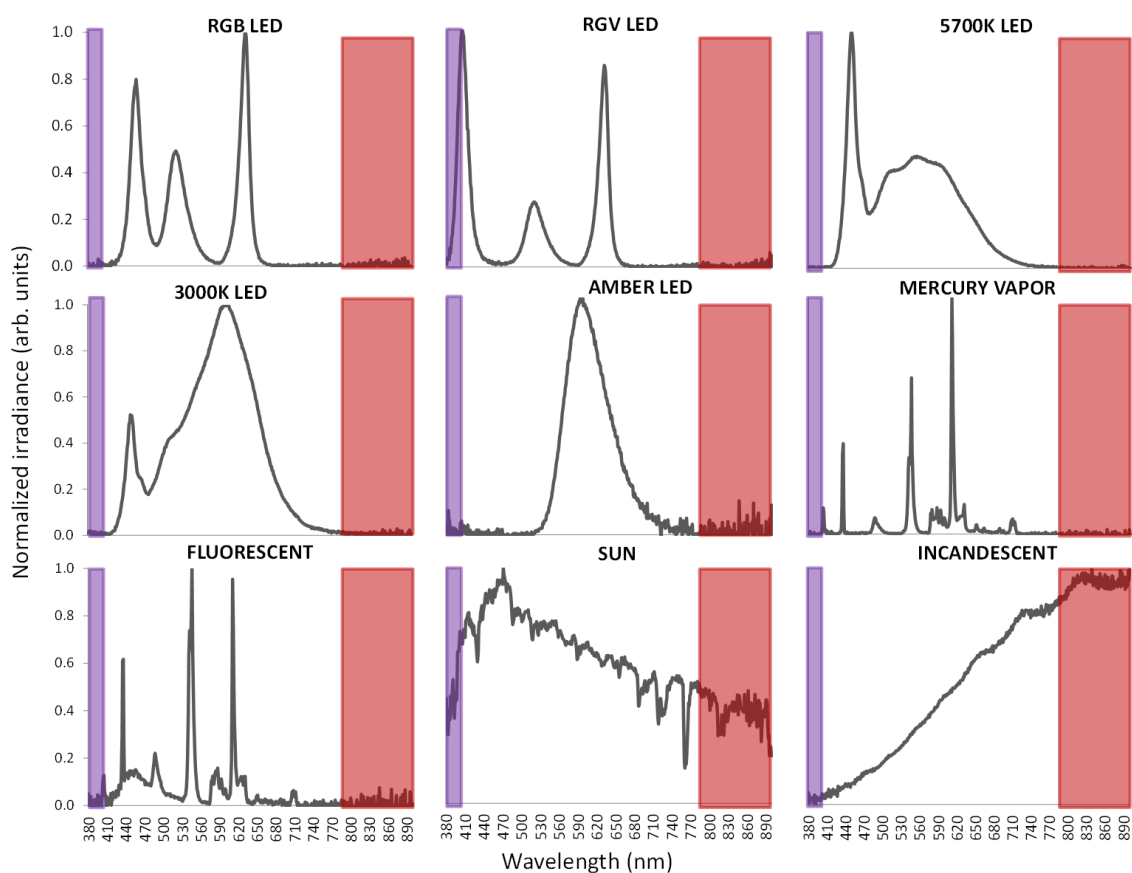


Figura 6. Espectros de luz visible normalizados de las nueve fuentes de luz diferentes utilizadas en este estudio medidas con espectroradiómetro. La normalización se ha realizado según el pico máximo de irradiancia. La banda infrarroja se resalta como un área roja y la banda ultravioleta en violeta.

Durante las medidas, la habitación estaba completamente a oscuras con excepción de la luz que se estaba midiendo. Se seleccionaron cuatro distancias diferentes desde la fuente de luz para medir: 54, 180, 237 y 480 cm.

4. Desarrollo del algoritmo para monitorización de la exposición a luz

Puesto que los sensores de luz de ACM son sensibles a la radiación infrarroja (Figura 3) y las fuentes de luz medidas presentaban espectros muy diferentes, incluyendo en algunos casos una parte considerable de la banda infrarroja (IR) del espectro, se hace necesario considerar esta radiación para ajustar las medidas a la luz visible y circadiana.

El algoritmo para el cálculo de exposición a luz visible y circadiana y la discriminación de la fuente de luz se desarrolló mediante el siguiente proceso:

- (i) Para cada fuente de luz y cada distancia, las medidas de luz se realizaron simultáneamente con el SPR y el ACM. Cada punto se midió tres veces y se expresó como la media de las tres medidas para cada dispositivo.
- (ii) Se calcularon las correlaciones entre las medidas de luz visible con SPR y ACM para todas las fuentes de luz.
- (iii) Entonces, se calcula la proporción de infrarrojo *versus* espectro total de luz (*IR/Full ratio*) a partir de los datos medidos por los sensores de luz visible e infrarrojo del ACM.
- (iv) A continuación, se diferenciaron tres grupos de fuentes de luz según su ratio de radiación IR/Total, permitiendo clasificar fuentes de luz en las siguientes categorías: luces artificiales con bajo contenido en IR, luces artificiales con alto contenido en IR y luz solar.
- (v) Para cada una de las tres categorías, se volvieron a realizar las correlaciones entre las medidas de SPR y ACM.
- (vi) Así, para cualquier dispositivo de iluminación, en primer lugar, la luz se clasifica según su ratio IR/Total en una de las tres categorías mencionadas previamente, y luego, se aplica la ecuación correcta de la correlación para el cálculo de la luz.

El mismo proceso se llevó a cabo para el cálculo de la exposición a luz circadiana. Sin embargo, en este caso, la activación teórica de las ipRGCs por la luz se obtuvo a partir de los datos medidos por el SPR, aplicando la herramienta desarrollada por CIE S 026/E:2018 (2018). Después, los lux melanópicos obtenidos se correlacionaron con las medidas del sensor de luz circadiana del ACM. Por último, se construyeron gráficos de Bland-Altman para la luz visible y circadiana medidas con el SPR y el ACM, antes y después de las correcciones de la radiación infrarroja, para investigar la posible existencia de un sesgo en las medidas.

5. Análisis estadístico

Las correlaciones lineales y el algoritmo se calcularon utilizando R Core Team (2017). R: *A language and environment for statistical computing (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria)*. Los gráficos de Bland–Altman se realizaron utilizando Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, United States).

RESULTADOS

La validez de las medidas realizadas por los sensores de luz visible y circadiana del ACM se comparó con las medidas de iluminancia del SPR tanto en lux como en unidades logarítmicas para todas luces empleadas en este estudio. El análisis de la correlación de las medidas de iluminancia (en lux) entre SPR y ACM resultó fuerte ($r = 0.946$) y altamente significativa ($p < 0,0001$) con una pendiente de 0,558. Esta correlación se hizo incluso más fuerte cuando se llevó a cabo con la iluminancia en unidades logarítmicas (pendiente = 0,867, $r = 0,996$, $p < 0,0001$).

Tabla 1. Correlación entre las medidas del espectroradiómetro y las de Kronowise® para luz visible y circadiana según el estándar CIE S 026, coeficiente r y valor p , y grados de libertad (DF) para todos los tipos de luz en conjunto, para luces con IR bajo, para luces con IR alto, para el sol y para la luz visible y circadiana recalculada.

Correlation			Formula	r coefficient	p value	DF
Spectroradiometer vs. Kronowise®	Visible light	All lights	$y = 0.558x$	0.946	<0.0001	35
		All lights (LOG)	$y = 0.867x$	0.996	<0.0001	35
		Low IR	$y = 0.684x$	0.997	<0.0001	27
		Low IR (LOG)	$y = 0.893x$	0.997	<0.0001	27
		High IR	$y = 0.272x$	0.999	<0.0001	3
		High IR (LOG)	$y = 0.756x$	0.992	<0.0005	3
		Sun	$y = 0.297x$	0.987	<0.005	3
		Sun (LOG)	$y = 0.843x$	0.999	<0.0001	3
		Calculated	$y = 0.994x$	0.997	<0.0001	35
		Calculated (LOG)	$y = 1.025x$	0.998	<0.0001	35
	Blue light	All lights	$y = 1.324x$	0.902	<0.0001	35
		All lights (LOG)	$y = 1.029x$	0.989	<0.0001	35
		Low IR	$y = 1.883x$	0.999	<0.0001	27
		Low IR (LOG)	$y = 0.110x$	0.995	<0.0001	27
		High IR	$y = 0.310x$	0.999	<0.0001	3
		High IR (LOG)	$y = 0.753x$	0.992	<0.001	3
		Sun	$y = 0.878x$	0.991	<0.001	3
		Sun (LOG)	$y = 0.990x$	0.999	<0.0001	3
		Calculated	$y = 0.997x$	0.998	<0.0001	35
		Calculated (LOG)	$y = 1.020x$	0.998	<0.0001	35

Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las fuentes de luz con alto contenido infrarrojo no se comportan de acuerdo con la ecuación general. Para ello, se calculó el ratio IR/Total para todas las luces (Tabla 2) y se obtuvieron tres grupos de fuentes de iluminación: artificiales con bajo

contenido IR ($IR/Total < 0,1$), artificiales con alto contenido IR ($IR/Total > 0,6$) y luz solar ($0,1 < IR/Total < 0,6$).

Table 2. Ratio luz infrarroja/Total ($IR/Full$) para las luces medidas a cuatro distancias diferentes ($D1=54$ cm, $D2=180$ cm, $D3=237$ cm y $D4=480$ cm). Se obtuvieron tres grupos de luces: iluminantes artificiales con bajo contenido en IR (recuadro rojo), iluminantes artificiales con alto contenido en IR (recuadro verde) y luz solar (recuadro lila).

Light	IR/Full				MEAN	SEM
	D1	D2	D3	D4		
RGB LED	0.013	0.009	0.012	0.011	0.011	0.001
RGV LED	0.015	0.013	0.013	0.013	0.013	0.001
5700 K LED	0.017	0.014	0.012	0.008	0.013	0.002
3000 K LED	0.026	0.021	0.019	0.019	0.021	0.002
Amber LED	0.027	0.03	0.032	0.032	0.03	0.001
Mercury vapor	0.025	0.024	0.026	0.024	0.025	0.001
Fluorescent	0.017	0.019	0.019	0.022	0.019	0.001
Sun	0.168	0.172	0.161	0.166	0.167	0.002
Incandescent	0.627	0.632	0.634	0.644	0.634	0.004

Cuando se consideró el ratio $IR/Total$ para luz visible, tanto en lux como en log lux, y se empleó la ecuación lineal correspondiente por grupos, las correlaciones entre SPR y Kronowise® para todas las luces mejoraron considerablemente. Resultó ser más fuerte y con una pendiente cercana a 1 (pendiente = 0,994, $r = 0,997$, $p < 0,0001$ en lux y pendiente = 1,025, $r = 0,998$, $p < 0,0001$ en log lux) que cuando no se tuvo en cuenta el ratio $IR/Total$ (pendiente = 0,558, $r = 0,946$, $p < 0,0001$ en lux y pendiente = 0,867, $r = 0,996$, $p < 0,0001$ en log lux) (Tabla 1).

El mismo proceso se empleó para la luz circadiana detectada por el sensor de luz azul. Las correlaciones entre los melanopic lux medidos con SPR (CIE S 026/E:2018, 2018) y las medidas del ACM con el filtro azul fueron fuertes (pendiente = 1,324, $r = 0,902$ en lux y pendiente = 1,029, $r = 0,989$ en log lux) y significativas ($p < 0,0001$ en ambas unidades). De nuevo, la interferencia del contenido en infrarrojo redujo ligeramente la precisión del cálculo. Así, las correlaciones mejoraron cuando se tuvieron en cuenta las tres categorías de luz (pendiente = 0,997, $r = 0,998$, $p < 0,0001$ en lux y pendiente = 1,020, $r = 0,998$, $p < 0,0001$ en log lux).

En cuando a la estabilidad del ACM según el ángulo incidente, el hecho de que los sensores de luz estén cubiertos por un difusor permite que la detección de luz sea de más del 80 % del máximo en un rango de 50° de cambio en el ángulo incidente, y un 50 % del máximo en un rango de 70° (Figura 5).

La Figura 7A muestra el gráfico de Bland-Altman para las medidas de luz visible con SPR y ACM antes de la corrección del contenido infrarrojo. Como se puede observar, los datos de iluminancia del sensor de espectro total de Kronowise® tendían a sobreestimar la intensidad de luz en comparación con SPR. Este efecto era incluso más pronunciado para aquellas luces con alto contenido infrarrojo. La figura 7B representa el gráfico de Bland-Altman para todas las medidas de iluminancia de luz visible después de la corrección del contenido infrarrojo, y como se puede ver, mejora considerablemente.

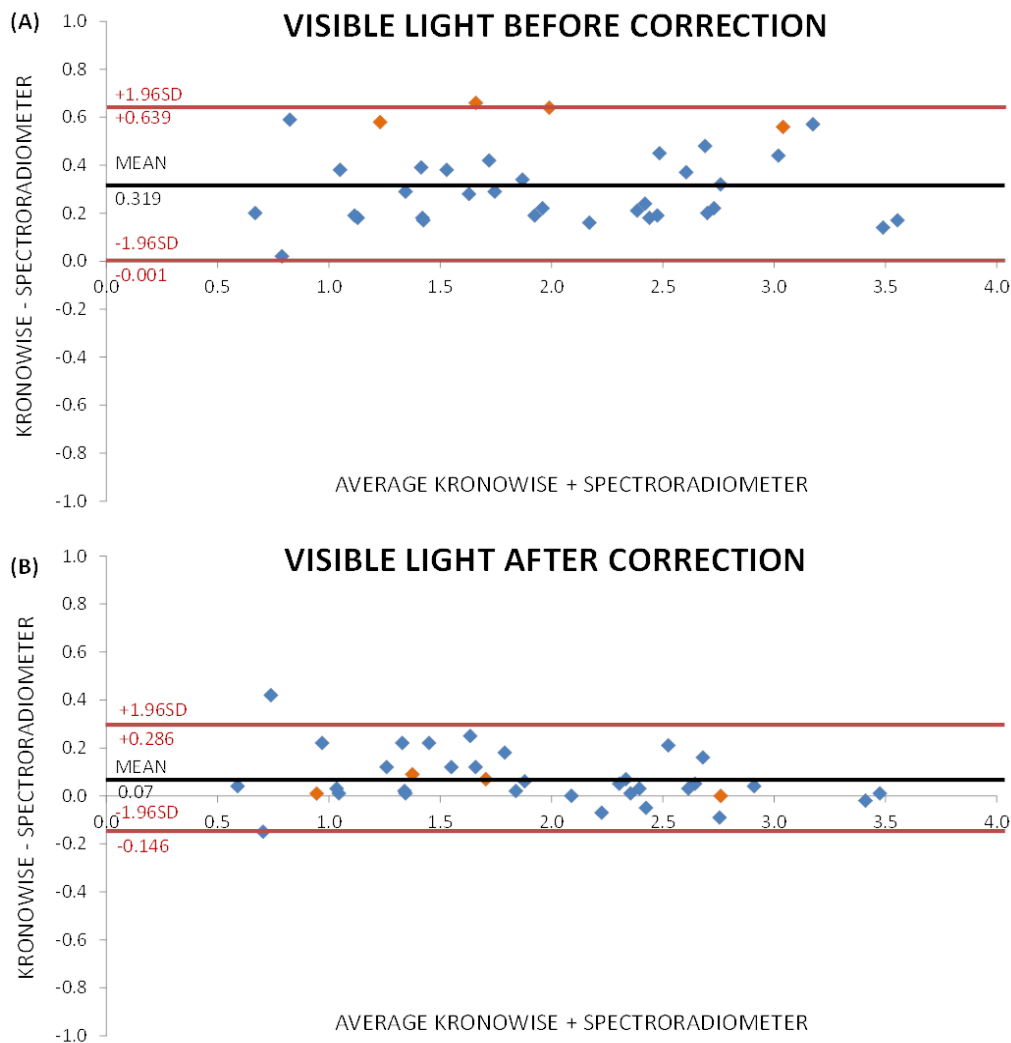


Figura 7. Gráfico de Bland-Altman que compara la intensidad de luz visible registrada por el espectroradiómetro y ACM. (A) Antes de la corrección por contenido infrarrojo. (B) Después de la corrección por contenido infrarrojo. Los puntos anaranjados corresponden a la luz incandescente.

Lo mismo sucede con los gráficos de Bland-Altman de luz circadiana tanto antes como después de la corrección de infrarrojo (Figuras 8A, 8B).

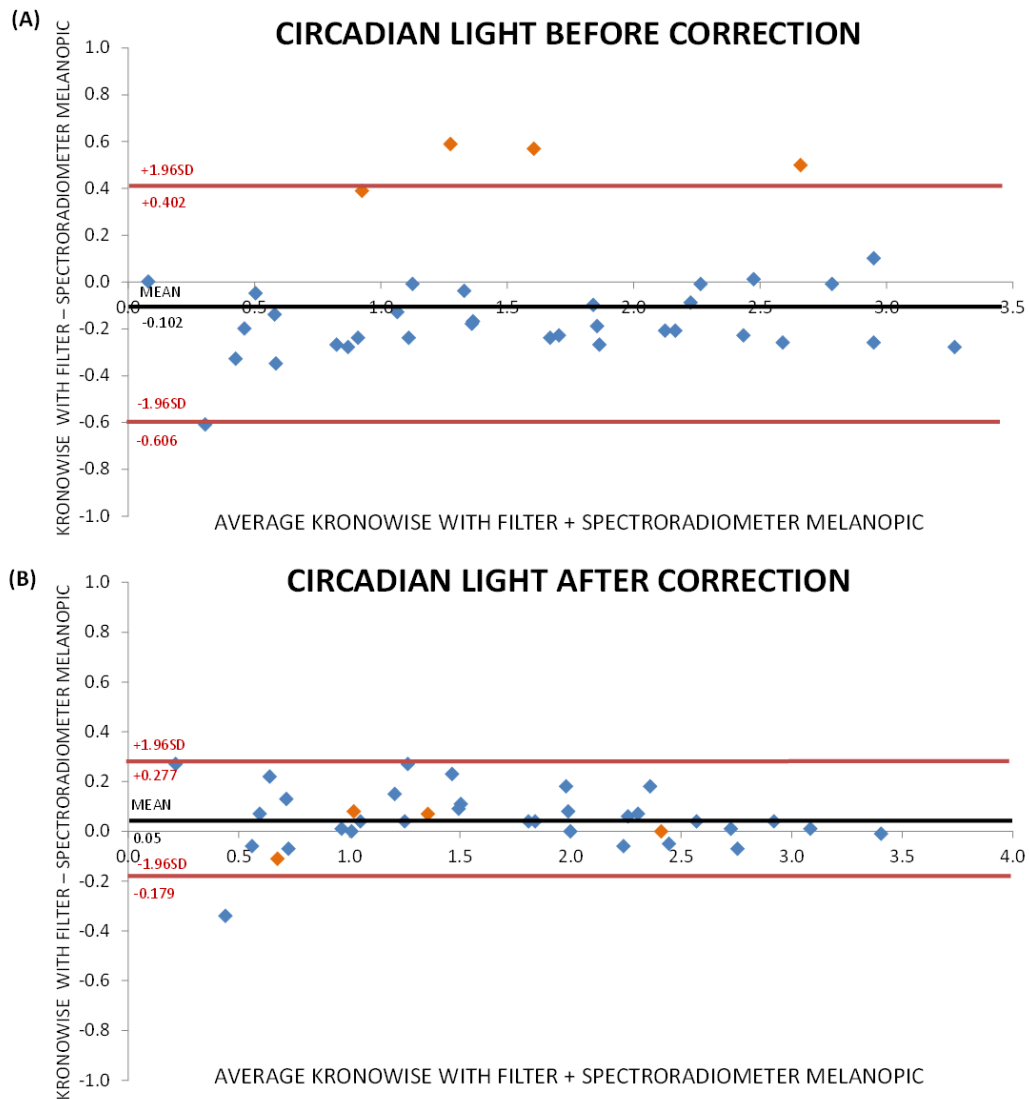


Figura 8. Gráfico de Bland-Altman que compara la intensidad de luz circadiana según el estándar CIE S 026, registrado por espectralradiómetro y ACM. (A) Antes de la corrección por contenido infrarrojo. (B) Después de la corrección por contenido infrarrojo. Los puntos naranjas corresponden a la luz incandescente y los puntos azules a luces de bajo contenido de infrarrojos y luz solar.

DISCUSIÓN

En este trabajo, hemos demostrado la capacidad espacial y espectral de un dispositivo de ACM de muñeca provisto de tres sensores de luz que combina el registro simultáneo de espectro total, luz infrarroja y luz azul, permitiendo no solo el registro del horario y la intensidad de la exposición a luz visible y circadiana, sino también distinguir la fuente de luz y por lo tanto, diferencia entre exposición a luz natural y artificial.

Debido al reciente descubrimiento de las ipRGCs y su función en la fotorrecepción circadiana (Berson et al., 2002; Brainard et al., 2001), se hace necesario desarrollar herramientas

prácticas y no invasivas para diferenciar específicamente su estimulación en condiciones de vida libre (Heil & Mathis, 2002; Sarabia et al., 2008), y no considerar únicamente la intensidad de la luz cuando se estudia la sincronización del sistema circadiano a la luz y sus consecuencias para la salud.

La integración de múltiples sensores en un único dispositivo para detectar varias señales de salida del sistema circadiano como la actividad motora, la posición corporal y la temperatura de la piel de la muñeca, en conjunto con la exposición individual a luz visible y circadiana facilitará el entendimiento, el diagnóstico y el tratamiento de aquellos problemas asociados con la sincronización circadiana, que están aumentando en sociedades desarrolladas.

Para facilitar el uso del dispositivo de ACM en condiciones de vida libre, se ha diseñado para ser llevado en la muñeca, descartando otros lugares más cercanos a los ojos pero muchos más incómodos para los sujetos. Aunque en un primer momento podría decirse que esta posición podría afectar la precisión de las medidas de luz, estudios previos han demostrado que las diferencias en la exposición activa a luz circadiana son sorprendentemente pequeñas, menores del 10 % de media cuando se comparan los datos al nivel de los ojos y al de la muñeca (Figueiro et al., 2013). Por ello, la medida de exposición a luz en lugares distintos a los ojos también constituye un método fiable cuando se evalúa la exposición a luz circadiana.

Para registrar luz visible (400-700 nm), se empleó una combinación de dos sensores en Kronowise®, uno de ellos de espectro total desde los 400 a los 1100 nm y otro de luz infrarroja (de 700 a 1100 nm). La combinación de estas dos medidas permite, por un lado, distinguir si la fuente de luz es natural o artificial y, por otro, si la luz proviene de fuentes de iluminación con alto o bajo contenido infrarrojo, o del sol, como en los espectros mostrados en la Figura 6. La luz circadiana efectiva se detecta gracias a un filtro azul que cubre un segundo sensor de espectro completo. El filtro seleccionado muestra un perfil de transmitancia de la luz solar que coincide en gran medida tanto con la curva espectral de inhibición de melatonina (Brainard et al., 2001), como con el modelo de sensibilidad de melanopsínica de las ipRGCs (Enezi et al., 2011), dejando pasar radiación visible entre 380 y 590 nm, y radiación por encima de 680 nm. Por ello, la “dosis” de luz circadiana activa a la que un sujeto está expuesto puede calcularse sin interferencias de la combinación de detectores verde y azul, como sucede con el dispositivo Actiwatch Spectrum (Cao et al., 2015). Hasta la fecha, y hasta donde sabemos, solo existen dos dispositivos ambulatorios para la detección de luz visible y circadiana: el Daysimeter (Bierman et al., 2005) y Actiwatch Spectrum (Philips). El Daysimeter, un dispositivo que se lleva en la cabeza, ha sido diseñado específicamente para medir exposición a luz, así que su rendimiento

en este campo resulta muy interesante; sin embargo, el dispositivo solo incluye un acelerómetro y debe colocarse cerca de los ojos, limitando considerablemente su capacidad de detectar estados de sueño y de vigilia. Además, y aunque su sensor de luz muestra una curva de sensibilidad restringida al espectro fotópico, presenta una caída significativa entre 550 y 600 nm, una banda a la que el ojo humano es sensible (Dartnall et al., 1983; Roorda & Williams, 1999).

El segundo dispositivo, Actiwatch Spectrum, fue diseñado originalmente para detectar los ritmos de sueño-vigilia (Kripke et al., 2010; Young et al., 2009), y más tarde incorporó la detección de RGB. Esto consiste en tres sensores de luz de color en longitudes de onda largas (~600–700 nm), medias (450–600 nm) y cortas (~400–550 nm), que corresponden a los *outputs* espectrales R, G, B y en un *output* de banda ancha de “luz blanca” (W) (Cao et al., 2015; Price et al., 2012). Sin embargo, su espectro de sensibilidad no coincide con el de la retina humana. Muestra un patrón bimodal, con un pico principal en longitudes de onda cortas y otro pico secundarios en longitudes de onda largas. Por el contrario, en la banda de 570-600 nm, el dispositivo no es sensible prácticamente. Esta banda, además de su sensibilidad para la retina humana, es característica de fuentes de iluminación de descarga, como las lámparas fluorescentes (Figueiro et al., 2013). Consecuentemente, las medidas fotométricas de estas fuentes de iluminación tan comunes estarán sesgadas sistemáticamente con un este dispositivo y la estimulación de luz circadiana debe deducirse indirectamente de los datos registrados por los sensores verde y azul.

Este trabajo posee limitaciones, puesto que utilizamos un único dispositivo Kronowise® y una sola fuente de luz al mismo tiempo, por lo que en futuras investigaciones debería emplearse una combinación de diferentes fuentes de iluminación natural y artificial para asemejarse a las condiciones naturales.

El dispositivo de ACM presentado posee una combinación única de sensores para el registro simultáneo de temperatura de la piel, posición, movimiento (salidas circadianas), y exposición a luz visible y circadiana (entradas circadianas). Estudios previos han demostrado que la combinación de temperatura de la piel, actimetría y posición supone una evaluación fiable del estado del sistema circadiano, puesto que incluye variables con un componente endógeno (temperatura de la piel) pero también variables reactivas a las demandas comportamentales (actividad motora y posición corporal) (Bonmati-Carrion et al., 2013; Ortiz-Tudela et al., 2014, 2010). Considerando que el *zeitgeber* más importante para la sincronización circadiana es el ciclo de luz-oscuridad (Roenneberg et al., 2003; Roenneberg & Foster, 1997), su registro

simultáneo con otras vías de salida parece proporcionar una evaluación integral de la función circadiana. En este sentido, Kronowise® puede constituir una herramienta útil y cómoda para profundizar en el conocimiento de los efectos sincronizadores de la luz mientras los sujetos mantienen su modo de vida habitual.

CONCLUSIÓN

Nuestros resultados han demostrado la validez y sensibilidad del dispositivo de ACM Kronowise® para evaluar la exposición a luces de diferentes espectros. Además, nuestro algoritmo es válido para calcular, directamente a partir de los datos de Kronowise®, la exposición a luz visible y circadiana, y distinguir entre diferentes tipos de luz, proporcionando una historia individual de exposición a luz mucho más detallada.

El uso de dispositivos calibrados de ACM como el empleado en este trabajo, combinando monitorización simultánea de ritmos circadianos y exposición a luz visible y circadiana, contribuirá a avanzar en el entendimiento de los efectos de la luz en la sincronización del sistema circadiano y su asociación con la salud humana. Su naturaleza no invasiva y su facilidad de uso posibilitarán la monitorización de grandes poblaciones en condiciones de vida libre.

REFERENCIAS

- Berger, A. M., Wielgus, K., Hertzog, M., Fischer, P., & Farr, L. (2010). Patterns of circadian activity rhythms and their relationships with fatigue and anxiety / depression in women treated with breast cancer adjuvant chemotherapy. *Supportive Care in Cancer*, 18(1), 105–114. <https://doi.org/10.1007/s00520-009-0636-0>
- Berson, D. M., Dunn, F. A., & Takao, M. (2002). Phototransduction by Retinal Ganglion Cells That Set the Circadian Clock. *Science*, 295(5557), 1070–1073. <https://doi.org/10.1126/science.1067262>
- Bierman, A., Klein, T. R., & Rea, M. S. (2005). The Daysimeter: A device for measuring optical radiation as a stimulus for the human circadian system. *Measurement Science and Technology*, 16(11), 2292–2299. <https://doi.org/10.1088/0957-0233/16/11/023>
- Bonmati-Carrion, M. A., Arguelles-Prieto, R., Martinez-Madrid, M. J., Reiter, R., Hardeland, R., Rol, M. A., & Madrid, J. A. (2014). Protecting the melatonin rhythm through circadian healthy light exposure. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(12). <https://doi.org/10.3390/ijms151223448>

- Bonmati-Carrion, M. A., Middleton, B., Revell, V., Skene, D. J., Rol, M. A., & Madrid, J. A. (2013). Circadian phase assessment by ambulatory monitoring in humans : Correlation with dim light melatonin onset. *Chronobiology International*, 31(1), 37–51. <https://doi.org/10.3109/07420528.2013.820740>
- Brainard, G. C., Hanifin, J. P., Greeson, J. M., Byrne, B., Glickman, G., Gerner, E., & Rollag, M. D. (2001). Action Spectrum for Melatonin Regulation in Humans: Evidence for a Novel Circadian Photoreceptor. *The Journal of Neuroscience*, 21(16), 6405–6412. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-16-06405.2001>
- Cao, D., Barrionuevo, P. A., & Sciences, V. (2015). Estimating photoreceptor excitations from spectral outputs of a personal light exposure measurement device. *Chronobiology International*, 32(2), 270–280. <https://doi.org/10.3109/07420528.2014.966269>. Estimating
- CIE S 026/E:2018 CIE System for Metrology of Optical Radiation for ipRGC-Influenced Responses to Light. (2018). *Color Research & Application* (Vol. 44). Vienna. <https://doi.org/10.1002/col.22350>
- Dartnall, H. J., Bowmaker, J. K., & Mollon, J. D. (1983). Human visual pigments: microspectrophotometric results from the eyes of seven persons. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 220(1218), 115–130.
- Enezi, J. Al, Revell, V., Brown, T., Wynne, J., Schlangen, L., & Lucas, R. (2011). A “melanopic” spectral efficiency function predicts the sensitivity of melanopsin photoreceptors to polychromatic lights. *Journal of Biological Rhythms*, 26(4), 314–323. <https://doi.org/10.1177/0748730411409719>
- Erren, T. C., & Reiter, R. J. (2009). Light Hygiene: Time to make preventive use of insights - old and new - into the nexus of the drug light, melatonin, clocks, chronodisruption and public health. *Medical Hypotheses*, 73(4), 537–541. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2009.06.003>
- Figueiro, M. G., Hamner, R., Bierman, A., & Rea, M. S. (2013). Comparisons of three practical field devices used to measure personal light exposures and activity levels. *Lighting Research and Technology*, 45(4), 421–434. <https://doi.org/10.1177/1477153512450453>
- Garaulet, M., & Madrid, J. A. (2010). Chronobiological aspects of nutrition, metabolic syndrome and obesity. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(9–10), 967–978.

<https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.05.005>

Heil, D. P., & Mathis, S. R. (2002). Characterizing free-living light exposure using a wrist-worn light monitor. *Applied Ergonomics*, 33, 357–363. [https://doi.org/10.1016/S0003-6870\(02\)00007-8](https://doi.org/10.1016/S0003-6870(02)00007-8)

Kolodyazhniy, V., Späti, J., Frey, S., Götz, T., Wirz-justice, A., Kräuchi, K., ... Wilhelm, H. (2011). Estimation of Human Circadian Phase via a Multi-Channel Ambulatory Monitoring System and a Multiple Regression Model. *Journal of Biological Rhythms*, 26(1), 55–67. <https://doi.org/10.1177/0748730410391619>

Kripke, D. F., Hahn, E. K., Grizas, A. P., Wadiak, K. E. P. H., Loving, R. T., & Poceta, J. S. (2010). Wrist actigraphic scoring for sleep laboratory patients: algorithm development. *Journal of Sleep Research*, 19(4), 612–619. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2869.2010.00835.x>

Lemmer, B., Scholtze, J., & Schmitt, J. (2016). Circadian rhythms in blood pressure, heart rate, hormones, and on polysomnographic parameters in severe obstructive sleep apnea syndrome patients: effect of continuous positive airway pressure. *Blood Pressure Monitoring*, 21, 136–143. <https://doi.org/10.1097/MBP.0000000000000173>

Madrid-Navarro, C. J., Escamilla-Sevilla, F., Mínguez-Castellanos, A., Campos, M., Ruiz-Abellán, F., Madrid, J. A., & Rol, M. A. (2018). Multidimensional circadian monitoring by wearable biosensors in Parkinson's disease. *Frontiers in Neurology*, 9(MAR), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00157>

Navara, K. J., & Nelson, R. J. (2007). The dark side of light at night: Physiological, epidemiological, and ecological consequences. *Journal of Pineal Research*, 43(3), 215–224. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00473.x>

Ortiz-Tudela, E., Bonmati-Carrion, M. D. L. A., De la Fuente, M., & Mendiola, P. (2012). La cronodisrupción como causa de envejecimiento. *Revista Española de Geriatria y Gerontología*, 47(4), 168–173. <https://doi.org/10.1016/j.regg.2011.09.013>

Ortiz-Tudela, E., Martinez-Nicolas, A., Albares, J., Segarra, F., Campos, M., Estivill, E., ... Madrid, J. A. (2014). Ambulatory Circadian Monitoring (ACM) based on Thermometry, motor Activity and body Position (TAP): A comparison with polysomnography. *Physiology and Behavior*, 126, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.12.009>

Ortiz-Tudela, E., Martinez-Nicolas, A., Campos, M., Rol, M. Á., & Madrid, J. A. (2010). A new

- integrated variable based on thermometry, actimetry and body position (TAP) to evaluate circadian system status in humans. *PLoS Computational Biology*, 6(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000996>
- Panda, S., Hogenesch, J. B., & Kay, S. A. (2002). Circadian rhythms from flies to human. *Nature*, 417(6886), 329–335. <https://doi.org/10.1038/417329a>
- Pauley, S. M. (2004). Lighting for the human circadian clock: Recent research indicates that lighting has become a public health issue. *Medical Hypotheses*, 63(4), 588–596. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2004.03.020>
- Price, L. L. A., Khazova, M., & Hagan, J. B. O. (2012). Performance assessment of commercial circadian personal exposure devices. *Lighting Research & Technology*, 44, 17–26. <https://doi.org/10.1177/1477153511433171>
- Reiter, R. J., Tan, D.-X., Korkmaz, A., Erren, T. C., Piekarski, C., Tamura, H., & Manchester, L. C. (2012). Light at Night, Chronodisruption, Melatonin Suppression, and Cancer Risk: A Review. *Critical ReviewsTM in Oncogenesis*, 13(4), 303–328. <https://doi.org/10.1615/critrevoncog.v13.i4.30>
- Roenneberg, T., Daan, S., & Mellow, M. (2003). The Art of Entrainment. *Journal of Biological Rhythms*, 18(3), 183–194. <https://doi.org/10.1177/0748730403253393>
- Roenneberg, T., & Foster, R. G. (1997). Twilight Times: Light and the Circadian System. *Photochemistry and Photobiology*, 66(5), 549–561.
- Roorda, A., & Williams, D. R. (1999). The arrangement of the three cone classes in the living human eye. *Nature*, 397(6719), 520–522.
- Sarabia, J. A., Rol, M. A., Mendiola, P., & Madrid, J. A. (2008). Circadian rhythm of wrist temperature in normal-living subjects A candidate of new index of the circadian system. *Physiology & Behavior*, 95(4), 570–580. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.08.005>
- Young, K., Kripke, D. F., Poceta, J. S., Shadan, F., Jamil, S. M., Cronin, J. W., & Kline, L. E. (2009). Evaluation of immobility time for sleep latency in actigraphy. *Sleep Medicine*, 10(6), 621–625. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2008.07.009>

3.2. CAPÍTULO EXPERIMENTAL 2:

**EFFECTOS DE LA LUZ CON ALTO Y BAJO CONTENIDO
EN AZUL SOBRE MARCADORES CIRCADIANOS.
RELACIÓN CON INHIBICIÓN DE MELATONINA Y
REFLEJO PUPILAR A LA LUZ**

3.2. EFECTOS DE LA LUZ CON ALTO Y BAJO CONTENIDO EN AZUL SOBRE MARCADORES CIRCADIANOS. RELACIÓN CON INHIBICIÓN DE MELATONINA Y REFLEJO PUPILAR A LA LUZ

RESUMEN

La vía de entrada que lleva la señal luminosa al sistema circadiano empieza en las células ganglionares de la retina intrínsecamente fotosensibles (ipRGCs). Esta vía de entrada, sin embargo, no solo está implicada en la sincronización del reloj central (núcleo supraquiasmático, SCN) sino que también es parcialmente responsable del reflejo pupilar a la luz (PLR). De entre todas las vías de salida del sistema circadiano, la secreción de melatonina es la mejor caracterizada. La síntesis de esta indolamina se suprime por acción de la luz, especialmente de aquellas longitudes de onda entre 460 y 480 nm. El modo de vida de las sociedades modernas ha dado lugar a la aparición de la disfunción circadiana o cronodisrupción, que está asociada con varios problemas de salud. La importancia de estas circunstancias hace esencial entender los efectos del espectro y la intensidad de la luz en marcadores circadianos. El principal objetivo de este trabajo fue determinar la influencia de la temperatura de color de la luz en dos marcadores circadianos: inhibición de melatonina y reflejo pupilar a la luz en personas jóvenes y ancianas. Además, también investigamos el modelo teórico de inhibición de melatonina cuyas predicciones se ajusten mejor a nuestros resultados. Para ello, dieciséis voluntarios jóvenes y ocho ancianos fueron reclutados para participar en este estudio, y dos luces experimentales de diferente temperatura de color correlacionada (CCT) fueron empleadas (3000 K y 5700 K). La primera semana de estudio, los voluntarios llevaron un dispositivo de monitorización circadiana ambulatoria (ACM): Kronowise® para medir sus patrones habituales de exposición a luz. Para llevar a cabo la prueba de supresión de melatonina, se dio instrucciones a los participantes para seguir el protocolo de inicio de melatonina bajo luz tenue (DLMO) en su propia casa. EL mismo día de las dos semanas siguientes, fueron sometidos al protocolo de inhibición de melatonina en el laboratorio, llevando a cabo un diseño cruzado y aleatorizado para cada tipo de luz. El protocolo para medir el reflejo pupilar a la luz fue adaptado de Park et al. (2011), aplicando un estímulo luminoso de 1 segundo. Las respuestas pupilares a los 6 segundos (6S-PIPR) y a los 30 segundos (30S-PIPR) después del estímulo fueron medidas, al igual que el diámetro pupilar mínimo y la velocidad de contracción. Nuestros resultados produjeron supresión de melatonina significativa bajo ambas condiciones de luz en comparación con la condición de luz tenue (41,7 %, $p < 0,001$, t de Student = 6,687, grados de libertad = 21 para la luz de 5700 K, y

33,3 %, $p < 0,005$, t de *Student* = 3,852, grados de libertad = 21, para la luz de 3000 K), de acuerdo con las predicciones de los modelos teóricos (47 % para la luz de 5700 K y 44 % para la luz de 3000 K). Además, la luz de 5700K produjo una mayor contracción en 6S-PIPR (82,8 % para la luz de 5700 K vs. 87,5 % para la de 3000 K, $p < 0,001$, $F = 18,123$, grados de libertad = 22), y descubrimos que en los participantes ancianos, el diámetro mínimo fue menor (59,1 % vs. 68,5 % para los jóvenes, $p < 0,005$, $F = 12,157$, grados de libertad = 1) y la velocidad de contracción, más rápida (35,0 % vs. 26,3 % para los jóvenes, $p < 0,005$, $F = 12,683$, grados de libertad = 1) en comparación con los jóvenes. Nuestros resultados confirmaron que incluso la luz con menor contenido en radiación azul produjo inhibición de melatonina significativa. Por otro lado, mayor contenido en luz azul produjo mayor contracción en la respuesta pupilar después del estímulo luminoso que está regulada por las ipRGCs. En conclusión, ambas técnicas son útiles para analizar el impacto de la luz en el sistema circadiano, ya que proporcionan información diferente y complementaria.

INTRODUCCIÓN

Desde la aparición de la vida en la Tierra, los seres vivos han estado expuestos a continuas fluctuaciones ambientales cíclicas. La rotación de nuestro planeta sobre su propio eje da lugar al ciclo diario de luz-oscuridad, mientras que la rotación de la Tierra alrededor del Sol produce la alternancia de las estaciones. Por lo tanto, a lo largo del tiempo, se ha visto favorecida la existencia de mecanismos endógenos que permitan a los seres vivos anticiparse a los cambios cíclicos y coordinarse con su medio ambiente mediante ritmos que optimicen la actividad fisiológica, el metabolismo y el comportamiento: los ritmos circadianos (Baño Otálora, 2013).

El sistema circadiano (CS) está compuesto por una red de estructuras organizadas jerárquicamente cuyo principal marcapasos, en mamíferos, está localizado en el núcleo supraquiasmático (SCN) del hipotálamo (Madrid & Rol, 2006). El CS consiste en: una maquinaria oscilatoria que incluye el SCN (marcapasos principal) y osciladores periféricos, situados en la mayoría de células y tejidos; vías de entrada que proporcionan información del ciclo de luz-oscuridad, que es el principal sincronizador (*zeitgeber*) del reloj central; y vías de salida, que son responsables de la coordinación de los ritmos circadianos y de las diferentes funciones y procesos del organismo (Garaulet & Madrid, 2010). El punto de inicio de las vías de entrada es una pequeña subpoblación de células ganglionares de la retina (ipRGCs) que contienen un fotopigmento, llamando melanopsina, especialmente sensible a la luz azul entre 460 y 480 nm (Berson et al., 2002; Brainard et al., 2001). De entre todas las vías de salida que emergen del reloj central, el ritmo de secreción de melatonina pineal es el mejor conocido y

caracterizado (Buijs et al., 2003), cuya secreción sigue un ritmo endógeno regulado por estimulación noradrenérgica del SCN, con niveles máximos durante la noche y mínimos durante el día (Reiter, 1991). Esta hormona también está involucrada en la regulación circadiana del sueño y actúa como antioxidante (Schmidt et al., 2007). Sin embargo, su secreción se inhibe por la luz, especialmente en el rango de 460-480 nm (Revell & Skene, 2007). Por lo tanto, en los últimos años, se han desarrollado algunos modelos teóricos para estimar el nivel de su supresión y la activación de las ipRGCs en función del espectro y la intensidad de la luz (Lucas et al., 2014; Rea & Figueiro, 2018; Rea et al., 2010), recientemente estandarizados por la Comisión Internacional en Iluminación (CIE S 026/E:2018). Además, las ipRGCs no solo envían información al reloj central, también están involucradas en la regulación de la respuesta pupilar a la luz (Adhikari et al., 2015; Feigl & Zele, 2014; Gamlin et al., 2007; Joyce et al., 2015; Tsujimura & Tokuda, 2011) a través de la activación del núcleo pretectal olivar (Chen et al., 2011; Hattar et al., 2002).

La generalización de la luz eléctrica, hace aproximadamente 150 años, y el modo de vida de las sociedades modernas conlleva modificaciones en el horario de exposición a la luz, además de una disminución progresiva de la exposición a luz brillante durante el día, junto con un aumento en la exposición a luz artificial durante la noche. Esta situación, debida, al menos en parte, hacia la generalización de la vida nocturna, el trabajo a turnos y los vuelos transmeridianos, ha dado lugar a una desincronización crónica o desalineación entre los ritmos fisiológicos internos y entre el tiempo externo y el interno, un fenómeno conocido como cronodisrupción (Erren & Reiter, 2009, 2013). Esta desincronización está asociada a diversos problemas de salud, como el síndrome metabólico (Garaulet & Madrid, 2010; Reiter et al., 2012), las enfermedades cardiovasculares (Knutsson & Bøggild, 2000), deficiencias cognitivas y afectivas (Cho et al., 2000), una mayor incidencia de algunos tipos de cáncer (Hansen, 2001; Schernhammer et al., 2001) y envejecimiento prematuro (Kondratov, 2007) entre otros. La cronodisrupción se manifiesta de varias maneras, incluyendo disminución en la amplitud de los ritmos, aumento de la fragmentación, pérdida total de los propios ritmos y desfases entre el SCN y los relojes periféricos (Baño Otálora, 2013).

El sistema circadiano, como cualquier otro sistema en el organismo, está sometido a un proceso natural de envejecimiento y sus efectos se perciben a todos los niveles (Cajochen et al., 2005; Myers & Badia, 1995), incluyendo la entrada de luz, ya que el envejecimiento reduce la transmisión del cristalino, especialmente para la luz azul (Turner & Mainster, 2008) y, por lo tanto, altera los niveles de melatonina (Touitou, 2001; Turner et al., 2010).

La importancia de la cronodisrupción en la salud y el bienestar hace esencial profundizar en nuestro conocimiento de los efectos de la intensidad y el espectro de la luz. Para evaluar estos efectos durante la noche, es habitual evaluar tanto el retraso en la secreción de melatonina bajo condiciones de luz tenue como su inhibición (Bonmati-Carrion et al., 2015, 2013; Lewy et al., 1999; Lewy et al., 1980; Lewy & Sack, 1989; Voultsios et al., 1997). Más recientemente, se ha validado el reflejo pupilar en respuesta a la exposición a luz (PLR) como un nuevo marcador de fotorrecepción circadiana (Adhikari et al., 2015; Bonmati-Carrion et al., 2018, 2016; Gamlin et al., 2007; Ishikawa et al., 2012; Markwell et al., 2010). Sin embargo, la posible relación entre ambas técnicas aún no se ha estudiado en profundidad.

Por ello, el objetivo de este trabajo fue determinar la influencia de la temperatura de color correlacionada (CCT) de la luz sobre la inhibición de melatonina y el reflejo pupilar a la luz en jóvenes y ancianos. Además de evaluar la correspondencia de los resultados experimentales con las predicciones de los modelos teóricos más aceptados.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Participantes

Se reclutaron voluntarios jóvenes (dieciséis, 9 mujeres, $24 \pm 3,02$ años, media $\pm$ SD) y ancianos (ocho, 5 mujeres, $60 \pm 3,20$ años, media $\pm$ SD). Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de la Universidad de Murcia en línea con los estándares establecidos por la Declaración de Helsinki. Todos los participantes firmaron un consentimiento informado antes de su participación. Los voluntarios no estaban tomando ninguna medicación que pudiera influenciar los resultados del estudio. Además, ninguno de ellos había sufrido intervenciones quirúrgicas de la visión. Dos días antes de cada sesión experimental, se les pidió a los participantes que evitaran bebidas con cafeína y que mantuvieran hábitos regulares de sueño durante las tres semanas de estudio. Todas las muestras de melatonina se obtuvieron durante el mes de noviembre de 2017 y las medidas del reflejo pupilar a la luz durante diciembre de 2017.

2. Monitorización circadiana ambulatoria (ACM)

Los voluntarios llevaron un dispositivo de ACM, Kronowise® (Kronohealth SL, Murcia, España), en la mano no dominante para registrar sus patrones de exposición a luz durante la primera semana de estudio. Kronowise® está provisto con (Madrid-Navarro et al., 2018): i) un sensor de temperatura, con una precisión de $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ a 25°C y una resolución de $0,0635^{\circ}\text{C}$ para registrar la temperatura de la muñeca. ii) Un acelerómetro triaxial calibrado de tipo MEMS con

una sensibilidad lineal a lo largo de los tres ejes (0,001 g) y un rango de ± 2 g. iii) Y tres sensores de luz, en el frente, para registrar luz visible, infrarroja y azul, con un rango de entre 0,01 and 43.000 lux, 16 bits de resolución, un autoajuste interno según el nivel de iluminación, y supresión de parpadeo a 50/60 Hz. El sensor infrarrojo es sensible a radiación de 800 a 1070 nm, mientras que el de luz azul está equipado con un filtro Gaussiano que elimina toda la radiación visible por debajo de 440 nm y por encima de 500 nm (Arguelles-Prieto, Bonmati-Carrion, Rol, & Madrid, 2019). La comunicación con el dispositivo se establece vía USB mediante el software Kronoware 10.0 (Kronohealth SL, Murcia, Spain). Este software permite la inspección visual del registro antes del análisis para eliminar artefactos y el cálculo de parámetros circadianos y de sueño básicos. La onda media diaria de la luz visible se calculó para el total de los participantes y para los jóvenes y los ancianos con una frecuencia de 10 minutos.

3. Fuentes de luz

Se utilizó un panel LED inteligente (modelo Inspire 48W Gdansk, Leroy Merlin S.L., Lille, Francia). La temperatura de color correlacionada (CCT) se fijó en dos condiciones: a 3034 K y a 5669 K, para investigar su efecto en la inhibición de melatonina y el reflejo pupilar a la luz. El espectro en ambas condiciones (Figura 1), así como sus parámetros de intensidad se midieron con un espectrorradiómetro visible-infrarrojo cercano modelo USB2000+ (Ocean Optics Inc., Florida, EEUU).

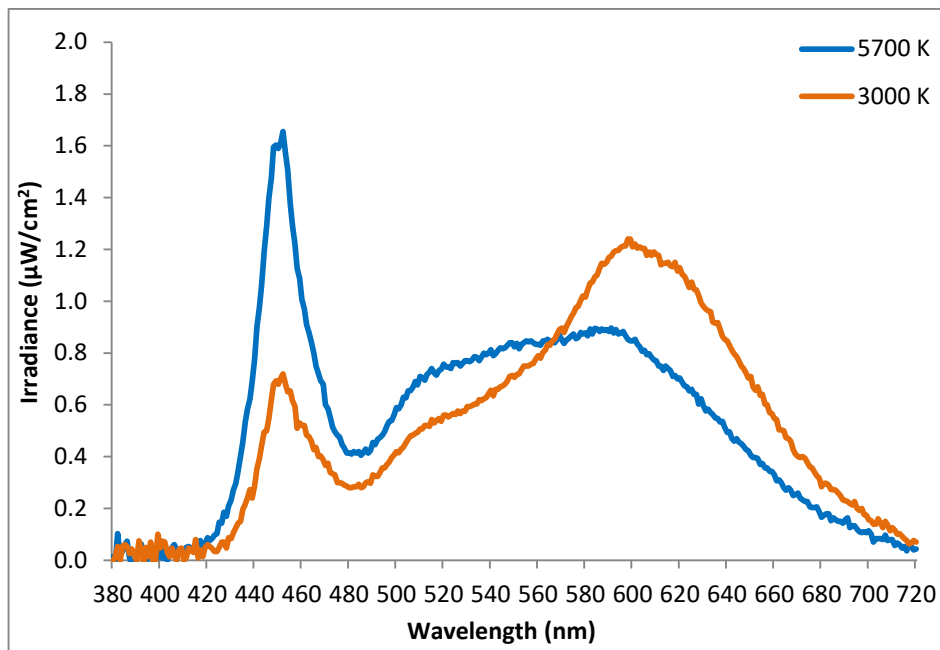


Figura 1. Distribución de la potencia espectral (irradiancia en $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) en las dos condiciones experimentales de luz empleadas en este estudio. La línea azul representa la configuración de 5700 K y la línea naranja la de 3000 K de un panel LED (inspire 48W Gdansk, Leroy Merlin S.L., Lille, France).

La intensidad de la luz se ajustó para que fuera lo más similar posible entre las dos condiciones en iluminancia, irradiancia y flujo fotónico (569 lux , $184 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, $4,97 \cdot 10^{18} \text{ fotones}/\text{cm}^2/\text{seg}$ para 5700 K vs. 581 lux , $181 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, $5,18 \cdot 10^{18} \text{ fotones}/\text{cm}^2/\text{seg}$ para 3000 K). Además, los luxes melanópicos de Lucas et al. (2014), la luz circadiana (CL_A) y el estímulo de circadiano (CS) (Rea & Figueiro, 2018; Rea et al., 2010), así como los luxes melanópicos de CIE S 026/E:2018 se calcularon para comparar los resultados obtenidos experimentalmente con las predicciones de los modelos teóricos de supresión de melatonina.

4. Inhibición de melatonina

Las pruebas de supresión de melatonina se llevaron a cabo durante tres semanas consecutivas, un día a la semana y el mismo día de la semana para cada voluntario. La primera semana, los participantes recibieron instrucciones del protocolo a seguir para determinar el *Dim Light Melatonin Onset* (DLMO) (Lewy et al., 1999; Lewy & Sack, 1989) en su propio domicilio (Figura 2A). Así, los voluntarios debían permanecer sentados con luz tenue, proporcionada por una lámpara pequeña situada lo más lejos posible, tomando muestras de saliva en tubos Salivette (SARSTEDT AG & Co. KG, Germany) cada 30 minutos, empezando a las 7 PM hasta una hora después de su hora habitual de acostarse. Durante la toma de muestras de saliva, solo se les permitía comer y beber si así lo deseaban después de cada muestra, pero no durante los 15

minutos previos. También estaba permitido leer o mantener una conversación, pero no utilizar dispositivos que emitieran luz, incluida la televisión. Se pidió a los participantes que almacenaran las muestras en el frigorífico hasta el día siguiente, cuando se llevaban al laboratorio en bolsas con placas de hielo y se congelaban a -20°C. Las condiciones de luz a las que los voluntarios estuvieron expuestos durante el protocolo de DLMO se controlaron mediante el registro con los dispositivos Kronowise® (Kronohealth SL, Murcia, España).

La segunda semana, se pidió a los voluntarios que acudieran al laboratorio el mismo día de la semana en que llevaron a cabo el protocolo de DLMO en casa, en grupos de ocho personas (dos grupos de jóvenes y un grupo de ancianos) y se expusieron a la luz según el siguiente protocolo (Figure 2B): exposición a luz tenue durante 3 horas, encendido de la luz experimental (3000 K o 5700 K) durante 2 horas, y exposición a luz tenue de nuevo durante 1 hora para comprobar si la secreción de melatonina se recuperaba después de la exposición a la luz y, en caso afirmativo, si la recuperación era más rápida después de la condición de 3000 K o después de la de 5700 K. Este protocolo se repitió, de nuevo el mismo día, en la tercera semana con la otra luz experimental (las condiciones se aleatorizaron).

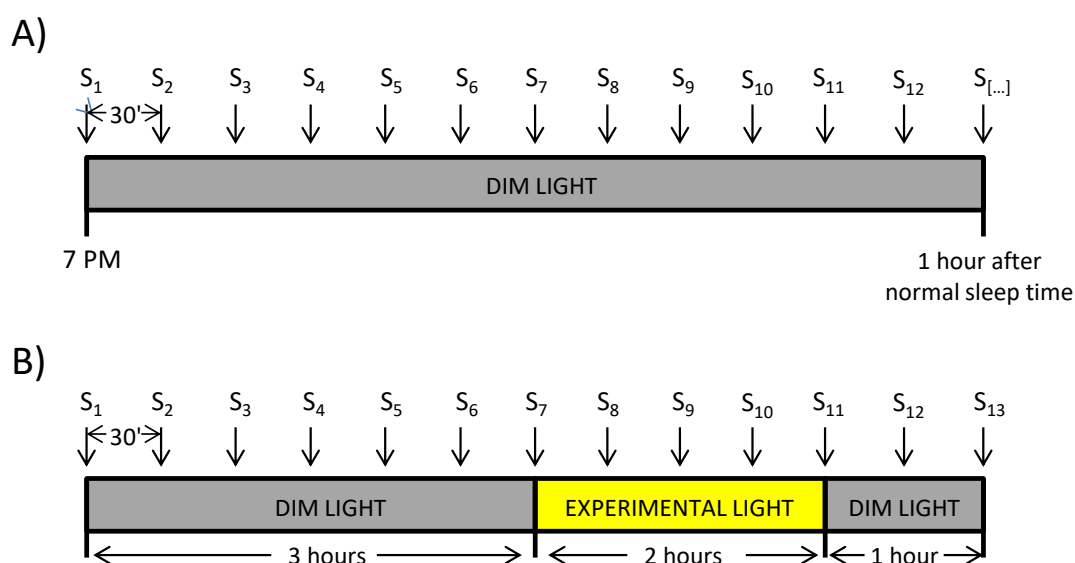


Figura 2. Protocolo de la prueba de inhibición de melatonina. A) Protocolo para determinar el DLMO. La toma de muestras comenzó a las 7 PM y terminó una hora después de la hora habitual de acostarse. B) Protocolo para determinar la inhibición de melatonina bajo las dos luces experimentales, consistente en 3 horas de exposición a luz tenue, 2 horas de exposición a luz experimental (3000 K o 5700 K) y una hora adicional de exposición a luz tenue. En todos los casos, las muestras de saliva se tomaron cada 30 minutos.

De nuevo, se obtuvieron muestras de saliva mientras los participantes permanecían sentados, cada 30 minutos, empezando a las 7 PM, 7:30 PM o 8 PM, dependiendo de la hora a la que decían acostarse habitualmente (del Cuestionario de Cronotipos de Múnich, Roenneberg et al., 2003), hasta 6 horas después. Se les pidió no beber ni ingerir alimentos 15 minutos antes de cada toma de muestras. Se les permitió hablar, leer, estudiar o jugar a juegos de mesa, pero no utilizar teléfonos inteligentes ni otros dispositivos que emitieran luz. En caso de que necesitaran utilizar el aseo, se les proporcionaban unas gafas naranjas (modelo G 140, Wed'ze, de Decathlon, Villeneuve-d'Ascq, Francia) para bloquear la luz azul todo lo posible.

Las muestras de saliva se analizaron mediante radioinmunoensayo (Stockgrand Ltd., Universidad de Surrey, Guildford, Reino Unido). Los coeficientes de variación intraensayo (CV) para niveles bajos (media $\pm$ SD, 5,1 pg/ml $\pm$ 0,6 pg/ml), medios (28,9 pg/ml $\pm$ 3,3 pg/ml) y altos (57,4 pg/ml $\pm$ 3,6 pg/ml) fueron de 11,8, 11,5 and 6,3 % respectivamente, y el límite de detección de 0,8 pg/ml $\pm$ 0,4 pg/ml. Todas las muestras de cada individuo se midieron por duplicado en un único ensayo.

A continuación, se calculó el área bajo la curva (AUC) para las tres situaciones (luz tenue, 3000 K y 5700 K) durante el período en que la luz experimental permanecía encendida, y el porcentaje de inhibición considerando como referencia (0 % de inhibición de melatonina) la luz tenue. Se descartaron los datos de dos sujetos ancianos debido a valores anormales que hacían sospechar de muestras contaminadas en dos de las tres condiciones.

5. Reflejo pupilar a la luz (PLR)

El PLR se midió utilizando un equipo comercial (ViewPoint EyeTracker, Arrington Research Inc., Scottsdale, EEUU). Este pupilómetro consiste en una serie de soportes ajustables para evitar cualquier movimiento durante las medidas y un sistema de grabación, que consta de una cámara infrarroja para grabar en la oscuridad y su correspondiente software de seguimiento que permite controlar la pupila del voluntario en todo momento y grabar su tamaño. Un pequeño LED rojo se sitúa detrás de la cámara como referencia visual para que el voluntario fije la mirada (Bonmati-Carrion et al., 2016; Bonmati-Carrion et al., 2018).

El protocolo para presentar el estímulo luminoso se adaptó de Park et al. (2011) (Figura 3). El participante llegaba al laboratorio entre las 9 AM y las 2 PM y permanecía sentado bajo condiciones de luz tenue durante 5 minutos para permitir la adaptación gradual de la pupila a la oscuridad. Después, la luz se apagaba durante 10 minutos, y el último minuto comenzaba la grabación de la línea base de la pupila. Se pedía al participante que intentara no moverse o

parpadear. La primera luz experimental se presentaba como un estímulo de tan solo 1 segundo después del minuto de grabación de línea base, a continuación, la grabación continuaba durante otro minuto para evaluar la respuesta pupilar post-iluminación (PIPR). Después, se permitía que el participante descansara durante 3 minutos en oscuridad, hasta que el proceso se repetía de nuevo para la siguiente condición experimental. Las dos condiciones fueron aleatorizadas.



Figura 3. Protocolo para el registro del reflejo pupilar a la luz. Después de 5 minutos bajo luz tenue y 10 minutos en oscuridad completa, se expuso a los sujetos a un pulso de luz de un segundo, seguido de otro minuto adicional en oscuridad. El diámetro pupilar se registró a una frecuencia de 100 Hz, desde el último minuto del periodo de oscuridad hasta un minuto después del pulso de luz. Las dos condiciones experimentales fueron aleatorizadas.

Los parpadeos y otros artefactos se eliminaron utilizando el software PupilLabWare®. A continuación, se calculó la respuesta post-iluminación 6 segundos después del estímulo (6S-PIPR) (Adhikari et al., 2015; Bonmati-Carrion et al., 2018; Park et al., 2011), 30 segundos después del estímulo (30S-PIPR) (Dacey et al., 2005; Markwell et al., 2010) y el diámetro mínimo, así como la velocidad de contracción, (dividiendo la diferencia del diámetro pupilar de la línea base con el diámetro mínimo entre los segundos necesarios para llegar al diámetro mínimo).

6. Análisis estadístico

Se llevaron a cabo las pruebas de Shapiro-Wilk para comprobar la normalidad de los datos. Para los datos de melatonina, se realizaron pruebas t de *Student* de una muestra para las dos condiciones experimentales (3000 K y 5700 K) utilizando 0 % como valor de referencia de inhibición melatonina (condición control de luz tenue). En el caso de los datos de reflejo pupilar a la luz, se realizaron pruebas ANOVA de medidas repetidas con comparaciones *post-hoc* de Bonferroni, estableciendo la edad como factor inter-sujeto. Para explorar la relación entre inhibición de melatonina y reflejo pupilar a la luz, se llevaron a cabo correlaciones de dos variables. Todos los test estadísticos se realizaron utilizando IBM SPSS Statistics para Windows, Versión 23.0. (IBM Corp. Armonk, NY, EEUU).

RESULTADOS

La figura 4 representa las ondas medias diarias de exposición a luz para jóvenes y ancianos. Como se puede observar, en general, los ancianos se expusieron a intensidades de luz más altas, especialmente durante la mañana, donde alcanzaron aproximadamente 3500 luxes de media. Durante las primeras horas de la tarde, las intensidades de luz fueron similares para los dos grupos, de aproximadamente 700 lux, pero a última hora de la tarde, los ancianos también se expusieron a mayores intensidades. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p = 0,210$, t de *Student* = $-1,423$, grados de libertad = 20).

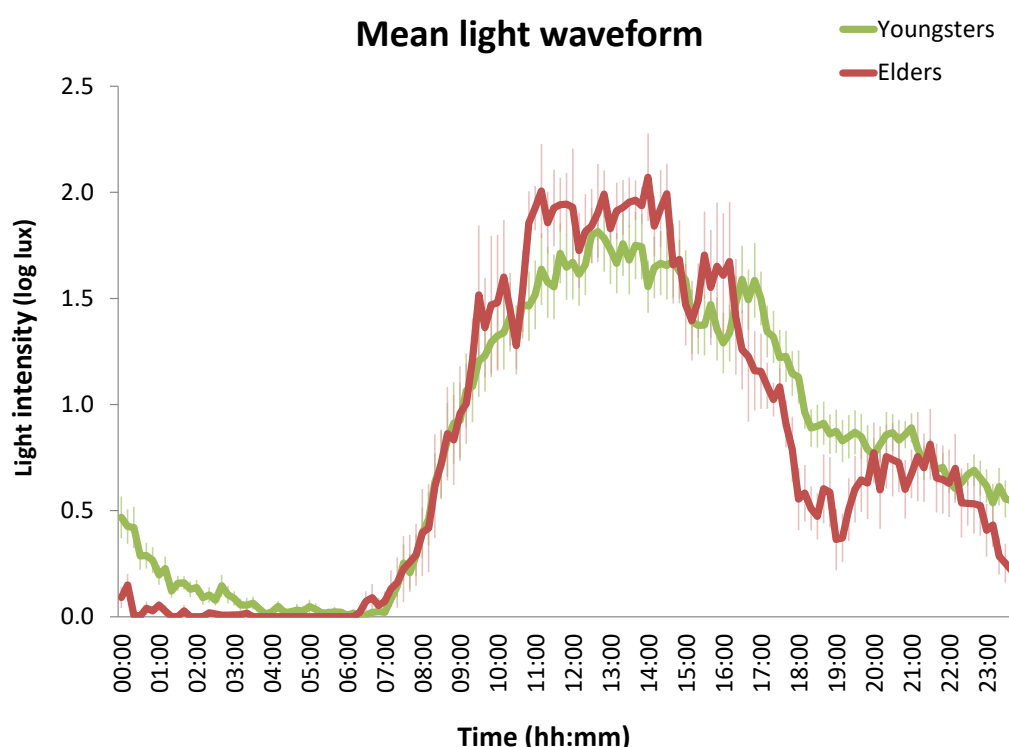
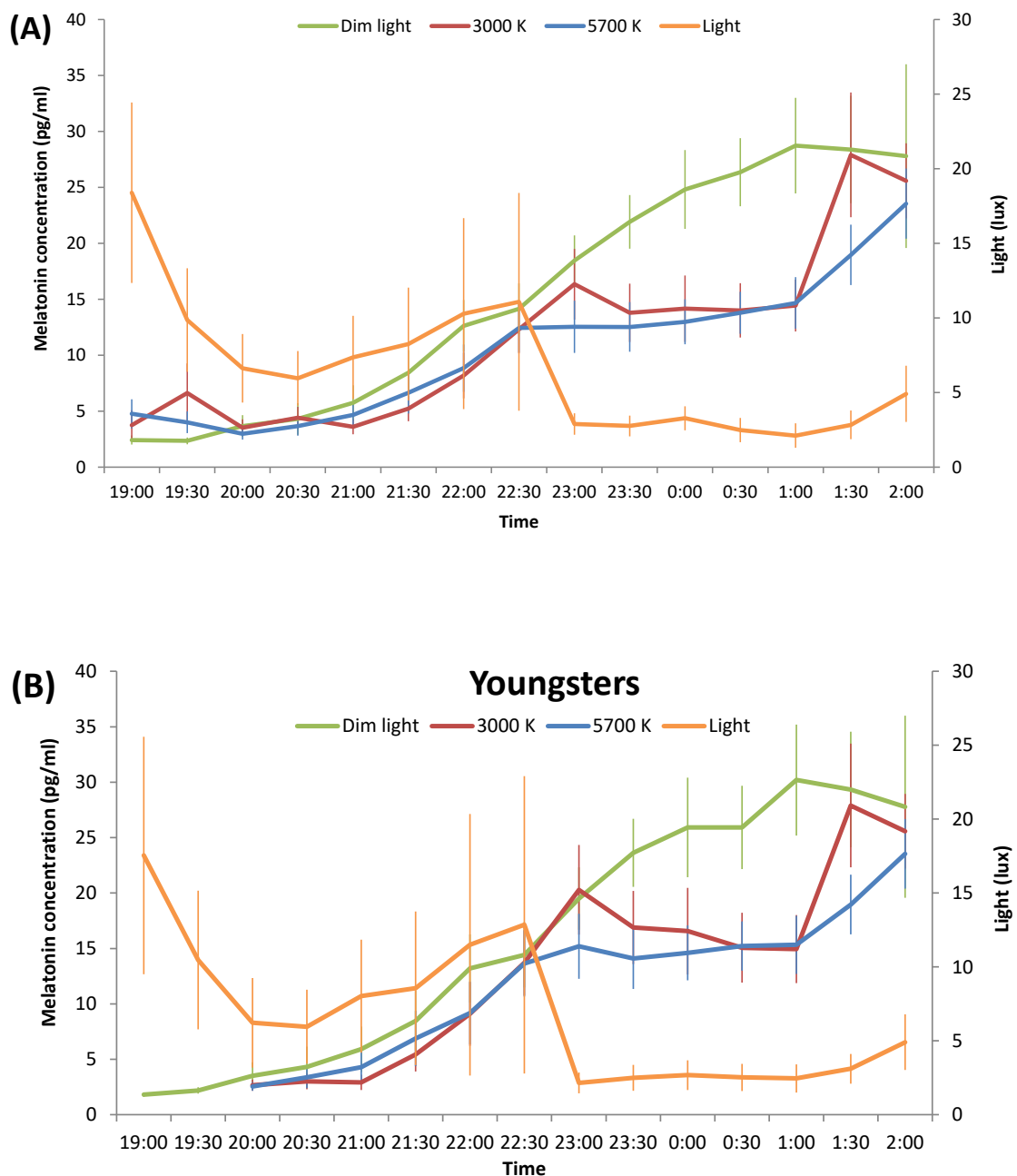


Figura 4. Ondas medias diarias de exposición a luz (log lux) durante la primera semana de estudio para jóvenes (línea verde, $n = 16$) y ancianos (línea roja, $n = 6$) en condiciones ambulatorias. La exposición a luz fue registrada durante el mes de Noviembre de 2017 (7:45 hora de salida del sol, 17:53 hora de puesta del sol).

La concentración de melatonina en saliva se representa en la Figura 5. Ambas luces experimentales provocaron inhibición de la secreción de melatonina con respecto a la condición de luz tenue (100%), al analizar el conjunto de los participantes (Figura 5A), aunque el efecto tendió a ser mayor para la condición de 5700 K que para la de 3000 K (Figura 6). Cuando se consideraron por separado cada grupo de edad, los jóvenes (Figura 5B) presentaron mayor concentración de melatonina en saliva que los ancianos (Figura 5C) bajo luz tenue,

como era de esperar, aunque las diferencias no fueron significativas ($p = 0,432$, t de *Student* = $0,803$, grados de libertad = 20). Además, la exposición a ambos tipos de luz disminuyó la concentración de melatonina de forma similar y la secreción se recuperó a la misma velocidad en los ancianos. Sin embargo, en jóvenes, la inhibición de melatonina de la luz de 5700 K pareció ser mayor bajo que la de 3000 K, y aunque finalmente, los niveles se igualaron, la recuperación tras la luz de 3000 K fue más rápida. Tanto para todos los voluntarios en conjunto, como para jóvenes y ancianos, la variabilidad inter-sujeto en la secreción de melatonina fue muy alta.



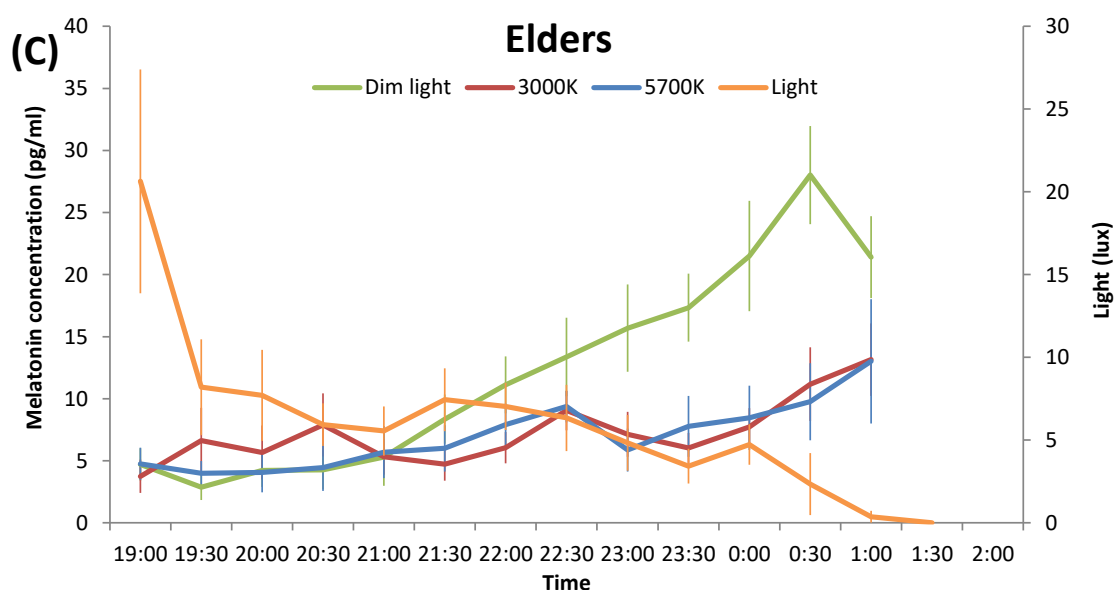


Figura 5. (A) Curvas medias de concentración de melatonina (pg/ml,) del total de los sujetos estudiados ($n = 22$), (B) de los jóvenes ($n = 16$) y (C) de los ancianos ($n = 6$) bajo las tres condiciones de luz: luz tenue (línea verde), 5700 K (línea azul) y 3000 K (línea roja). La línea naranja representa la intensidad de luz media de los 22 sujetos en log lux, registrada durante el día de la determinación del DLMO en su domicilio y que ilustra el cumplimiento del protocolo establecido. Todos los datos se expresan como media $\pm$ SEM.

No se observaron diferencias significativas en la hora del DLMO entre jóvenes y ancianos ($20:54 \pm 00:50$ hh:mm vs. $21:08 \pm 00:33$ hh:mm, respectivamente; $p = 0,544$, t de *Student* = $0,617$, grados de libertad = 20). Sin embargo, el porcentaje de inhibición melatonina con respecto a la condición de luz tenue (0 %) (Figure 6A) fue mayor bajo 5700 K (41,7 %, $p < 0,001$, t de *Student* = $6,687$, grados de libertad = 21) que bajo 3000 K (33,3 %, $p < 0,005$, t de *Student* = $3,852$, grados de libertad = 21). Cuando jóvenes y ancianos se analizaron por separado (Figura 6B), de nuevo la luz de 3000 K produjo menor inhibición (26,9 %, $p < 0,05$, t de *Student* = $2,489$, grados de libertad = 15), que la de 5700 K (34,5 %, $p < 0,001$, t de *Student* = $4,639$, grados de libertad = 15). No obstante, en los ancianos, la inhibición fue mayor que la observada en jóvenes bajo las dos condiciones experimentales: 50,4 % vs 26,88 % con 3000 K ($p < 0,01$, t de *Student* = $4,298$, grados de libertad = 5) and 61,0 % vs. 34,50 % con 5700 K ($p < 0,001$, t de *Student* = $8,220$, grados de libertad = 5). No se encontraron diferencias significativas entre las dos luces experimentales (Figura 6).

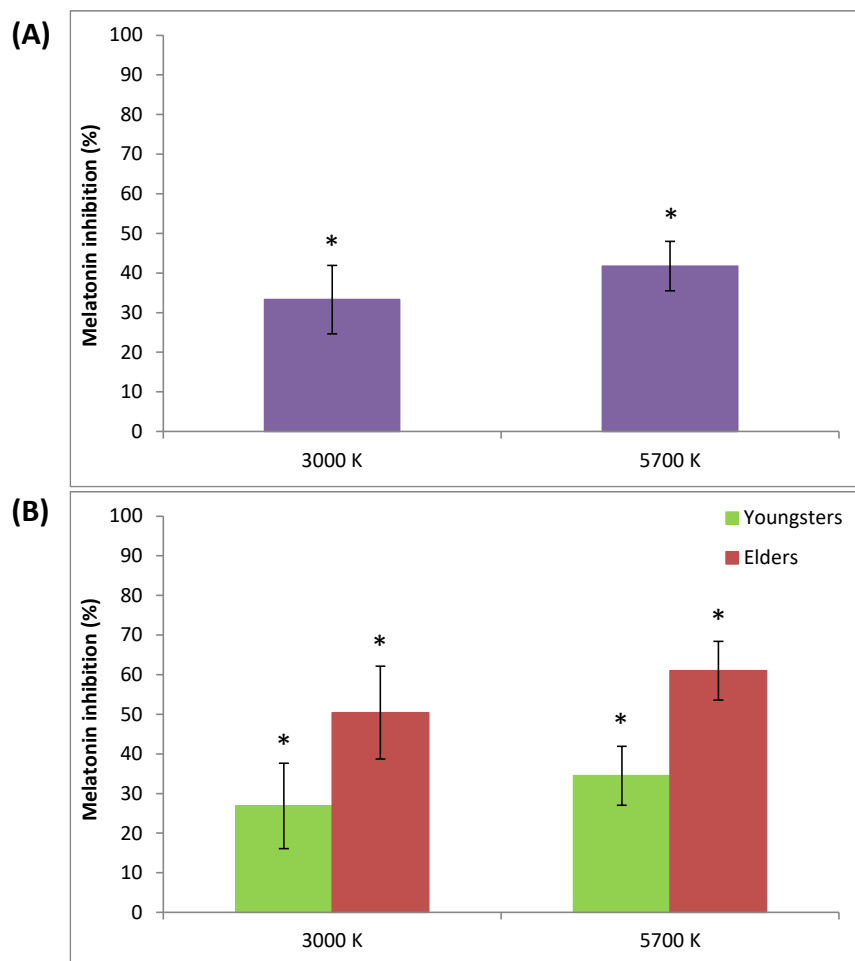


Figura 6. (A) Porcentaje medio de inhibición de melatonina (media $\pm$ SEM) en comparación con la condición de luz tenue calculado individualmente para cada sujeto ($n = 22$), y (B) para jóvenes ($n = 16$) y ancianos ($n = 6$) por separado. * indica $p < 0,01$ (prueba t de *Student* para una muestra, 0 % como valor de referencia en la condición de luz tenue).

Con respecto al reflejo pupilar en respuesta a un pulso de luz (Figura 7), el diámetro mínimo (Figura 7A) alcanzando en las dos condiciones de luz fue similar, tanto para el conjunto de los sujetos como cuando se analizaron por separado jóvenes y ancianos. Sin embargo, sí que la edad afecta a la respuesta en ambas condiciones, ya que el diámetro mínimo fue menor en los participantes ancianos ($p < 0,01$, $F = 8,886$, grados de libertad = 22 para la luz de 3000 K; $p < 0,005$, $F = 11,879$, grados de libertad = 22 para la de 5700 K). En cuanto a la respuesta pupilar a los 6 segundos post-iluminación (6S-PIPR, Figura 7B), en general la luz de 5700 K produjo una mayor contracción que la de 3000 K ($p < 0,001$, $F = 18,123$, grados de libertad = 22), y también en jóvenes ($p < 0,005$, $F = 12,136$, grados de libertad = 22) y ancianos ($p < 0,05$, $F = 7,566$, grados de libertad = 22), sin que hubiera diferencias en la respuesta en función de la edad ($p < 0,08$, $F = 3,217$, grados de libertad = 22). Con respecto a 30S-PIPR (Figura 7C), en general, la luz de 3000 K pareció provocar un diámetro ligeramente menor en los tres grupos, aunque las

diferencias no fueron significativas. La velocidad de contracción (Figura 7D), tendió a ser más rápida en la condición de 3000 K que en la de 5700 K, aunque de nuevo, no se encontraron diferencias significativas. No obstante, fue más rápida en ancianos que en jóvenes a 3000 K ($p < 0,05$, $F = 7,276$, grados de libertad = 22) y bajo la de 5700 K ($p < 0,01$, $F = 9,953$, grados de libertad = 22).

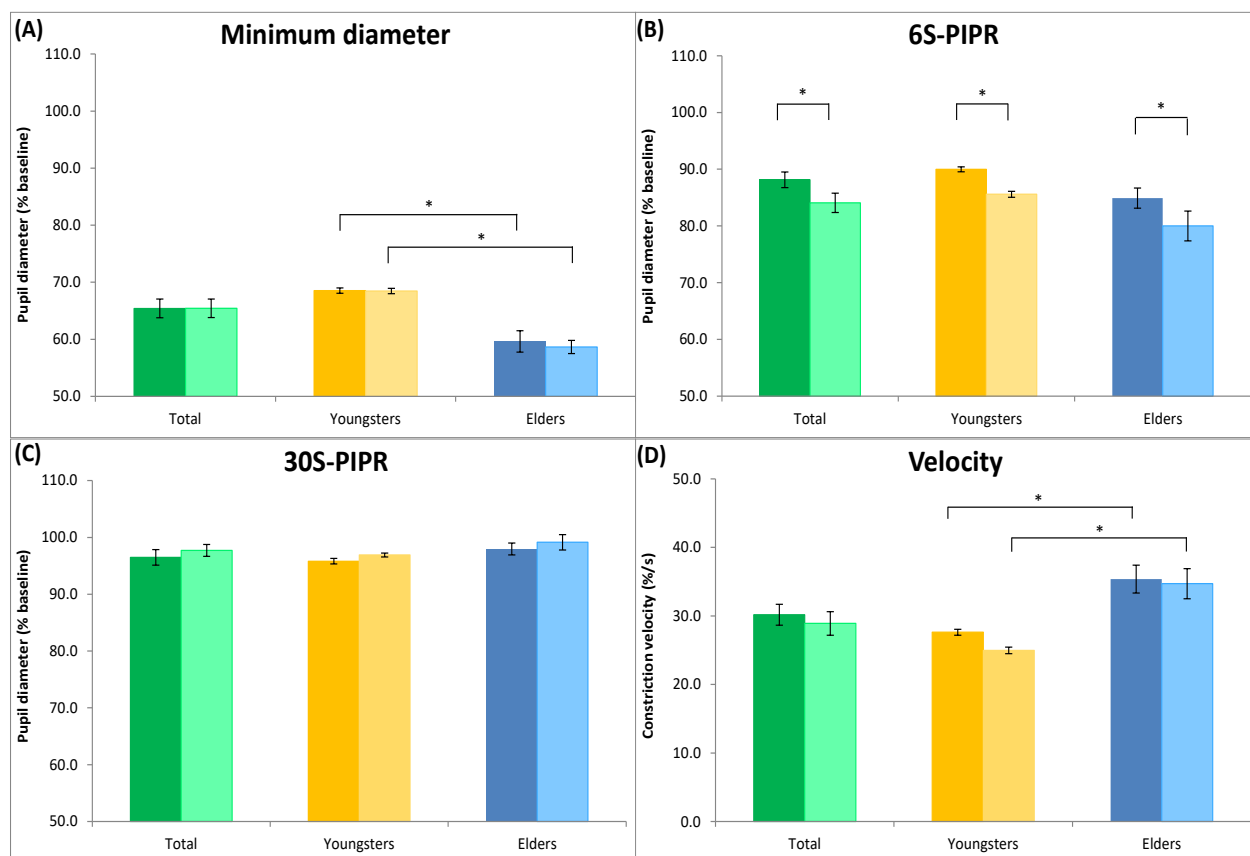


Figura 7. (A) Diámetro mínimo medio; (B), 6S-PIPR (respuesta pupilar a los 6 segundos post-iluminación); (C) 30S-PIPR (respuesta pupilar a los 30 segundos post-iluminación) y (D) velocidad de contracción (% cambio en el diámetro pupilar/segundo) bajo ambas condiciones experimentales (los colores oscuros representan la luz de 3000 K y los colores claros la de 5700 K) para todos los voluntarios ($n = 24$), para jóvenes ($n = 16$) y para ancianos ($n = 8$). El reflejo pupilar a la luz (PLR) se expresa como porcentaje del tamaño pupilar adaptado a la luz frente al tamaño pupilar adaptado a la oscuridad. * indica $p < 0,05$ (ANOVA de medidas repetidas, con la edad como factor inter-sujeto y comparaciones post-hoc de Bonferroni).

En cuanto a una hipotética relación entre el PLR y la supresión de melatonina, no encontramos correlaciones significativas ($p > 0.05$ en todos los casos) para ninguno de los parámetros de PLR analizados en este estudio.

La Tabla 1 muestra la comparación entre los resultados de inhibición de melatonina y la 6S-PIPR en respuesta a las dos fuentes de luz, así como las predicciones de los modelos que estimaban la fotorrecepción circadiana a través de la estimulación de las ipRGCs y el porcentaje de inhibición de melatonina. Como se puede ver, la estimulación melanópica producida por la luz de 3000 K es un 35.9 % más baja que la inducida por la de 5700 K, de acuerdo con los modelos de Lucas et al. (2014) y CIE S 026/E:2018. Sin embargo, en el conjunto de los sujetos, las diferencias reales observadas en la inhibición de melatonina y en 6S-PIPR fueron 8,4 % y 4,5 %, respectivamente. Estos resultados son mucho más similares a las predicciones del modelo de Rea & Figueiro, (2018); Rea et al., (2010), ya que estima en un 12,20 % la diferencia en el estímulo de luz circadiana y en un 3% % la diferencia en la inhibición esperada de melatonina entre las condiciones de luz de 5700 K y 3000 K.

Tabla 1. Porcentajes de inhibición de melatonina y de contracción pupilar (6S-PIPR) bajo las dos condiciones experimentales de luz (5700 K y 3000 K), así como la diferencia entre ellas. Predicciones de activación melanópica e inhibición de melatonina según los modelos teóricos: Lucas et al., (2014), CIE S 026/E:2018, y Rea et al., (2010).

Participants	Light	Melatonin % inhibition (n = 22)	6S-PIPR % Contraction (n = 24)	Lucas et al. (2014) α -melanopic (lux)	CIE S 026/E:2018 α -melanopic (lux)	Rea et al. (2010, 2018) Circadian light (lux)	Rea et al. (2010, 2018) Melatonin % inhibition
All subjects	5700 K	41.7	16	509	460.73	688	47
	3000 K	33.3	11.5	326	294.96	604	44
	Difference	8.4	4.5	183	165.77	84	3
Youngsters	5700 K	34.5	14.5				
	3000 K	26.9	10				
	Difference	7.6	5.5				
Elders	5700 K	61.0	20				
	3000 K	50.4	15				
	Difference	10.6	5				

DISCUSIÓN

Nuestros resultados ponen de manifiesto que la luz de alta temperatura de color está asociada con un leve incremento en la inhibición de melatonina y una mayor contracción pupilar independientemente de la edad de los sujetos. No obstante, sus efectos son mucho menores de lo esperando según las predicciones de los modelos teóricos de fotorrecepción circadiana basados en la estimulación de las ipRGCs pero acordes a lo esperado en inhibición de melatonina según el modelo de Rea & Figueiro (2018) y Rea et al. (2010). En la misma línea, no

encontramos correlación individual entre el grado de inhibición de melatonina y los parámetros que cuantifican el PLR, lo que apunta a que proporcionan información complementaria sobre el impacto de las fuentes de luz en el sistema circadiano y, por lo tanto, deberían considerarse de forma conjunta a la hora de evaluar los efectos circadianos de una fuente de luz.

En nuestro estudio, la reducción de la concentración salivar de melatonina en respuesta a la disminución de la temperatura de color de 5700 K a 3000 K fue de un 8,4 % y la diferencia en la contracción pupilar de un 4,5 %. Sin embargo, con respecto a los modelos teóricos basados en la estimulación de las ipRGCs, el modelo de Lucas et al., (2014) predijo una gran diferencia en la activación melanópica (incrementando en 183 lux melanópicos desde 3000 K a 5700 K) entre las dos fuentes de luz, y resultados similares se obtuvieron con el modelo de CIE S 026/E:2018 (aumentando en 165,77 lux melanópicos de 3000 K a 5700 K), que utiliza similares curvas de sensibilidad de los fotorreceptores, pero estandarizando medidas y unidades de intensidad. Esta aparente discrepancia entre los altos valores predichos de estimulación melanópica y nuestros marcadores circadianos sugiere que tanto la supresión de melatonina como la contracción pupilar, además de estar reguladas por las ipRGCs, también deben recibir algún tipo de señal fotorreceptores convencionales (conos y bastones) (Adhikari, et al., 2016; Rea et al., 2010). Además, nuestros resultados de inhibición de melatonina son bastante similares a los predichos por el índice de estimulación circadiana desarrollado por Rea & Figueiro, (2018) y Rea et al. (2010), donde los valores de CL_A y CS para las fuentes de luz empleadas en este estudio se corresponderían con un valor aproximado de inhibición de melatonina del 40 % y una diferencia entre ellas de solo un 3 %, que es ligeramente inferior al 8,4 % obtenido en nuestros experimentos.

Se han descrito valores similares a los nuestros de supresión de melatonina en función de la temperatura de color, con exposición de adolescentes y adultos a luces de 2700 K y 6500 K durante una hora (Nagare et al., 2019b). En otro estudio, los mismos autores (Nagare et al., 2019a) investigaron si la exposición a una luz de 3000 K pero con una reducción en la radiación de 475-495 nm inhibiría la secreción de melatonina en menor medida que una luz convencional de 3000 K. Aunque encontraron un efecto significativo de la duración de la exposición y de la intensidad de la luz (a mayor duración e intensidad, mayor es la inhibición de melatonina), no observaron ningún efecto significativo del espectro modificado, lo que concuerda con nuestros resultados entre las condiciones de 5700 K y 3000 K y puede deberse a la influencia de la duración de la exposición (dos horas en nuestro caso) y el ratio de estimulación melanópica (similar en las dos condiciones). Otros autores han descrito

resultados parecidos (Souman et al., 2018), donde de nuevo una reducción del espectro de emisión entre 450-550 nm y con CCT similar (2700 K), no produjo una supresión significativa de melatonina, a pesar de que las condiciones de luz de ese estudio fueron diseñadas en base a las curvas de sensibilidad del modelo de Lucas et al., (2014), y por lo tanto, no incluían la contribución de los conos y los bastones.

Nuestros resultados también mostraron que la concentración de melatonina es más baja en ancianos que en jóvenes, como ya ha descrito previamente (Haimov et al., 1994; Iguchi et al., 1982; Mishima et al., 2001; Sack et al., 1986; Sharma et al., 1989; Waldhauser et al., 1988). Sin embargo, nuestros voluntarios ancianos no parecieron tener una sensibilidad reducida a la luz de longitud de onda corta, al contrario que en otros estudios (Herljevic et al., 2005; Iguchi et al., 1982; Mishima et al., 2001; Münch et al., 2017) y como cabría esperar de la reducción en la transmisión del cristalino como consecuencia del envejecimiento (Turner & Mainster, 2008), lo que podría deberse a diferencias en los tiempos de exposición a la luz y a que la media de edad de nuestros ancianos estaba en torno a los 60 años, por lo que podría ocurrir que los signos manifiestos de envejecimiento sean patentes a edades superiores. Además, como se muestra en la Figura 4, los ancianos tienden a exponerse a intensidades de luz más altas cuando hacen su vida normal, especialmente durante la mañana, una situación que aumenta la secreción nocturna de melatonina (Hashimoto et al., 1997; Park & Tokura, 1999), y protege frente a la posible inhibición de melatonina por la luz nocturna (Hébert et al., 2002; Kozaki, Kubokawa et al., 2016). No obstante, hay que tener en cuenta que la determinación de melatonina presenta una alta variabilidad intra e inter-sujeto (Arendt et al., 1979; Bouwmans et al., 2015; Follenius et al., 1995) lo que también puede contribuir a la discrepancia entre estudios.

Las ipRGCs no solo transmiten la información lumínica al reloj central del sistema circadiano, sino que también están implicadas en el reflejo pupilar a la luz, puesto que proyectan sus axones al núcleo pretectal olivar (Chen et al., 2011; Clarke & Ikeda, 1985; Gamlin et al., 1995; Hattar et al., 2002; Trejo & Cicerone, 1984). La contribución específica de las ipRGCs todavía es un tema de debate, ya que muchos estudios han demostrado que regulan principalmente la contracción pupilar sostenida después de que se apague el estímulo luminoso (Adhikari et al., 2015; Gamlin et al., 2007; Park et al., 2011), pero más recientemente, se ha demostrado que los bastones también contribuyen significativamente a la PIPR durante los primeros 1,7 segundos después de que se apague el estímulo (Adhikari et al., 2016). Lo mismo sucede con la máxima contracción (diámetro mínimo), que parece depender no solo de las ipRGCs, sino también de los conos y los bastones (Joyce et al., 2015; Markwell et al., 2010). Incluso no siendo capaces de atribuir el PLR únicamente a las ipRGCs, otros autores que han empleado

luces LED monocromáticas (Bonmati-Carrion et al., 2018) han observado que la luz azul, tanto aislada (Adhikari et al., 2016; Markwell et al., 2010) como en combinación con luz roja (Bonmati-Carrion et al., (2018)), produjo mayor contracción pupilar, al igual que en nuestros resultados, ya que la luz de 5700 K, con más radiación azul, produjo mayor contracción pupilar en 6S-PIPR que la luz de 3000 K. Además, nuestros resultados también concuerdan con el estudio realizado por Adhikari et al., (2015), que demostró que la PIPR era independiente de la edad, aunque nuestros participantes ancianos mostraron menor diámetro mínimo y velocidad de contracción más rápida. De nuevo, esto puede deberse a que nuestros participantes pudieron no ser lo suficientemente ancianos para presentar signos manifiestos de envejecimiento descritos en otros estudios, a lo que puede sumarse la diferencia del momento del día en el que la prueba de PLR se lleva a cabo en los distintos estudios (Bonmati-Carrion et al., 2016; Münch et al., 2012; Rea et al., 2005).

De entre todas las medidas biológicas para evaluar los ritmos circadianos, la secreción de melatonina es uno de los ritmos marcadores por excelencia (Bonmati-Carrion et al., 2013; Lewy et al., 1999; Lewy et al., 1980; Lewy & Sack, 1989; Voultsios et al., 1997). Aunque la concentración de melatonina es más baja en saliva que en plasma, el procedimiento de medida en el primer caso es menos invasivo y más cómodo para los voluntarios puesto que no requiere extracción de sangre y, por lo tanto, se acepta con mayor facilidad. Por otro lado, la pupilometría para evaluar PLR es una técnica no invasiva que permite evaluar una fuente de luz en aproximadamente 20 minutos y puede llevarse a cabo en horario diurno, lo que la hace más rápida, fácil y cómoda tanto para los voluntarios como para los investigadores (Adhikari et al., 2016; Adhikari et al., 2015; Bonmati-Carrion et al., 2016; Bonmati-Carrion et al., 2018; Bouma, 1962; Park et al., 2011; Tsujimura et al., 2010). No obstante, y según nuestros datos, no existe una correlación significativa entre PLR e inhibición de melatonina, al igual que en un estudio previo (Yasukouchi et al., 2007), lo que apunta a que proporcionan información complementarias y no sustitutiva una de otra.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que un aumento en la temperatura de color de las fuentes de iluminación comerciales, producen un incremento en la inhibición de melatonina y una mayor contracción pupilar, independientemente de la edad de los sujetos. No obstante, incluso la luz con menor contenido en radiación azul llegó a inhibir la secreción de melatonina, subrayando la importancia de evitar la exposición a luz nocturna. Igualmente, una elevada emisión en la banda del azul produjo mayor contracción en la respuesta pupilar, si

bien, su efecto es menor de lo esperado según las predicciones de los modelos teóricos de fotorrecepción circadiana basados en la estimulación de las ipRGCs, probablemente porque los conos y los bastones también contribuyen de forma no despreciable a la fotorrecepción circadiana. Por otro lado, la inhibición de melatonina y el PLR no parecen correlacionados a nivel individual, por lo que cada técnica proporciona información complementaria sobre el impacto de las fuentes de luz en el sistema circadiano y deberían emplearse ambas para evaluar dicho impacto.

REFERENCIAS

- Adhikari, P., Feigl, B., & Zele, A. J. (2016). Rhodopsin and melanopsin contributions to the early redilation phase of the post-illumination pupil response (PIPR). *PLoS ONE*, 11(8), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161175>
- Adhikari, P., Pearson, C. A., Anderson, A. M., Zele, A. J., & Feigl, B. (2015). Effect of Age and Refractive Error on the Melanopsin Mediated Post-Illumination Pupil Response (PIPR). *Scientific Reports*, 5, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep17610>
- Adhikari, P., Zele, A. J., & Feigl, B. (2015). The post-illumination pupil response (PIPR). *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 56(6), 3838–3849. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-16233>
- Arendt, J., Wirz-Justice, A., Bradtke, J., & Kornemark, M. (1979). Long-Term Studies on Immunoreactive Human Melatonin. *Annals of Clinical Biochemistry: An International Journal of Biochemistry and Laboratory Medicine*, 16, 307–312. <https://doi.org/10.1177/000456327901600182>
- Arguelles-Prieto, R., Bonmati-Carrion, M.-A., Rol, M. A., & Madrid, J. A. (2019). Determining Light Intensity, Timing and Type of Visible and Circadian Light From an Ambulatory Circadian Monitoring Device. *Frontiers in Physiology*, 10(June), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00822>
- Baño Otálora, B. (2013). *Circadian system functionality in physiological and pathological rodent models of chronodisruption : cronoenhancement by melatonin. Proyecto de investigación:* Retrieved from <https://digitum.um.es/xmlui/handle/10201/30404>
- Berson, D. M., Dunn, F. A., & Takao, M. (2002). Phototransduction by Retinal Ganglion Cells That Set the Circadian Clock. *Science*, 295(5557), 1070–1073.

<https://doi.org/10.1126/science.1067262>

- Bonmati-Carrion, M. A., Hild, K., Isherwood, C. M., Sweeney, S. J., Revell, V. L., Madrid, J. A., ... Skene, D. J. (2018). Effect of Single and Combined Monochromatic Light on the Human Pupillary Light Response. *Frontiers in Neurology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.01019>
- Bonmati-Carrion, M. A., Hild, K., Isherwood, C., Sweeney, S. J., Revell, V. L., Skene, D. J., ... Madrid, J. A. (2016). Relationship between human pupillary light reflex and circadian system status. *PLoS ONE*, 11(9), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162476>
- Bonmati-Carrion, M. A., Middleton, B., Revell, V. L., Skene, D. J., Rol, M. A., & Madrid, J. A. (2015). Validation of an innovative method, based on tilt sensing, for the assessment of activity and body position. *Chronobiology International*, 32(5), 701–710. <https://doi.org/10.3109/07420528.2015.1016613>
- Bonmati-Carrion, M. A., Middleton, B., Revell, V., Skene, D. J., Rol, M. A., & Madrid, J. A. (2013). Circadian phase assessment by ambulatory monitoring in humans : Correlation with dim light melatonin onset. *Chronobiology International*, 31(1), 37–51. <https://doi.org/10.3109/07420528.2013.820740>
- Bouma, H. (1962). Size of the Static Pupil as a Function of Wave-length and Luminosity of the Light Incident on the Human Eye. *Nature*, 193(4816), 690–691.
- Bouwman, M. E. J., Bos, E. H., Booij, S. H., Van Faassen, M., Oldehinkel, A. J., & De Jonge, P. (2015). Intra- and inter-individual variability of longitudinal daytime melatonin secretion patterns in depressed and non-depressed individuals. *Chronobiology International*, 32(3), 441–446. <https://doi.org/10.3109/07420528.2014.973114>
- Brainard, G. C., Hanifin, J. P., Greeson, J. M., Byrne, B., Glickman, G., Gerner, E., & Rollag, M. D. (2001). Action Spectrum for Melatonin Regulation in Humans: Evidence for a Novel Circadian Photoreceptor. *The Journal of Neuroscience*, 21(16), 6405–6412. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-16-06405.2001>
- Buijs, R. M., La Fleur, S. E., Wortel, J., Van Heyningen, C., Zuiddam, L., Mettenleiter, T. C., ... Nijima, A. (2003). The suprachiasmatic nucleus balances sympathetic and parasympathetic output to peripheral organs through separate preautonomic neurons. *Journal of Comparative Neurology*, 464(1), 36–48. <https://doi.org/10.1002/cne.10765>

- Cajochen, C., Münch, M., Kriebel, S., Kräuchi, K., Steiner, R., Oelhafen, P., ... Wirz-Justice, A. (2005). High sensitivity of human melatonin, alertness, thermoregulation, and heart rate to short wavelength light. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90(3), 1311–1316. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0957>
- Chen, S. K., Badea, T. C., & Hattar, S. (2011). Photoentrainment and pupillary light reflex are mediated by distinct populations of ipRGCs. *Nature*, 476(7358), 92–96. <https://doi.org/10.1038/nature10206>
- Cho, K., Ennaceur, A., Cole, J. C., & Suh, C. K. (2000). Chronic jet lag produces cognitive deficits. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(6), RC66. <https://doi.org/dx.doi.org/S0212-16112010000300014>
- CIE S 026/E:2018 CIE System for Metrology of Optical Radiation for ipRGC-Influenced Responses to Light. (2018). *Color Research & Application* (Vol. 44). Vienna. <https://doi.org/10.1002/col.22350>
- Clarke, R. J., & Ikeda, H. (1985). Luminance and darkness detectors in the olivary and posterior pretectal nuclei and their relationship to the pupillary light reflex in the rat - I. Studies with steady luminance levels. *Experimental Brain Research*, 57(2), 224–232. <https://doi.org/10.1007/BF00236527>
- Dacey, D. M., Liao, H.-W., Peterson, B. B., Robinson, F. R., Vivianne C. Smith, Pokorny, J., ... Gamlin, P. D. (2005). Melanopsin-expressing ganglion cells in primate retina signal colour and irradiance and project to the LGN. *Nature*, 433(7027), 741–745. <https://doi.org/10.1038/nature03344>
- Erren, T. C., & Reiter, R. J. (2009). Defining chronodisruption. *Journal of Pineal Research*, 46(3), 245–247. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2009.00665.x>
- Erren, T. C., & Reiter, R. J. (2013). Revisiting chronodisruption: When the physiological nexus between internal and external times splits in humans. *Naturwissenschaften*, 100(4), 291–298. <https://doi.org/10.1007/s00114-013-1026-5>
- Feigl, B., & Zele, A. J. (2014). Melanopsin-expressing, Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells (ipRGCs) in Retinal Disease. *OPTOMETRY AND VISION SCIENCE*, 91(8), 894–903. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21413413>
- Follenius, M., Weibel, L., & Brandenberger, G. (1995). Distinct modes of melatonin secretion in

- normal men. *Journal of Pineal Research*, 18(3), 135–140. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.1995.tb00151.x>
- Gamlin, P. D. R., McDougal, D. H., Pokorny, J., Smith, V. C., Yau, K. W., & Dacey, D. M. (2007). Human and macaque pupil responses driven by melanopsin-containing retinal ganglion cells. *Vision Research*, 47(7), 946–954. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2006.12.015>
- Gamlin, P. D. R., Zhang, H., & Clarke, R. J. (1995). Luminance neurons in the pretectal olivary nucleus mediate the pupillary light reflex in the rhesus monkey. *Experimental Brain Research*, 106(1), 177–180. <https://doi.org/10.1007/BF00241367>
- Garaulet, M., & Madrid, J. A. (2010). Chronobiological aspects of nutrition, metabolic syndrome and obesity. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(9–10), 967–978. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.05.005>
- Haimov, I., Laudon, M., Zisapel, N., Souroujon, M., Nof, D., Shlitner, A., ... Lavie, P. (1994). Sleep disorders and melatonin rhythms in elderly people. *The British Medical Journal*, 309(6948), 167. <https://doi.org/10.1136/bmj.309.6948.167>
- Hansen, J. (2001). Light at night, shiftwork, and breast cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(20), 1513–1515. <https://doi.org/10.1093/jnci/93.20.1513>
- Hashimoto, S., Kohsaka, M., Nakamura, K., Honma, H., Honma, S., & Honma, K. I. (1997). Midday exposure to bright light changes the circadian organization of plasma melatonin rhythm in humans. *Neuroscience Letters*, 221(2–3), 89–92. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(96\)13291-2](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(96)13291-2)
- Hattar, S., Liao, H. W., Takao, M., Berson, D. M., & Yau, K. W. (2002). Melanopsin-containing retinal ganglion cells: Architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science*, 295(5557), 1065–1070. <https://doi.org/10.1126/science.1069609>
- Hébert, M., Martin, S. K., Lee, C., & Eastman, C. I. (2002). The effects of prior light history on the suppression of melatonin by light in humans. *Journal of Pineal*, 33(4), 198–203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178059>
- Herljevic, M., Middleton, B., Thapan, K., & Skene, D. J. (2005). Light-induced melatonin suppression: Age-related reduction in response to short wavelength light. *Experimental Gerontology*, 40(3), 237–242. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2004.12.001>
- Iguchi, H., Kato, K. I., & Ibayashi, H. (1982). Age-dependent reduction in serum melatonin

- concentrations in healthy human subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 55(1), 27–29. <https://doi.org/10.1210/jcem-55-1-27>
- Ishikawa, H., Onodera, A., Asakawa, K., Nakadomari, S., & Shimizu, K. (2012). Effects of selective-wavelength block filters on pupillary light reflex under red and blue light stimuli. *Japanese Journal of Ophthalmology*, 56(2), 181–186. <https://doi.org/10.1007/s10384-011-0116-1>
- Joyce, D. S., Feigl, B., Cao, D., & Zele, A. J. (2015). Temporal characteristics of melanopsin inputs to the human pupil light reflex. *Vision Research*, 107, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2014.12.001>
- Knutsson, A., & Bøggild, H. (2000). Shiftwork and cardiovascular disease: Review of disease mechanisms. *Reviews on Environmental Health*, 15(4), 359–372. <https://doi.org/10.1515/REVEH.2000.15.4.359>
- Kondratov, R. V. (2007). A role of the circadian system and circadian proteins in aging. *Ageing Research Reviews*, 6(1), 12–27. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2007.02.003>
- Kozaki, T., Kubokawa, A., Taketomi, R., & Hatae, K. (2016). Light-induced melatonin suppression at night after exposure to different wavelength composition of morning light. *Neuroscience Letters*, 616, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.12.063>
- Lewy, A. J., Cutler, N. L., & Sack, R. L. (1999). The Endogenous Melatonin Profile as a Marker for Circadian Phase Position. *Journal of Biological Rhythms*, 14(3), 227–236. <https://doi.org/10.1177/074873099129000641>
- Lewy, A. J., & Sack, R. L. (1989). The dim light melatonin onset as a marker for circadian phase position. *Chronobiology International*, 6(1), 93–102. <https://doi.org/10.3109/07420528909059144>
- Lewy, A. J., Wehr, T. A., Goodwin, F. K., Newsome, D. A., & Markey, S. P. (1980). Light suppresses melatonin secretion in humans. *Science*, 210(4475), 1267–1269. <https://doi.org/10.1126/science.7434030>
- Lucas, R. J., Peirson, S. N., Berson, D. M., Brown, T. M., Cooper, H. M., Czeisler, C. A., ... Brainard, G. C. (2014). Measuring and using light in the melanopsin age. *Trends in Neurosciences*, 37(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.10.004>
- Madrid-Navarro, C. J., Escamilla-Sevilla, F., Mínguez-Castellanos, A., Campos, M., Ruiz-Abellán,

- F., Madrid, J. A., & Rol, M. A. (2018). Multidimensional circadian monitoring by wearable biosensors in Parkinson's disease. *Frontiers in Neurology*, 9(MAR), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00157>
- Madrid, J. A., & Rol, M. A. (2006). *Cronobiología básica y clínica*. Editec@ red.
- Markwell, E. L., Feigl, B., & Zele, A. J. (2010). Intrinsically photosensitive melanopsin retinal ganglion cell contributions to the pupillary light reflex and circadian rhythm. *Clinical and Experimental Optometry*, 93(3), 137–149. <https://doi.org/10.1111/j.1444-0938.2010.00479.x>
- Mishima, K., Okawa, M., Shimizu, T., & Hishikawa, Y. (2001). Diminished melatonin secretion in the elderly caused by insufficient environmental illumination. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(1), 129–134. <https://doi.org/10.1210/jc.86.1.129>
- Münch, M., Ladaïque, M., Roemer, S., Hashemi, K., & Kawasaki, A. (2017). Melanopsin-Mediated acute light responses measured in winter and in summer: Seasonal variations in adults with and without cataracts. *Frontiers in Neurology*, 8(SEP), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00464>
- Münch, M., Léon, L., Crippa, S. V., & Kawasaki, A. (2012). Circadian and wake-dependent effects on the pupil light reflex in response to narrow-bandwidth light pulses. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 53(8), 4546–4555. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-9494>
- Myers, B. L., & Badia, P. (1995). Changes in circadian rhythms and sleep quality with aging: Mechanisms and interventions. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 19(4), 553–571. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(95\)00018-6](https://doi.org/10.1016/0149-7634(95)00018-6)
- Nagare, R., Rea, M. S., Plitnick, B., & Figueiro, M. G. (2019a). Effect of White Light Devoid of “Cyan” Spectrum Radiation on Nighttime Melatonin Suppression Over a 1-h Exposure Duration. *Journal of Biological Rhythms*, 34(2), 195–204. <https://doi.org/10.1177/0748730419830013>
- Nagare, R., Rea, M. S., Plitnick, B., & Figueiro, M. G. (2019b). Nocturnal Melatonin Suppression by Adolescents and Adults for Different Levels, Spectra, and Durations of Light Exposure. *Journal of Biological Rhythms*, 34(2), 178–194. <https://doi.org/10.1177/0748730419828056>

- Park, J. C., Moura, A. L., Raza, A. S., Rhee, D. W., Kardon, R. H., & Hood, D. C. (2011). Toward a clinical protocol for assessing rod, cone, and melanopsin contributions to the human pupil response. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 52(9), 6624–6635. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-7586>
- Park, S. J., & Tokura, H. (1999). Bright light exposure during the daytime affects circadian rhythms of urinary melatonin and salivary immunoglobulin A. *Chronobiology International*, 16(3), 359–371. <https://doi.org/10.3109/07420529909116864>
- Rea, M. S., & Figueiro, M. G. (2018). Light as a circadian stimulus for architectural lighting. *Lighting Research and Technology*, 50(4), 497–510. <https://doi.org/10.1177/1477153516682368>
- Rea, M. S., Figueiro, M. G., Bierman, A., & Bullough, J. D. (2010). Circadian Light. *Journal of Circadian Rhythms*, 8(2), 77–80. <https://doi.org/10.1186/1740-3391-8-2>
- Rea, Mark S., Figueiro, M. G., Bullough, J. D., & Bierman, A. (2005). A model of phototransduction by the human circadian system. *Brain Research Reviews*, 50(2), 213–228. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2005.07.002>
- Reiter, R. J. (1991). Melatonin: The chemical expression of darkness. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 79(1–3). [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(91\)90087-9](https://doi.org/10.1016/0303-7207(91)90087-9)
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Korkmaz, A., & Ma, S. (2012). Obesity and metabolic syndrome: Association with chronodisruption, sleep deprivation, and melatonin suppression. *Annals of Medicine*, 44(6), 564–577. <https://doi.org/10.3109/07853890.2011.586365>
- Revell, V. L., & Skene, D. J. (2007). Light-induced melatonin suppression in humans with polychromatic and monochromatic light. *Chronobiology International*, 24(6), 1125–1137. <https://doi.org/10.1080/07420520701800652>
- Roenneberg, T., Wirz-Justice, A., & Mrosovsky, M. (2003). Life between clocks: Daily temporal patterns of human chronotypes. *Journal of Biological Rhythms*, 18(1), 80–90. <https://doi.org/10.1177/0748730402239679>
- Sack, R. L., Lewy, A. J., Erb, D. L., Vollmer, W. M., & Singer, C. M. (1986). Human melatonin decreases with age. *Journal of Pineal Research*, 3, 379–388.
- Schernhammer, E. S., Speizer, F. E., Walter, C., Hunter, D. J., & Colditz, G. A. (2001). Rotating Night Shifts and Risk of Breast Cancer in Women Participating in the Nurses ' Health

- Study. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(20), 1563–1568.
<https://doi.org/10.1093/jnci/93.20.1563>
- Schmidt, C., Collette, F., Cajochen, C., & Peigneux, P. (2007). A time to think: circadian rhythms in human cognition. *Cognitive Neuropsychology*, 24(7), 755–789.
<https://doi.org/10.1080/02643290701754158>
- Sharma, M., Palacios-Bois, J., Schwartz, G., Iskandar, H., Thakur, M., Quirion, R., & Nair, N. P. V. (1989). Circadian rhythms of melatonin and cortisol in aging. *Biological Psychiatry*, 25(3), 305–319. [https://doi.org/10.1016/0006-3223\(89\)90178-9](https://doi.org/10.1016/0006-3223(89)90178-9)
- Souman, J. L., Borra, T., de Goijer, I., Schlangen, L. J., Vlaskamp, B. N., & Lucassen, M. P. (2018). Spectral tuning of white light allows for strong reduction in melatonin suppression without changing illumination level or color temperature. *Journal of Biological Rhythms*, 33(4), 420–431. <https://doi.org/10.1177/0748730418784041>
- Touitou, Y. (2001). Human aging and melatonin. Clinical relevance. *Experimental Gerontology*, 36(7), 1083–1100. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(01\)00120-6](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(01)00120-6)
- Trejo, L. J., & Cicerone, C. M. (1984). Cells in the pretectal olivary nucleus are in the pathway for the direct light reflex of the pupil in the rat. *Brain Research*, 300(1), 49–62.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)91340-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(84)91340-4)
- Tsujimura, S. I., Ukai, K., Ohama, D., Nuruki, A., & Yunokuchi, K. (2010). Contribution of human melanopsin retinal ganglion cells to steady-state pupil responses. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1693), 2485–2492.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2010.0330>
- Tsujimura, S. ichi, & Tokuda, Y. (2011). Delayed response of human melanopsin retinal ganglion cells on the pupillary light reflex. *Ophthalmic and Physiological Optics*, 31(5), 469–479. <https://doi.org/10.1111/j.1475-1313.2011.00846.x>
- Turner, P. L., & Mainster, M. A. (2008). Circadian photoreception: Ageing and the eye's important role in systemic health. *British Journal of Ophthalmology*, 92(11), 1439–1444.
<https://doi.org/10.1136/bjo.2008.141747>
- Turner, Patricia L., Van Someren, E. J. W., & Mainster, M. A. (2010). The role of environmental light in sleep and health: Effects of ocular aging and cataract surgery. *Sleep Medicine Reviews*, 14(4), 269–280. <https://doi.org/10.1016/j.smr.2009.11.002>

- Voultsios, A., Kennaway, D. J., & Dawson, D. (1997). Salivary Melatonin as a Circadian Phase Marker: Validation and Comparison to Plasma Melatonin. *Journal of Biological Rhythms*, 12(5), 457–466. <https://doi.org/10.1177/074873049701200507>
- Waldhauser, F., Weiszenbacher, G., Tatzer, E., Gisinger, B., Waldhauser, M., Schemper, M., & Frisch, H. (1988). Alterations in nocturnal serum melatonin levels in humans with growth and aging. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 66(3), 648–652. <https://doi.org/10.1210/jcem-66-3-648>
- Yasukouchi, A., Hazama, T., & Kozaki, T. (2007). Variations in the Light-induced Suppression of Nocturnal Melatonin with Special Reference to Variations in the Pupillary Light Reflex in Humans. *Journal of PHYSIOLOGICAL ANTHROPOLOGY*, 26(2), 113–121. <https://doi.org/10.2114/jpa2.26.113>

3.3. CAPÍTULO EXPERIMENTAL 3:

**UN NUEVO MÉTODO INTEGRAL PARA EVALUAR
FUENTES DE ILUMINACIÓN ARTIFICIAL BASADO EN
CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y EN MARCADORES
BIOLÓGICOS Y PSICOLÓGICOS**

3.3. UN NUEVO MÉTODO INTEGRAL PARA EVALUAR FUENTES DE ILUMINACIÓN ARTIFICIAL BASADO EN CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y EN MARCADORES BIOLÓGICOS Y PSICOLÓGICOS

RESUMEN

Hoy en día, se sabe que el correcto funcionamiento del sistema circadiano, incluyendo el mantenimiento del perfil de secreción de melatonina, requiere tanto exposición a luz brillante durante el día como oscuridad durante la noche. Sin embargo, parámetros como la intensidad, el espectro, el horario y la duración de la exposición a la luz tienen efectos sobre el sistema circadiano. No obstante, solo recientemente hemos empezado a conocer los efectos dañinos para la salud humana causados por la cronodisrupción o el desajuste del orden temporal interno. Además, el confort subjetivo también debería ser una variable a tener en cuenta, puesto que ya en 1941, se definieran niveles altos y bajos de iluminación a los cuales la luz era considerada “agradable” para cada temperatura de color. El objetivo de este estudio fue desarrollar un método práctico para evaluar fuentes de iluminación artificial, basándose no solo en su potencia espectral y, por lo tanto, la correspondiente activación de los fotorreceptores circadianos, sino también en la discriminación cromática, el confort y los efectos circadianos. El protocolo fue dividido en tres partes: la primera consistió en un análisis físico de las fuentes de luz, donde el espectro y la intensidad en irradiancia se midieron con un espectrorradiómetro. Se emplearon las siguientes fuentes de luz: LED de 5700 K, LED de 3000 K, LED ámbar, cuatro configuraciones diferentes de LEDs monocromáticos rojo-verde-azul (RGB) y cuatro configuraciones de rojo-verde-violeta (RGV) generadas con un prototipo del Laboratorio de Cronobiología, lámpara de vapor de mercurio, lámpara incandescente y lámpara fluorescente. Se utilizaron 8 cartas Munsell de colores estándar (7.5R 6/4, 5Y 6/4, 5GY 6/8, 2.5G 6/6, 10BG 6/4, 5PB 6/8, 2.5P 6/8, 10P 6/8) para realizar la segunda parte del método: los test subjetivos y de discriminación cromática, donde un voluntario tenía que permanecer sentado en una habitación completamente blanca identificando las cartas de color bajo las diferentes fuentes de luz. También se requería que respondiera a un cuestionario sobre el confort que le producía la luz y el momento del día preferido para su uso. El último paso consistió en medir el efecto de la fuente de luz sobre dos marcadores circadianos: la inhibición de melatonina y el reflejo pupilar a la luz, empleando para ello los protocolos utilizados en el capítulo 2. Nuestros resultados demuestran que el método propuesto en este estudio es una herramienta adecuada para evaluar los efectos de cualquier fuente de iluminación en el sistema circadiano, puesto que aborda la valoración desde tres perspectivas diferentes que

son complementarias e interdependientes, y además considera tanto variables objetivas como subjetivas.

INTRODUCCIÓN

El sistema circadiano permite a los organismos ajustar sus variables fisiológicas anticipándose diariamente a los cambios ambientales. En mamíferos, este sistema consiste en una red de estructuras jerárquicamente organizadas cuyo reloj principal se localiza en el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo (Garaulet & Madrid, 2010). Este reloj central no funciona con una cadencia exacta de 24 horas y, en ausencia de señales externas, tiende a retrasarse. Las señales temporales ambientales que sincronizan el sistema circadiano se conocen como *zeitgebers* (literalmente, “dadores de tiempo”), entre los cuales, el más importante es el ciclo diario de luz-oscuridad (Roenneberg et al., 2003).

La información proporcionada por los *zeitbegers* llega al reloj principal a través de la retina, donde se encuentran los primeros fotorreceptores, conos y bastones, aunque no son los únicos. En el año 2002, se descubrió una pequeña subpoblación de células ganglionares de la retina que contenían un fotopigmento sensible a la luz de entre 460-480 nm, llamado melanopsina. Los axones de estas células, llamadas células ganglionares de la retina intrínsecamente fotosensibles (ipRGCs), constituyen el tracto retinohipotalámico, que envía la información al NSQ (Berson et al., 2002; Brainard et al., 2001). Una vez que se recibe esta información, el NSQ, a través de distintas vías de salida, tanto neurales como humorales, transmite la señal temporal al resto del organismo. Sin embargo, las ipRGCs no solo transmiten información lumínica al reloj central, sino que también contribuyen a regular la respuesta pupilar a la luz (PLR), que es una medida objetiva y no invasiva de la fotorrecepción circadiana y ya ha sido utilizada en numerosos estudios para investigar la regulación circadiana y la activación melanópica (Adhikari et al., 2016; Adhikari et al., 2015; Adhikari et al., 2015; Bonmati-Carrion et al., 2018; Joyce et al., 2015). Las vías de salida desde el NSQ son capaces de generar varios ritmos manifiestos como la temperatura distal, el ritmo de sueño-vigilia o la secreción de melatonina. La melatonina es una hormona liberada por la glándula pineal, cuya secreción está controlada por el NSQ y la acción inhibidora de la luz. Esta hormona presenta un ritmo de secreción con niveles máximos durante la noche, decayendo a concentraciones prácticamente indetectables durante el día y numerosos estudios han demostrado que su ritmo de secreción es un marcador adecuado para evaluar la fase circadiana (Bonmati-Carrion et al., 2013; Lewy et al., 1999; Lewy & Sack, 1989; Voultsios et al., 1997).

Con la invención de la luz eléctrica, hace aproximadamente 150 años, el ciclo natural de luz-oscuridad y, por lo tanto, la organización temporal del sistema circadiano se han visto profundamente alterados (Erren & Reiter, 2009b; Haim & Portnov, 2013). Este hecho, en combinación con una exposición insuficiente a luz diurna y algunos hábitos de las sociedades modernas, como el trabajo a turnos, el ocio nocturno y los viajes transmeridianos, puede originar una gran variedad de efectos fisiológicos negativos (Madrid & Rol, 2006; Pauley, 2004). Todas estas alteraciones se engloban en un concepto relativamente nuevo: cronodisrupción (CD), definido como el estado crónico o temporal de desincronización, ya sea entre los diferentes ritmos circadianos o entre el tiempo interno y el externo (Erren & Reiter, 2009a, 2013). Las principales consecuencias de la CD en la salud humana incluyen síndrome metabólico (Garaulet & Madrid, 2010; Reiter, Tan, Korkmaz, & Ma, 2012), enfermedades cardiovasculares (Knutsson & Bøggild, 2000), alteraciones cognitivas (Cho, Ennaceur, Cole, & Suh, 2000), trastornos afectivos, envejecimiento prematuro (Fonken, Aubrecht, Meléndez-Fernández, Weil, & Nelson, 2013; Navara & Nelson, 2007) y aumento de la incidencia en algunos tipos de cáncer (Hansen, 2001; Schernhammer, Speizer, Walter, Hunter, & Colditz, 2001).

Teniendo en cuenta todas estas evidencias, parece obvio que la iluminación artificial inadecuada y la disminución de la exposición a luz diurna modifican la sincronización circadiana, aunque las sociedades modernas no parecen dispuestas a renunciar a los beneficios que proporciona la iluminación eléctrica. Sin embargo, otros parámetros como la intensidad, el espectro y el momento y la duración de la exposición a la luz también tienen efectos en el sistema circadiano (Rea, Figueiro, & Bullough, 2002). Además, el confort subjetivo que proporciona un determinado tipo de luz también es una variable a considerar a la hora de evaluar una fuente luminosa. Ya, en 1941, Kruithof A. (1941) definió niveles máximos y mínimos de iluminación entre los cuales la luz se consideraba “placentera” para cada temperatura correlacionada de color (CCT). Así, para una temperatura de 3000 K, una intensidad de luz superior a los 500 luxes o inferior a los 100 luxes se percibe como “antinatural”. Por lo tanto, resulta necesario disponer de nuevos métodos y herramientas que permitan evaluar los efectos de la luz artificial en marcadores circadianos sin renunciar a un adecuado confort y constancia de color, definida esta última como la invariabilidad en los colores percibidos bajo cambios en la composición espectral del iluminante (Craven & Foster, 1992).

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El método desarrollado está dividido en tres partes (Figura 1). La primera consiste en un análisis físico y espectral de la fuente de iluminación. La segunda en un test subjetivo de confort y constancia del color. Y el último paso engloba las pruebas biológicas para medir marcadores circadianos.

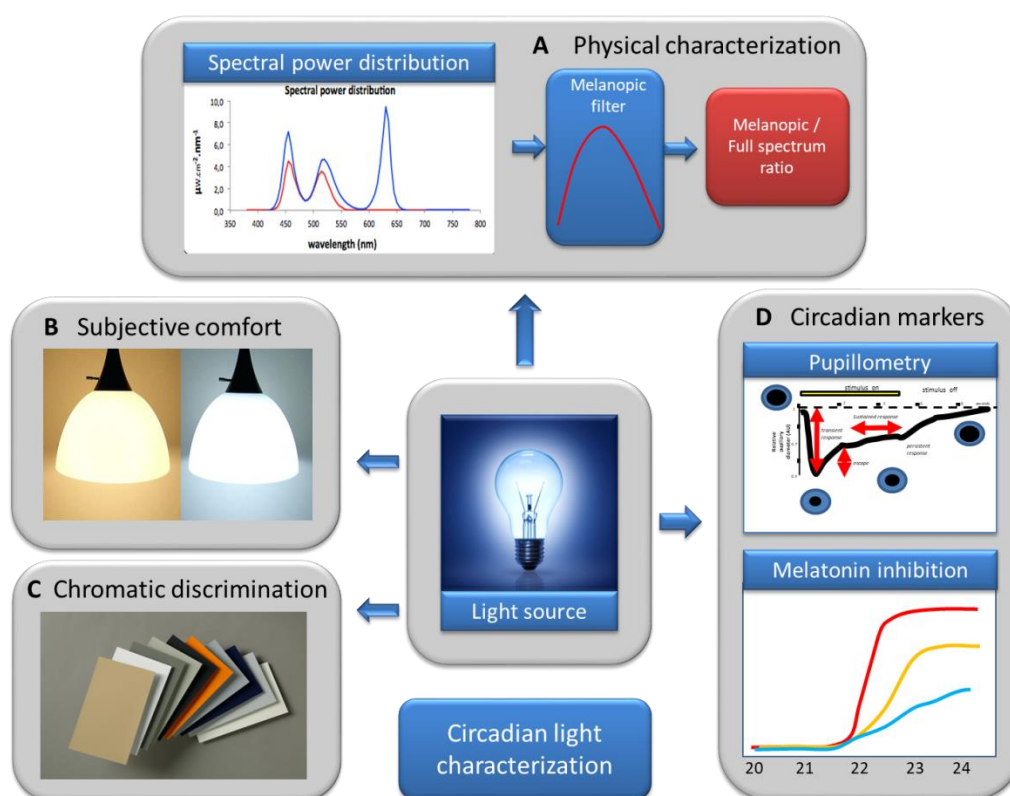


Figura 1. Esquema del procedimiento utilizado para la evaluación circadiana de la luz como diurna o nocturna. Una vez que se obtiene la distribución espectral de la fuente de luz, se filtra utilizando una función numérica que imita el espectro de absorción de la melanopsina; entonces, la relación entre el área bajo la curva de luz filtrada y la luz de espectro completo se usa como un índice de luz circadiana (A). En una segunda etapa, se determina la aceptabilidad de cada tipo de luz como luz diurna o nocturna (B), así como la capacidad de los sujetos para discriminar los colores bajo cada fuente de luz (C). Finalmente, el efecto de la luz en el sistema circadiano se evalúa utilizando la pupilometría y la inhibición de la secreción de melatonina como marcadores biológicos circadianos (D).

1. ANÁLISIS FÍSICO DE LAS FUENTES DE LUZ

Los espectros y las intensidades en irradiancia de las fuentes de luz se midieron con un espectrorradiómetro (USB2000⁺, Ocean Optics, Florida, USA) en una cámara totalmente blanca y aislada de luces externas. Los datos se procesaron y analizaron utilizando el correspondiente

software de espectroscopía (Ocean Optics, Florida, USA). Los espectros se analizaron en intervalos de 1 nm y se normalizaron a partir de la máxima irradiancia.

Para determinar la energía emitida por cada fuente de luz en la banda de sensibilidad de las ipRGCs, se calculó la luz transmitida a través de un filtro numérico que, precisamente, mimetiza esta sensibilidad espectral (Rea et al., 2012). A continuación, se normalizó el espectro de transmisión y se calculó el área bajo la curva (AUC) tanto para el espectro total como para el filtrado. Después, se calculó el ratio entre la irradiancia filtrada y la total (FILTER AUC / TOTAL AUC) para estimar la proporción de luz circadiana en comparación con la energía total emitida por cada luz (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis de los parámetros físicos de cada luz utilizada en este estudio. La primera columna indica el tipo de luz. La segunda columna representa el área bajo la curva de la luz filtrada (circadiana). El tercero corresponde al porcentaje del área bajo la curva para la luz filtrada en comparación con el área bajo la curva de todo el espectro visible. La última columna muestra los valores de lux melanopíc (Lucas et al., 2014) emitidos por cada luz.

LIGHT	Filtered circadian light (AUC)	Filtered circadian light / Total light (%)
DL1	32.34	52.93
DL2	32.03	63.03
DL3	28.74	71.45
DL4	34.81	68.03
NL1	14.33	29.24
NL2	17.34	32.94
NL3	19.63	37.55
NL4	10.84	27.51
3000K	33.71	23.53
5700K	40.64	42.57
AMBER LED	2.70	3.19
MERCURY VAPOR	3.06	20.81
FLUORESCENT	12.76	42.11
INCANDESCENT	17.60	15.33

Las luces empleadas incluyeron: LED de 5700 K (LuciPanel Evo de Lucibel SA, Francia), LED de 3000 K (LuciPanel Evo de Lucibel SA, Francia), LED ámbar (Ignialight Sacopa S.A.U., España), cuatro configuraciones diferentes de LEDs monocromáticos rojo-verde-azul (RGB) y cuatro configuraciones de rojo-verde-violeta (RGV) generadas con un prototipo del Laboratorio de Cronobiología (Cronolab) compuestos de tiras de LED (Ingebat, Valencia, España), lámpara de vapor de mercurio (Luxten, Rumania), lámpara incandescente (KDE Group, España), y una bombilla fluorescente (ADEO, Francia).

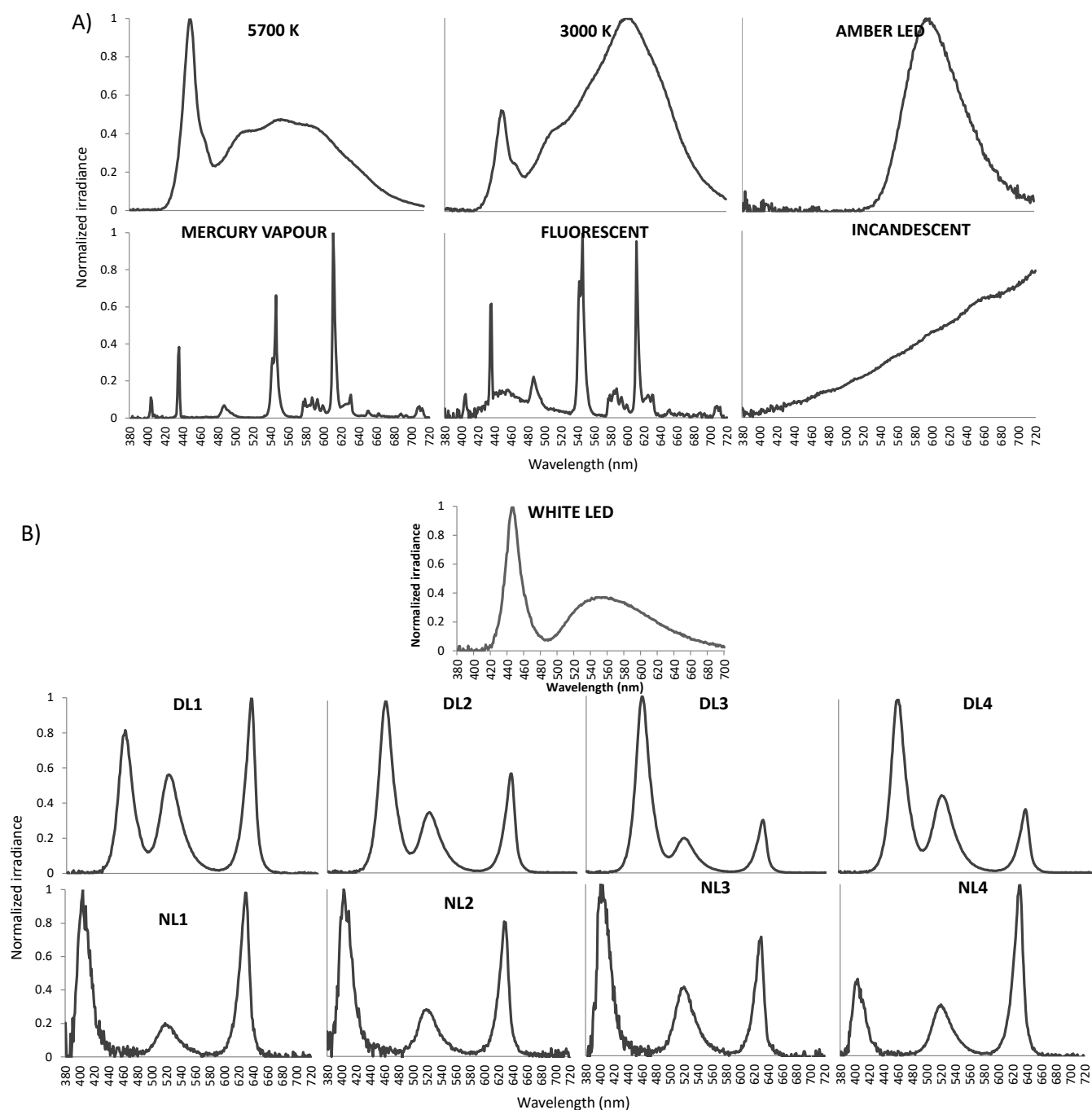


Figura 2. Espectros visibles normalizados de aquellas luces utilizadas en este estudio. A) Espectros de luces comerciales utilizados en el análisis físico y pruebas biológicas. B) Espectros de luces diurnas o DL (RGB) y luces nocturnas o NL (RGV) de las luces utilizadas en las pruebas de constancia de color y confort.

Las cuatro configuraciones de RGB se definieron como luces de día, ya que producen luces blancas enriquecidas en azul de forma similar a la luz del sol. Por el contrario, las cuatro

configuraciones de RGV se clasificaron como luces de día porque la luz azul fue sustituida por la violeta.

2. CONSTANCIA DEL COLOR Y TESTS SUBJETIVOS

El Comité Internacional en Iluminación (CIE) elaboró el informe técnico 177:2007 “Color Rendering of White LED Sources”, en el que no recomienda el uso del Índice de Reproducción Cromática (CRI) para evaluar la reproducibilidad de fuentes de luz monocromáticas y LED blancas. Por lo tanto, en este estudio, se emplearon las ocho cartas de color Munsell que se utilizan para calcular dicho índice, para llevar a cabo un test de constancia del color en voluntarios sanos.

- Participantes

Para participar en este estudio se reclutaron once voluntarios sanos (6 hombres y 5 mujeres, edad 27 ± 1 años). Este experimento fue aprobado por el Comité Ético de la Universidad de Murcia y es conforme a los estándares establecidos por la Declaración de Helsinki. Los voluntarios firmaron un consentimiento informado antes de su participación y se les descartaron alteraciones de la visión en color a través del test de Ishihara.

- Fuentes de iluminación

Se emplearon las cuatro luces LED RGB y las cuatro RGV descritas en el apartado de análisis físico de este estudio para llevar a cabo el test de constancia del color. Además, se utilizó una luz LED blanca como luz control. Estas luces consistieron en tiras de 5 metros que contenían 300 bombillas de 12 V cada una (Ingebat, Valencia, España). Sus correspondientes espectros están representados en la Figura 2 mientras que sus parámetros de intensidad se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Valores de intensidad de la luz en irradiancia (mW/m^2), iluminancia (lux) y flujo fotónico ($\text{photon/cm}^2/\text{s}$) de todas las luces empleadas en los test de confort y constancia del color (DL para las luces diurnas y NL para las nocturnas).

LIGHT	IRRADIANCE (mW/m^2)	ILLUMINANCE (lux)	PHOTON FLUX ($\text{photons/cm}^2/\text{s}$)
DL1	3097	460	$7.20\text{E}+12$
DL2	2921	500	$8.10\text{E}+12$
DL3	3700	470	$9.90\text{E}+12$
DL4	3900	730	$1.10\text{E}+13$
NL1	315	49	$6.00\text{E}+11$
NL2	313	54	$6.10\text{E}+11$
NL3	342	66	$8.60\text{E}+11$
NL4	598	128	$1.24\text{E}+12$

- Pruebas de constancia del color y comodidad

El test de constancia del color se llevó a cabo en una habitación completamente blanca, de forma que ningún color interfiriera con la reflexión de la luz. Para realizar esta prueba, un voluntario permanecía sentado dentro de la habitación blanca mirando a la pared del fondo expuesto a la luz control LED blanca. En esta posición, se le proporcionaban las introducciones para el experimento y el cuestionario que debía completar. Después de leer las instrucciones, se le mostraban 8 cartas de color Munsell, correspondientes a los siguientes colores estándar: 7.5R 6/4, 5Y 6/4, 5GY 6/8, 2.5G 6/6, 10BG 6/4, 5PB 6/8, 2.5P 6/8, 10P 6/8. A cada una de las cartas, los investigadores le asignaban un nombre descriptivo y permitiendo a los voluntarios memorizar la asociación nombre-color durante 5 minutos. A continuación, se colocaba al voluntario un antifaz negro y se apagaba la luz, permaneciendo en oscuridad completa durante 5 minutos. Entonces, se encendía la primera luz experimental y se pedía al voluntario que se retirara el antifaz, dejando que se adaptara a la luz durante unos segundos. Después, se le volvían a mostrar de nuevo 8 cartas de color, dándole 10 segundos por carta para identificar el color. El orden de las cartas se aleatorizó y podían repetirse para el mismo participante. Finalmente, se le pedía que respondiera unas cuantas preguntas sobre el confort subjetivo que producía cada luz, del 1 (muy incómoda) al 5 (muy cómoda) y el momento del día (día o noche) preferido para utilizar cada una de las luces, correspondiendo el 1 a la noche y el 5 al día. Después, se pedía al voluntario que volviera a colocarse el antifaz y se apagaba la luz durante

otros 5 minutos, repitiéndose el proceso para cada una de las luces experimentales. A lo largo de todo el procedimiento, la luz control (LED blanco) volvió a encenderse una vez como luz experimental para verificar la fiabilidad de las respuestas.

A continuación, los datos de discriminación cromática se analizaron calculando la tasa de aciertos (número de colores identificados correctamente / número total de respuestas) para cada luz. Además, la tasa de aciertos se calculó también agrupando las luces en luces de día o luces de noche. El nivel de coherencia con la luz control (LED blanco) se fijó en el 75 % de aciertos, es decir, si un voluntario erraba más del 25 % de los nombres de los colores bajo la luz LED blanca, el participante no se consideraba válido.

Se llevó a cabo el mismo proceso para los parámetros de confort (1-Muy incómoda a 5-Muy cómoda) y momento preferido (1-Usó durante la noche a 5- Usó durante el día).

- Análisis estadístico

Se realizaron pruebas t de *Student* de muestras relacionadas para cada uno de los parámetros y cada una de las luces, utilizando SPSS 15.0, utilizando el LED blanco como luz control.

3. MARCADORES BIOLÓGICOS CIRCADIANOS

Estas pruebas incluyeron determinación de inhibición de melatonina y reflejo pupilar a la luz, para confirmar en marcadores biológicos circadianos la activación teórica de las ipRGCs y la influencia de la intensidad de luz que se obtuvieron en el primer apartado de este método. Para llevarlas a cabo, se emplearon las luces LED de 3000 K y 5700 K representadas en la Figura 2, con intensidades de 581 y 569 lux, respectivamente (la irradiancia fue de $1.81 \cdot 10^6$ y de $1.84 \cdot 10^6$ $\mu\text{W}/\text{cm}^2$, y los flujos fotónicos $5.25 \cdot 10^{18}$ y $5.05 \cdot 10^{18}$ fotones/ cm^2/seg , respectivamente).

- Inhibición de melatonina

La secreción de melatonina es altamente sensible a la acción inhibidora de la luz, especialmente, de la luz azul, por lo que es necesario medirla durante la noche y bajo condiciones muy controladas (Follenius et al., 1995; Kennaway, 2019). Para ello, se recolectaron muestras de saliva en tubos Salivette® (SARSTEDT AG & Co. KG, Germany), cada 30 minutos, el mismo día de la semana de 7 PM hasta una hora después de la hora habitual de acostarse de los voluntarios. Se dieron instrucciones a los participantes para seguir el protocolo de inicio de melatonina bajo condiciones de luz tenue (DLMO) (Lewy & Sack, 1989) en sus propias casas para evaluar la fase circadiana y el perfil original de secreción de

melatonina. En las siguientes sesiones los participantes llegaban al laboratorio 5 horas antes de su hora habitual de acostarse para probar las luces experimentales siguiendo el protocolo descrito en el Capítulo 2. Las muestras de saliva fueron analizadas mediante radioinmunoensayo (Stockgrand Ltd., Universidad de Surrey, Guildford, Reino Unido). Los coeficientes de variación intraensayo (CV) para el grupo bajo (media $\pm$ SD, 5,1 pg/ml $\pm$ 0,6 pg/ml), medio (28,9 pg/ml $\pm$ 3,3 pg/ml) y alto (57,4 pg/ml $\pm$ 3,6 pg/ml) fueron 11,8, 11,5 and 6,3 % respectivamente, y el límite de detección fue 0,8 pg/ml $\pm$ 0,4 pg/ml. Todas las muestras de cada individuo se midieron por duplicado en un único ensayo.

- Reflejo pupilar a la luz (PLR).

El PLR se evaluó utilizando un pupilómetro comercial (ViewPointEyeTracker, Arrington Research Inc., Scottsdale, USA). Este equipo consiste en soportes ajustables para mantener la cabeza fija y así evitar cualquier movimiento durante las medidas. El sistema de grabación consiste en una cámara infrarroja para grabar en oscuridad y su correspondiente software de seguimiento, que permite controlar la pupila del participante en todo momento y grabar su tamaño. Una pequeña luz LED roja situada detrás de la cámara sirve como punto visual para que el voluntario mantuviera la mirada fija. En esta investigación, se estudió el PLR contralateral, de forma que solo se graba el ojo izquierdo mientras que el estímulo luminoso se aplicaba en el derecho. El protocolo para la presentación de la luz fue adaptado de Park et al. (2011) (Capítulo 2).

El archivo de texto generado por ViewPoint fue procesado utilizando el software PupilabWare© (Cronolab, University of Murcia), que permite eliminar parpadeos y otros artefactos. Luego, se calculó la respuesta pupilar post-iluminación a los 6 segundos después del estímulo (6S-PIPR), a los 30 segundos después del estímulo (30S-PIPR) y el diámetro mínimo (Adhikari et al., 2015; Bonmati-Carrion et al., 2018; Park et al., 2011).

EJEMPLO DE APLICACIÓN

ANÁLISIS FÍSICO DE LAS FUENTES DE ILUMINACIÓN

La Figura 2 muestra los espectros de todas las fuentes de luz evaluadas en este estudio. Las luces de día (DL) de la 1 a la 4 fueron generadas mediante una combinación de LEDs monocromáticos rojo, verde y azul a distintas intensidades, siendo DL1 la más equilibrada en términos de proporción de las tres luces monocromáticas, lo que puede convertirla en una fuente de luz útil para tareas que requieran una correcta discriminación cromática. En el caso

de las luces de noche (NL), consistieron en una combinación de LEDs monocromáticos rojo, verde y violeta. NL4 fue la luz más cálida debido a su alta proporción en luz roja y su bajo porcentaje de luz violeta. Esto pareció convertirla en la mejor candidata para uso nocturno debido a la ausencia de luz azul y el alto contenido en luz roja.

En cuanto a las lámparas comerciales, se midieron tres tipos de LED (ámbar, 3000 K y 5700 K), una lámpara de vapor de mercurio, otra incandescente y otra fluorescente. El LED ámbar pareció ser la luz más apropiada para utilizarse durante la noche por su espectro, debido al bajísimo contenido en luz azul. Algo similar ocurrió con la luz incandescente, ya que emitía bajos niveles de energía en las partes azul y verde del espectro y una gran cantidad de radiación en la zona infrarroja.

Cuando se consideró el área bajo la curva (AUC) del espectro filtrado a través de un filtro numérico que mimetizaba la sensibilidad de las melanopsinas para calcular la proporción de energía emitida en comparación con el AUC del espectro total (Tabla 1), se encontró que el LED ámbar emitía el porcentaje más bajo de energía en la banda de sensibilidad circadiana (3,19 %), seguido de la lámpara de vapor de mercurio (20,81 %), del LED de 3000 K (23,53 %) y de las luces de noche (29,24 %, 32,94 %, 37,55 % y 27,51 % de la 1 a la 4). Toda las luces de día estaban por encima del 52,93 % (DL1), siendo DL3 la de mayor porcentaje entre todas ellas (71,45 %).

CONSTANCIA DEL COLOR Y TESTS SUBJETIVOS

La prueba de constancia del color y las pruebas subjetivas se llevaron a cabo con todas las luces de día y de noche. La tasa de aciertos (Figura 3) fue mayor del 50 % para todas las luces y, sorprendentemente, superior para las luces de noche que para las de día. El porcentaje de aciertos más alto se obtuvo bajo la luz NL4 (84,09 % $\pm$ 6,55 %), siendo similar al de la luz control (LED blanco) (82,95 % $\pm$ 3,48 %). Se encontraron diferencias significativas de la luz control con la DL3, que obtuvo una tasa de aciertos del 57,95 % $\pm$ 7,20 % ($p < 0,005$, $t = -4,282$) y con la NL2, con una tasa de aciertos del 69,32 % $\pm$ 6,61 % ($p < 0,05$, $t = -2,292$), siendo ambos los porcentajes de aciertos más bajos. Además, cuando se agruparon las luces en "de día" y "de noche" y se calculó la tasa media de aciertos, fue mucho más alta para las luces de día que para la luz control (69,32 % $\pm$ 3,24 %, $p < 0,005$, $t = 3,860$).

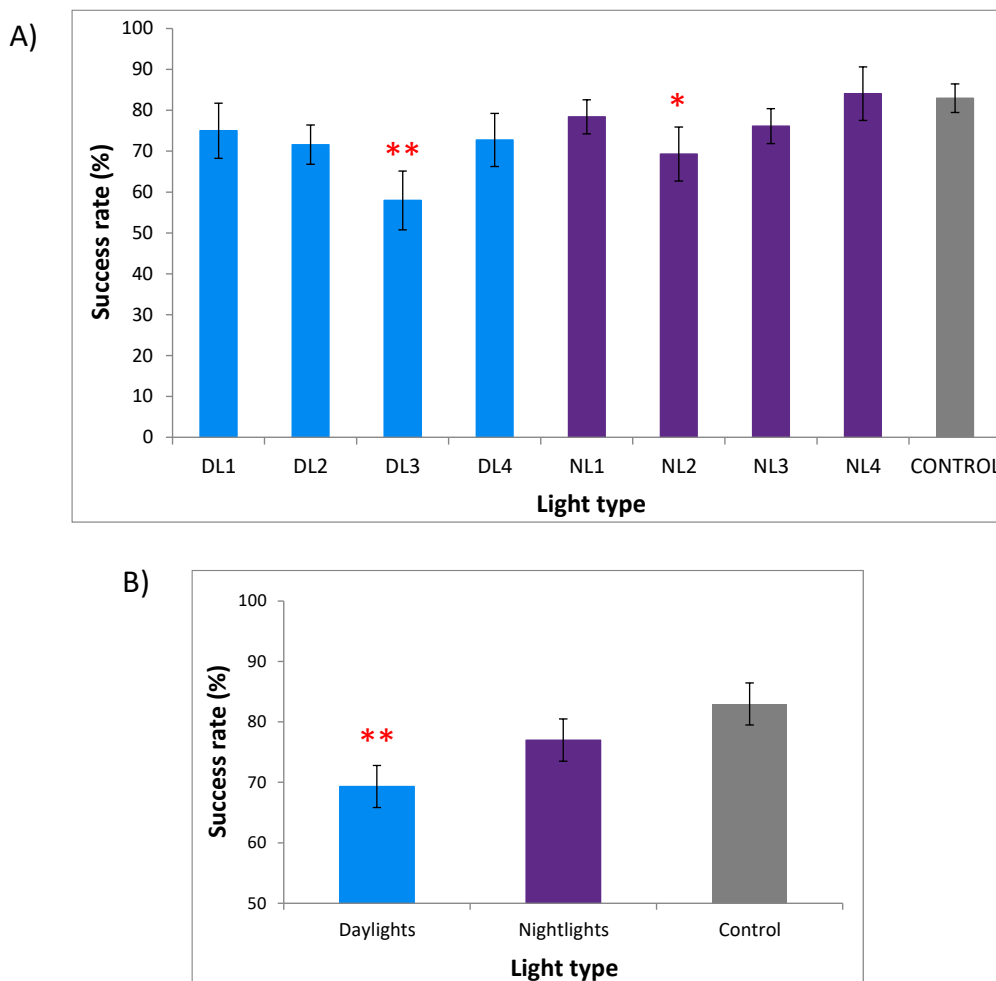


Figura 3. A) Tasa media de aciertos ($\pm$ SEM) para la prueba de constancia de color según el tipo de luz para total de 11 sujetos. B) Tasa media de aciertos ($\pm$ SEM) para las configuraciones de luces diurnas (DL1 a DL4), de luces nocturnas (NL1 a NL4) y de la luz blanca como control. * indica $p < 0,05$ (prueba t de Student para muestras relacionadas frente a la luz control), ** indica $p < 0,005$ (prueba t de Student para muestras relacionadas frente a la luz control).

Los valores de confort (Figura 4) se encontraban entre el 1 (muy incómoda) y el 5 (muy cómoda). Nuestros resultados confirmaron que la luz más cómoda era la NL4, con una puntuación media de $4,36 \pm 0,20$, que fue incluso mayor que la de la luz control ($3,45 \pm 0,39$). No obstante, no se encontraron diferencias significativas con ninguna de las luces y tampoco cuando se agruparon en luces de día y de noche. Aunque, en general, las luces de noche parecían ser percibidas como más “agradables” por los participantes.

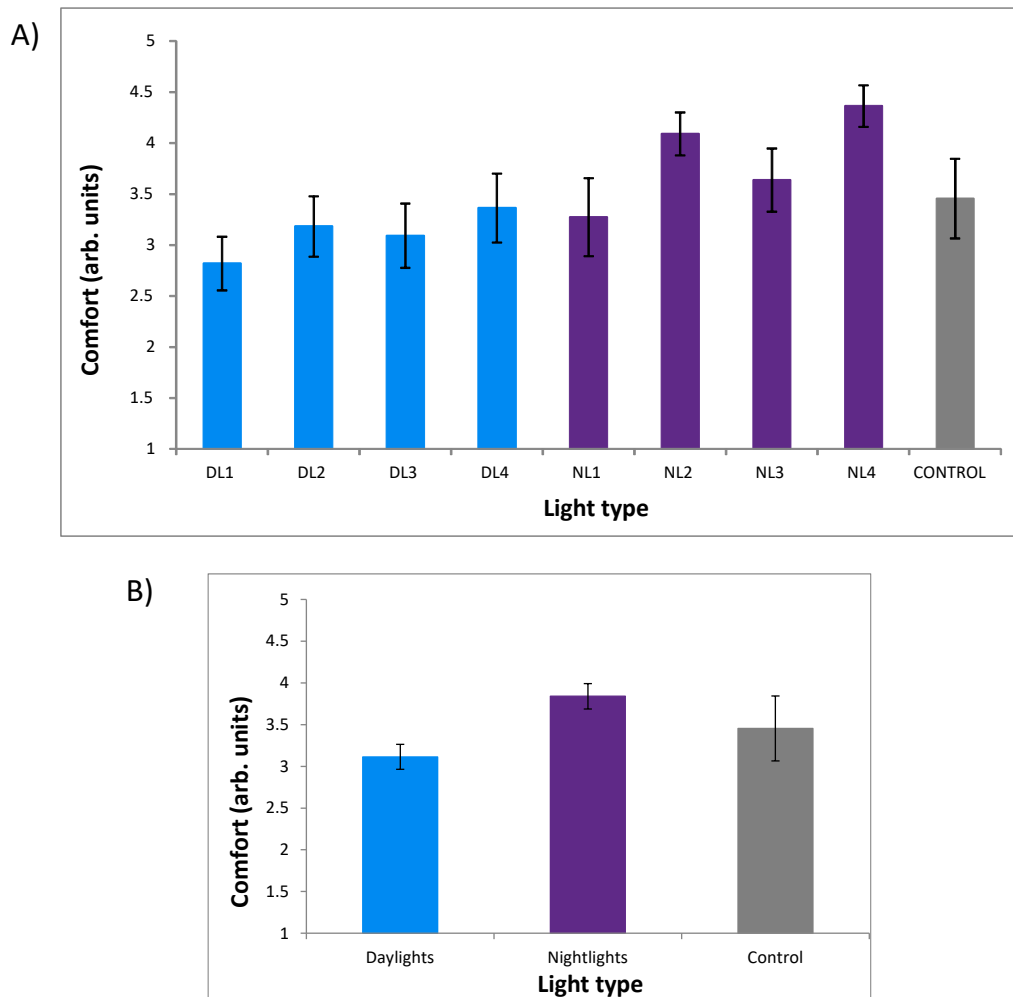


Figura 4. A) Confort subjetivo promedio ($\pm$ SEM) de cada luz para el grupo de 11 sujetos (1 muy incómoda y 5 muy cómoda). B) Confort subjetivo promedio ($\pm$ SEM) para los grupos de luces diurnas y nocturnas. Ver leyenda de la figura 3 para más detalles.

En cuanto al momento del día preferido para utilizar cada luz, “noche” correspondía a la puntuación 1 y “día” a la 5 (Figura 5). La luz más “nocturna” fue la NL2, con una puntuación de $2,27 \pm 0,36$ en comparación con la luz control ($p < 0,05$, $t = -2,507$), seguido de la NL1 ($2,46 \pm 0,39$, $p < 0,05$, $t = -2,358$) y de la NL3 ($2,55 \pm 0,28$, $p < 0,05$, $t = -2,292$), mientras que la luz más “diurna” fue la DL1, con una puntuación de $3,81 \pm 0,40$, aunque las diferencias con la luz control no fueron estadísticamente significativas. Cuando las luces se agruparon en diurnas y nocturnas, las luces nocturnas eran las preferidas para utilizarse durante la noche en comparación con la luz control ($2,59 \pm 0,18$, $p < 0,05$, $t = 2,326$).

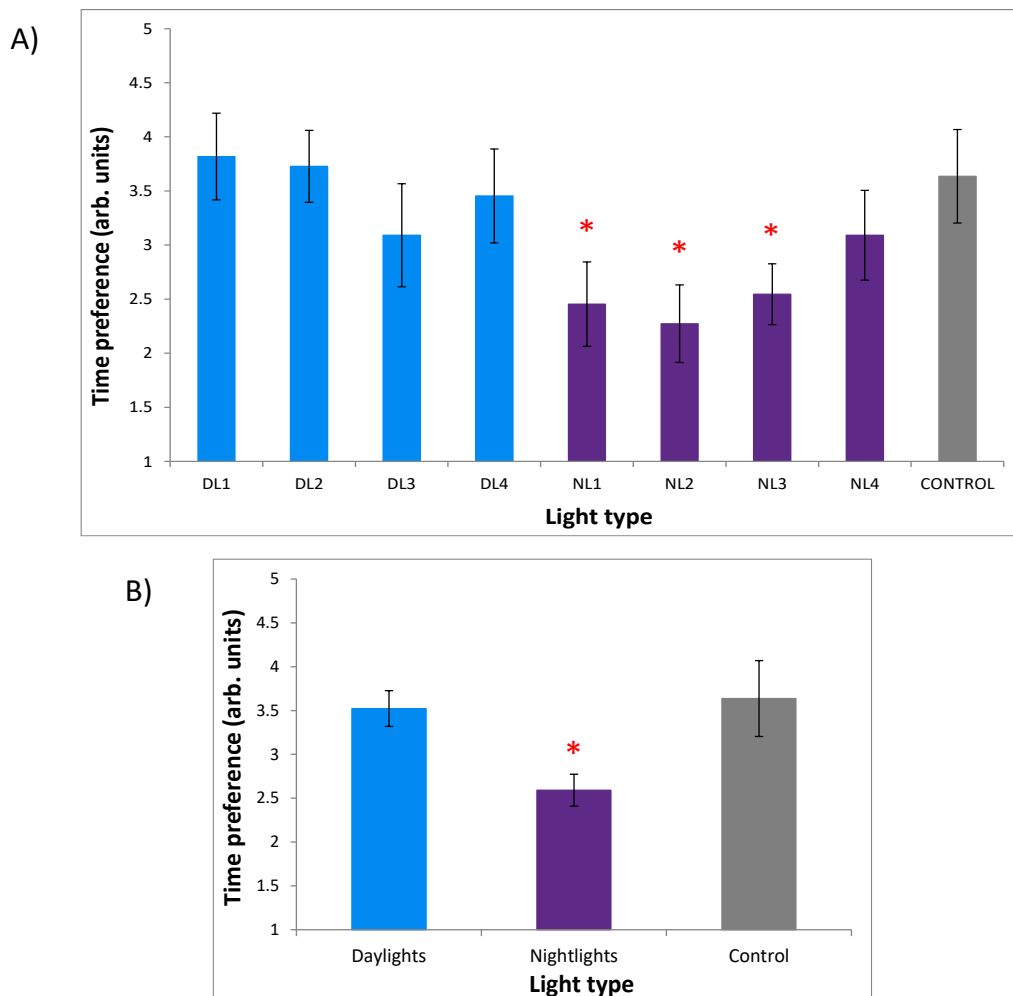


Figura 5. A) Promedio del momento del día preferido ($\pm$ SEM) para usar las diferentes luces (1 para la noche y 5 para el día) para los 11 sujetos. B) Promedio del momento del día preferido ($\pm$ SEM) para los grupos de luz diurna y nocturna (1 para la noche y 5 para el día). * indica $p < 0,05$ (t de Student para muestras relacionadas frente a la luz control). Ver leyenda de la Figura 3 para más detalles.

MARCADORES BIOLÓGICOS CIRCADIANOS

- Inhibición de melatonina

Cuando un sujeto representativo estuvo expuesto a dos horas de luz brillante, la concentración de melatonina en saliva descendió hasta niveles similares tanto bajo la luz de 5700 K como bajo la de 3000 K (Figura 6). Cuando se hizo la comparación entre el área bajo la curva de las tres situaciones durante el periodo en que la luz estuvo encendida, la luz de 5700 K produjo un AUC del 66,61 % en comparación con la de luz tenue, mientras que el AUC de la luz de 3000 K fue del 73.4 %. En términos de inhibición, esto significa que la luz de 5700 K produjo una mayor inhibición de melatonina que la de 3000 k. Además, durante el período de recuperación, cuando la luz estaba apagada de nuevo, el área bajo la curva en la condición de

5700 K fue del 59,1 % y en la de 3000 K del 65,7 % del área bajo la curva en la situación de luz tenue, indicando que la secreción de melatonina se recuperó más rápido después del estímulo de la luz de 3000 K que después de la luz de 5700 K.

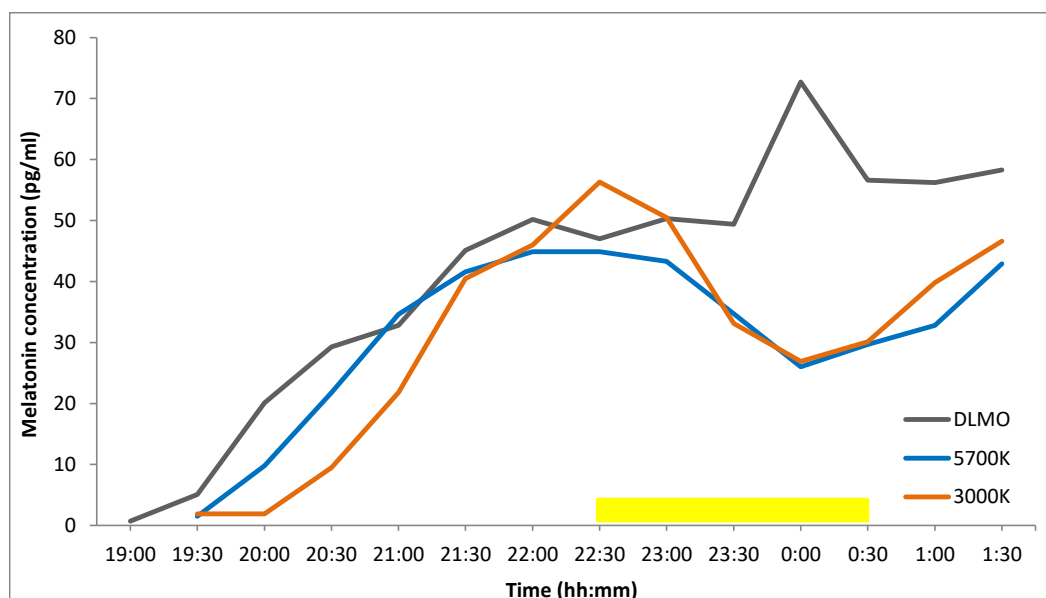


Figura 6. Concentración de melatonina (pg / ml) bajo luz tenue (línea gris) de un sujeto representativo expuesto a 5700K LED durante 120 minutos (línea azul) y a 3000K (línea naranja).

- Reflejo pupilar a la luz

La Figura 7A representa el reflejo pupilar a la luz de un participante después de un pulso de luz de un segundo tanto de 5700 K como de 3000 K a lo largo de dos minutos de grabación. En ambos casos, la rápida contracción pupilar (respuesta transitoria) se puede observar claramente, así como la respuesta persistente una vez que el estímulo ya se había apagado.

Como se puede comprobar, el mayor cambio en el diámetro pupilar (Figura 7B) se obtuvo bajo el LED de 5700 K, alcanzando su mínimo en el 76,8 % del diámetro de la línea base. Además, la 6S-PIPR, que corresponde a la respuesta pupilar post-iluminación regulada por las ipRGCs, fue mayor (mayor diámetro, menor contracción) bajo la luz de 5700 K en comparación con la de 3000 K (94,6 % y 98,5 % de la línea base, respectivamente). Por lo tanto, el estímulo de 5700 K produjo una mayor 6S-PIPR que el de 3000 K. En cuanto a la 30S-PIPR, sucedió algo similar, pero en este caso, las diferencias fueron menores, llegando al 98,4 % de la línea base con la luz de 5700 K y al 99,4 % de la línea base con la de 3000 K.

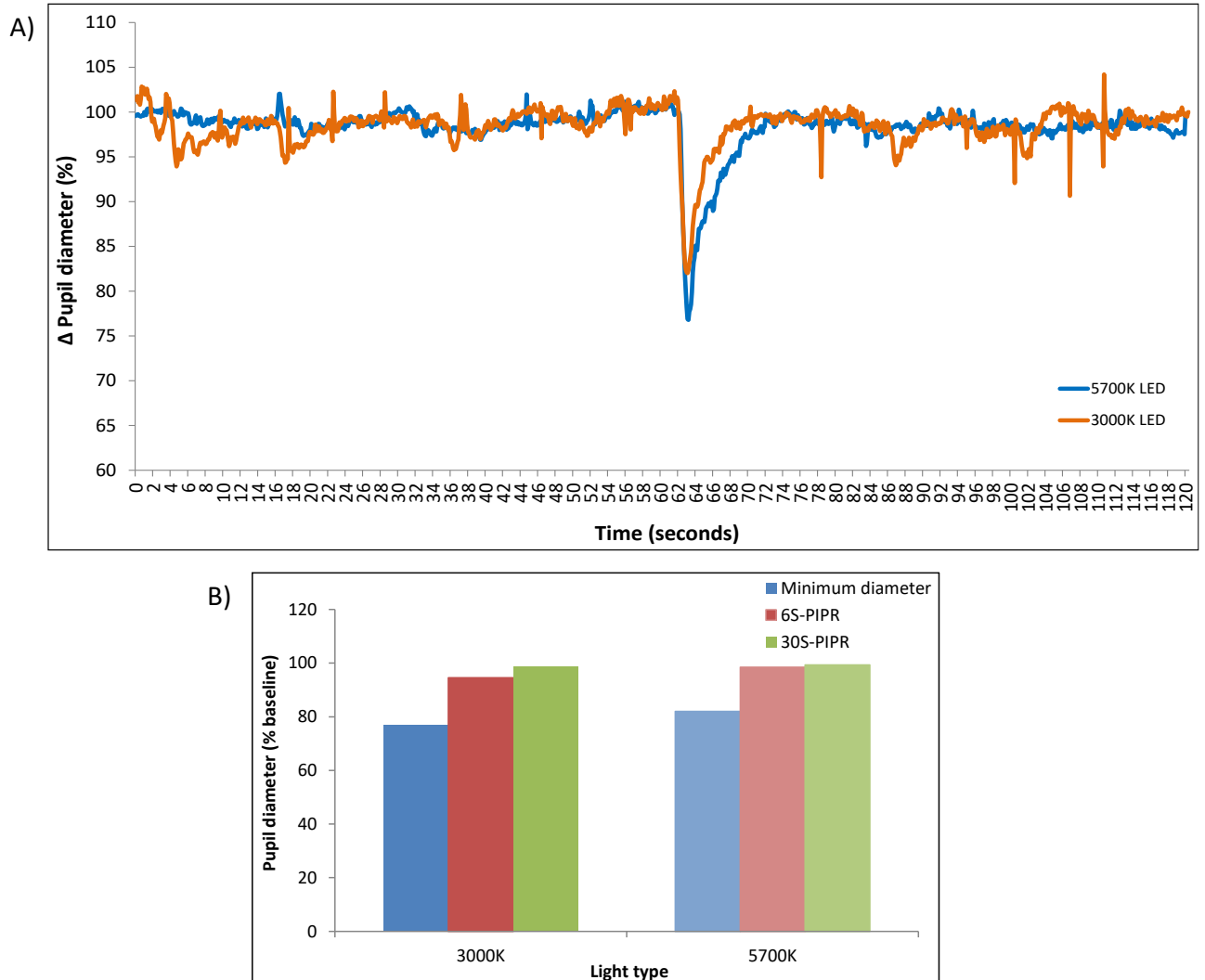


Figura 7. A) Reflejo pupilar a la luz de un sujeto expuesto a un pulso de 1 segundo de 3000K LED (línea naranja) y 5700K LED (línea azul). La línea base promedio de la pupila se representa como 100%. B) Diámetro mínimo, 6S-PIPR y 30S-PIPR para el estímulo de luz LED de 3000K y para el estímulo de luz LED de 5700K del mismo sujeto.

DISCUSIÓN

El método descrito en este estudio pretende constituir una herramienta práctica para evaluar la adecuación de cualquier fuente de luz para uso diurno o nocturno basándose en sus efectos potenciales sobre los ritmos circadianos.

El primer paso consiste en un análisis físico ya que la intensidad y el espectro son las principales características de una luz, en conjunto con el tiempo y duración de la exposición que también pueden afectar al sistema circadiano (Rea et al., 2012). Por lo tanto, una luz de alta intensidad y con un contenido importante en la zona azul del espectro sería más

adecuada, *a priori*, para uso diurno, mientras que una lámpara de baja intensidad y emisión reducida en la parte azul del espectro sería más apropiada para uso nocturno. Sin embargo, las pruebas biológicas son necesarias para validar la aceptación, el confort y el impacto real sobre el sistema circadiano en un usuario final.

Precisamente, en cuanto a las pruebas biológicas, la secreción de melatonina es un ritmo marcador, considerado como el “gold standard” para evaluar la fase del sistema circadiano (Bonmati-Carrion et al., 2013; Lewy et al., 1999; Lewy et al., 1980; Lewy & Sack, 1989; Voultsios et al., 1997). Aunque la concentración de melatonina es inferior en saliva que en el plasma, el muestreo en saliva es menos invasivo y más cómodo para los voluntarios, y, por lo tanto, se acepta más fácilmente. El reflejo pupilar a la luz es un proceso no invasivo que dura tan solo unos veinte minutos. Esta prueba puede realizarse durante el día, al contrario que la determinación de melatonina, y también es más rápido, más barato e incluso más cómodo tanto para voluntarios como investigadores (Adhikari et al., 2016; Adhikari et al., 2015; Bonmati-Carrion et al., 2018, 2016; Bouma, 1962; Park et al., 2011; Tsujimura et al., 2010). Sin embargo, como se ha demostrado previamente (Capítulo 2), ambas técnicas pueden ser complementarias, ya que proporcionan diferente información sobre el estado del sistema circadiano y su principal vía de entrada, las ipRGCs.

No obstante, no solo es necesario realizar análisis físico y pruebas de marcadores biológicos circadianos. Los seres humanos pasamos la mayor parte de nuestro tiempo expuestos a luz artificial, puesto que el uso de iluminación eléctrica está muy extendido en lugares de trabajo, durante actividades de ocio, en los hogares e incluso en exteriores durante la noche, por lo tanto, una correcta discriminación cromática y la percepción subjetiva en términos de confort y momento preferido para utilizar una luz también son parámetros que deben ser considerados. Durante las últimas décadas, muchos estudios han demostrado la relación entre diferentes intensidades de luz y estado de alerta y somnolencia, pues a medida que aumenta la intensidad de luz, también lo hace el estado de alerta (Badia et al., 1991; Cajochen et al., 2000; Dawson & Campbell, 1991; Vandewalle et al., 2006). Pero más recientemente, los estudios se han centrado en los efectos de la luz de longitud de onda corta sobre la atención (Cajochen et al., 2005; Lockley et al., 2006; Revell et al., 2006; Sahin & Figueiro, 2013; Sasseville et al., 2015), que es precisamente el tipo de luz a la que el sistema circadiano es más sensible. Por otro lado, Canazei et al., (2017) también estudiaron los efectos de diferentes espectros de luz sobre la atención y encontraron que cuando la somnolencia es elevada durante la noche, se puede producir un efecto de alerta de la luz incluso en ausencia de longitudes de onda cortas. Sin embargo, según sus resultados, las fuentes de luz con una

reducción en longitudes de onda cortas puede no ser aplicable en todos los lugares de trabajo, puesto que obtuvieron tasas de acierto más bajas en la discriminación cromática (Canazei et al., 2017). Estos estudios ponen de manifiesto la importancia de considerar la discriminación cromática, la constancia de color y la percepción subjetiva cuando se evalúa una fuente de luz, especialmente, si es necesaria una buena visión en color, como por ejemplo cuando se clasifican medicamentos o se ensamblan componentes de colores, como ocurre en las unidades de cuidados intensivos. Aun así, el concepto de constancia del color, definido como la invariabilidad de las superficies de color percibidas bajo cambios en la composición espectral del iluminante (Craven & Foster, 1992), implica que el color es un atributo del objeto, pero Logvinenko et al., (2015) observaron que sus voluntarios eran capaces de establecer una correspondencia entre paletas de color y objetos bajo cambios en la iluminación. Según ellos, esto no concuerda con la disparidad de metámeros (el fenómeno por el que dos objetos de colores similares bajo un iluminante, pueden no parecerse bajo un iluminante diferente), ya que la capacidad de hacer esta asociación es una propiedad fundamental de la visión en color de humanos. Por lo tanto, es necesaria una investigación más exhaustiva para indagar sobre de qué color aparecería un objeto bajo un iluminante concreto. De cualquier forma, tradicionalmente, el Índice de Reproducción Cromática (CRI) y la temperatura de color correlacionada (CCT) se han utilizado para medir la capacidad de una fuente de luz de reproducir los colores de un objeto. No obstante, en los casos en los que estos parámetros no son fiables, como ocurre con los LED blancos y monocromáticos (CIE, 2007), la constancia del color podría evaluarse más fácilmente como se ha propuesto en este trabajo, utilizando cartas de color Munsell, de forma que los voluntarios tengan que identificarlas bajo las luces experimentales.

Hasta donde conocemos, este estudio es el primero que ha propuesto una herramienta práctica e integral para evaluar los efectos de diferentes fuentes de iluminación en el sistema circadiano desde las perspectivas física, subjetiva y biológica. Bellia & Seraceni (2015) propusieron un modelo basado en la función de eficiencia de Gall (Gall & Bieske, 2004) para tener en cuenta la respuesta humana no lineal a la luz y, al mismo tiempo, simplificar el modelo sugerido por Rea et al. (2012) considerando la luz circadiana como una función de la iluminancia corneal. Sin embargo, este modelo es una aproximación para estimar la respuesta humana a estímulos luminosos, puesto que no miden directamente ningún marcador biológico, como puede ser la melatonina o su supresión por luz, mientras que la consistencia de nuestro trabajo radica, precisamente, en las pruebas biológicas para confirmar el análisis físico de las fuentes de luz. Por otro lado, Falchi et al., (2011) propusieron un modelo que

implicaba la eliminación total de la emisión de luz en longitudes de onda menores de 540 nm en exteriores. No obstante, este modelo se desarrolló para limitar la contaminación lumínica del cielo nocturno, no para evaluar los efectos sobre el sistema circadiano. Además, en casos donde es totalmente necesario tener una correcta percepción del color, este modelo establece el rango de 440 a 540 nm, que se corresponde con el máximo de la sensibilidad de la visión escotópica del ojo humano, como banda protegida. Este rango es adecuado para preservar la visibilidad del cielo nocturno (Falchi et al., 2011), pero a la hora de considerar los efectos sobre el sistema circadiano, es fundamental tener en cuenta las curvas de sensibilidad espectral de los fotorreceptores, especialmente de las células melanopsínicas, que son particularmente sensibles a la luz de entre 460-480 nm (Rea et al., 2012), así como la curva de supresión de melatonina, cuyo máximo se sitúa en 464 nm (Brainard et al., 2001). Puesto que la salud humana es un tema de preocupación creciente, la percepción subjetiva y otras herramientas para evaluar los efectos reales sobre marcadores circadianos deberían ser incluidas en cualquier evaluación de fuentes de iluminación.

CONCLUSIÓN

El método propuesto en este trabajo es una herramienta adecuada para evaluar los efectos de cualquier fuente de luz sobre el sistema circadiano, puesto que enfoca la valoración desde tres perspectivas diferentes que son complementarias e interdependientes, y además, considera tanto variables objetivas como subjetivas.

REFERENCIAS

- Adhikari, P., Feigl, B., & Zele, A. J. (2016). Rhodopsin and melanopsin contributions to the early redilation phase of the post-illumination pupil response (PIPR). *PLoS ONE*, 11(8), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161175>
- Adhikari, P., Pearson, C. A., Anderson, A. M., Zele, A. J., & Feigl, B. (2015). Effect of Age and Refractive Error on the Melanopsin Mediated Post-Illumination Pupil Response (PIPR). *Scientific Reports*, 5, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep17610>
- Adhikari, P., Zele, A. J., & Feigl, B. (2015). The post-illumination pupil response (PIPR). *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 56(6), 3838–3849. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-16233>
- Badia, P., Myers, B., Boecker, M., & Culpepper, J. (1991). Bright Light Effects on Body Temperature, Alertness, EEG and Behavior. *Physiology & Behavior*, 50, 583–588.

[https://doi.org/10.1016/0031-9384\(91\)90549-4](https://doi.org/10.1016/0031-9384(91)90549-4)

Bellia, L., & Seraceni, M. (2015). A proposal for a simplified model to evaluate the circadian effects of light sources. *Lighting Research and Technology*, 46(5), 493–505. <https://doi.org/10.1177/1477153513490715>

Berson, D. M., Dunn, F. A., & Takao, M. (2002). Phototransduction by Retinal Ganglion Cells That Set the Circadian Clock. *Science*, 295(5557), 1070–1073. <https://doi.org/10.1126/science.1067262>

Bonmati-Carrion, M. A., Hild, K., Isherwood, C. M., Sweeney, S. J., Revell, V. L., Madrid, J. A., ... Skene, D. J. (2018). Effect of Single and Combined Monochromatic Light on the Human Pupillary Light Response. *Frontiers in Neurology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.01019>

Bonmati-Carrion, M. A., Hild, K., Isherwood, C., Sweeney, S. J., Revell, V. L., Skene, D. J., ... Madrid, J. A. (2016). Relationship between human pupillary light reflex and circadian system status. *PLoS ONE*, 11(9), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162476>

Bonmati-Carrion, M. A., Middleton, B., Revell, V., Skene, D. J., Rol, M. A., & Madrid, J. A. (2013). Circadian phase assessment by ambulatory monitoring in humans : Correlation with dim light melatonin onset. *Chronobiology International*, 31(1), 37–51. <https://doi.org/10.3109/07420528.2013.820740>

Bouma, H. (1962). Size of the Static Pupil as a Function of Wave-length and Luminosity of the Light Incident on the Human Eye. *Nature*, 193(4816), 690–691.

Brainard, G. C., Hanifin, J. P., Greeson, J. M., Byrne, B., Glickman, G., Gerner, E., & Rollag, M. D. (2001). Action Spectrum for Melatonin Regulation in Humans: Evidence for a Novel Circadian Photoreceptor. *The Journal of Neuroscience*, 21(16), 6405–6412. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-16-06405.2001>

Cajochen, C., Münch, M., Kriebel, S., Kräuchi, K., Steiner, R., Oelhafen, P., ... Wirz-Justice, A. (2005). High sensitivity of human melatonin, alertness, thermoregulation, and heart rate to short wavelength light. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90(3), 1311–1316. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0957>

Cajochen, C., Zeitzer, J. M., Czeisler, C. a, & Dijk, D. J. (2000). Dose-response relationship for light intensity and alertness and its ocular and EEG correlates. *Behavioural Brain*

Research, 115, 75–83.

- Canazei, M., Pohl, W., Bliem, H. R., & Weiss, E. M. (2017). Acute effects of different light spectra on simulated night-shift work without circadian alignment. *Chronobiology International*, 34(3), 303–317. <https://doi.org/10.1080/07420528.2016.1222414>
- Cho, K., Ennaceur, A., Cole, J. C., & Suh, C. K. (2000). Chronic jet lag produces cognitive deficits. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(6), RC66. <https://doi.org/dx.doi.org/S0212-16112010000300014>
- CIE. (2007). *Colour Rendering of White Led Light Sources*. CIE 177:2007.
- Craven, R. J., & Foster, D. H. (1992). An operational approach to colour constancy. *Vision Research*, 32(7), 1359–1366. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(92\)90228-b](https://doi.org/10.1016/0042-6989(92)90228-b)
- Dawson, D., & Campbell, S. S. (1991). Timed Exposure to Bright Light Improves Simulated Night Shifts. *Sleep*, 14(6), 511–516.
- Erren, T. C., & Reiter, R. J. (2009a). Defining chronodisruption. *Journal of Pineal Research*, 46(3), 245–247. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2009.00665.x>
- Erren, T. C., & Reiter, R. J. (2009b). Light Hygiene: Time to make preventive use of insights - old and new - into the nexus of the drug light, melatonin, clocks, chronodisruption and public health. *Medical Hypotheses*, 73(4), 537–541. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2009.06.003>
- Erren, T. C., & Reiter, R. J. (2013). Revisiting chronodisruption: When the physiological nexus between internal and external times splits in humans. *Naturwissenschaften*, 100(4), 291–298. <https://doi.org/10.1007/s00114-013-1026-5>
- Falchi, F., Cinzano, P., Elvidge, C. D., Keith, D. M., & Haim, A. (2011). Limiting the impact of light pollution on human health, environment and stellar visibility. *Journal of Environmental Management*, 92(10), 2714–2722. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.06.029>
- Follenius, M., Weibel, L., & Brandenberger, G. (1995). Distinct modes of melatonin secretion in normal men. *Journal of Pineal Research*, 18(3), 135–140. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.1995.tb00151.x>
- Fonken, L. K., Aubrecht, T. G., Meléndez-Fernández, O. H., Weil, Z. M., & Nelson, R. J. (2013). Dim light at night disrupts molecular circadian rhythms and increases body weight.

- Journal of Biological Rhythms*, 28(4), 262–271.
<https://doi.org/10.1177/0748730413493862>
- Gall, D., & Bieske, K. (2004). Definition and measurement of circadian radiometric quantities. In *Proceedings of the CIE Symposium'04 on Light and Health* (pp. 129–132).
- Garaulet, M., & Madrid, J. A. (2010). Chronobiological aspects of nutrition, metabolic syndrome and obesity. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(9–10), 967–978.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.05.005>
- Haim, A., & Portnov, B. A. (2013). *Light Pollution as a New Risk Factor for Human Breast and Prostate Cancers*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6220-6>
- Hansen, J. (2001). Light at night, shiftwork, and breast cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(20), 1513–1515. <https://doi.org/10.1093/jnci/93.20.1513>
- Joyce, D. S., Feigl, B., Cao, D., & Zele, A. J. (2015). Temporal characteristics of melanopsin inputs to the human pupil light reflex. *Vision Research*, 107, 58–66.
<https://doi.org/10.1016/j.visres.2014.12.001>
- Kennaway, D. J. (2019). A critical review of melatonin assays: Past and present. *Journal of Pineal Research*, (February), 1–14. <https://doi.org/10.1111/jpi.12572>
- Knutsson, A., & Bøggild, H. (2000). Shiftwork and cardiovascular disease: Review of disease mechanisms. *Reviews on Environmental Health*, 15(4), 359–372.
<https://doi.org/10.1515/REVEH.2000.15.4.359>
- Kruithof, A. A. (1941). Tubular luminescence lamps for general illumination. *Philips Technical Review*, 6(3), 65–96.
- Lewy, A. J., Cutler, N. L., & Sack, R. L. (1999). The Endogenous Melatonin Profile as a Marker for Circadian Phase Position. *Journal of Biological Rhythms*, 14(3), 227–236.
<https://doi.org/10.1177/074873099129000641>
- Lewy, A. J., & Sack, R. L. (1989). The dim light melatonin onset as a marker for circadian phase position. *Chronobiology International*, 6(1), 93–102.
<https://doi.org/10.3109/07420528909059144>
- Lewy, A. J., Wehr, T. A., Goodwin, F. K., Newsome, D. A., & Markey, S. P. (1980). Light suppresses melatonin secretion in humans. *Science*, 210(4475), 1267–1269.

<https://doi.org/10.1126/science.7434030>

Lockley, S. W., Evans, E. E., Scheer, F. A. J. L., Brainard, G. C., Czeisler, C. A., & Aeschbach, D. (2006). Short-Wavelength Sensitivity for the Direct Effects of Light on Alertness, Vigilance, and the Waking Electroencephalogram in Humans. *Sleep Physiology*, 29(2), 161–168. <https://doi.org/10.5665/sleep.2894>

Logvinenko, A. D., Funt, B., Mirzaei, H., & Tokunaga, R. (2015). Rethinking colour constancy. *PLoS ONE*, 10(9), 1–29. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135029>

Madrid, J. A., & Rol, M. A. (2006). *Cronobiología básica y clínica*. Editec@ red.

Navara, K. J., & Nelson, R. J. (2007). The dark side of light at night: Physiological, epidemiological, and ecological consequences. *Journal of Pineal Research*, 43(3), 215–224. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00473.x>

Park, J. C., Moura, A. L., Raza, A. S., Rhee, D. W., Kardon, R. H., & Hood, D. C. (2011). Toward a clinical protocol for assessing rod, cone, and melanopsin contributions to the human pupil response. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 52(9), 6624–6635. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-7586>

Pauley, S. M. (2004). Lighting for the human circadian clock: Recent research indicates that lighting has become a public health issue. *Medical Hypotheses*, 63(4), 588–596. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2004.03.020>

Rea, M. S., Figueiro, M. G., Bierman, A., & Hamner, R. (2012). Modelling the spectral sensitivity of the human circadian system. *Lighting Research and Technology*, 44(4), 386–396. <https://doi.org/10.1177/1477153511430474>

Rea, M. S., Figueiro, M. G., & Bullough, J. D. (2002). Circadian photobiology: An emerging framework for lighting practice and research. *Lighting Research & Technology*, 34(3), 177–187. <https://doi.org/10.1191/1365782802lt057oa>

Reiter, R. J., Tan, D. X., Korkmaz, A., & Ma, S. (2012). Obesity and metabolic syndrome: Association with chronodisruption, sleep deprivation, and melatonin suppression. *Annals of Medicine*, 44(6), 564–577. <https://doi.org/10.3109/07853890.2011.586365>

Revell, V. L., Arendt, J., Fogg, L. F., & Skene, D. J. (2006). Alerting effects of light are sensitive to very short wavelengths. *Neuroscience Letters*, 399(1–2), 96–100. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.01.032>

- Roenneberg, T., Daan, S., & Merrow, M. (2003). The Art of Entrainment. *Journal of Biological Rhythms*, 18(3), 183–194. <https://doi.org/10.1177/0748730403253393>
- Sahin, L., & Figueiro, M. G. (2013). Alerting effects of short-wavelength (blue) and long-wavelength (red) lights in the afternoon. *Physiology and Behavior*, 116–117, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.03.014>
- Sasseville, A., Martin, J. S., Houle, J., & Hébert, M. (2015). Investigating the contribution of short wavelengths in the alerting effect of bright light. *Physiology and Behavior*, 151, 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.06.028>
- Schernhammer, E. S., Speizer, F. E., Walter, C., Hunter, D. J., & Colditz, G. A. (2001). Rotating Night Shifts and Risk of Breast Cancer in Women Participating in the Nurses ' Health Study. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(20), 1563–1568. <https://doi.org/10.1093/jnci/93.20.1563>
- Tsujimura, S. I., Ukai, K., Ohama, D., Nuruki, A., & Yunokuchi, K. (2010). Contribution of human melanopsin retinal ganglion cells to steady-state pupil responses. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1693), 2485–2492. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.0330>
- Vandewalle, G., Balteau, E., Phillips, C., Degueldre, C., Moreau, V., Sterpenich, V., ... Maquet, P. (2006). Daytime Light Exposure Dynamically Enhances Brain Responses. *Current Biology*, 16(16), 1616–1621. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.06.031>
- Voultsios, A., Kennaway, D. J., & Dawson, D. (1997). Salivary Melatonin as a Circadian Phase Marker: Validation and Comparison to Plasma Melatonin. *Journal of Biological Rhythms*, 12(5), 457–466. <https://doi.org/10.1177/074873049701200507>

3.4. CAPÍTULO EXPERIMENTAL 4:

EFFECTOS DEL CAMBIO HORARIO SOBRE LOS RITMOS CIRCADIANOS HUMANOS Y LA CURVA DE RESPUESTA DE FASE A LA LUZ

3.4. EFECTOS DEL CAMBIO HORARIO SOBRE LOS RITMOS CIRCADIANOS HUMANOS Y LA CURVA DE RESPUESTA DE FASE A LA LUZ

RESUMEN

Varios estudios han investigado la relación del cambio horario (DST) con las alteraciones del sueño, las enfermedades psiquiátricas, los problemas cardiovasculares y el comportamiento. Sin embargo, muy pocos han monitorizado a los participantes mientras mantenían su estilo de vida habitual antes y después de los cambios de hora. Teniendo en cuenta que las transiciones DST modifican el comportamiento humano y, por lo tanto, sus patrones de exposición a la luz, el objetivo de este estudio fue investigar esa relación considerando también el sueño y la curva de respuesta de fase humana a la luz. Para hacer eso, se reclutaron ocho adultos sanos para controlar su actividad, temperatura, sueño y exposición a la luz utilizando un dispositivo de monitorización circadiana ambulatoria: Kronowise®. El registro de datos comenzó una semana antes de cada transición DST y terminó una semana después. A continuación, se utilizó el software Kronoware 10.0 para obtener los siguientes parámetros: la hora central del período de tiempo de las cinco horas de máxima temperatura de la muñeca (M5) y de las cinco horas de mínimo tiempo en movimiento (L5), así como el inicio del sueño, el final del sueño, la duración del sueño y la intensidad de luz. La hora de M5 de la temperatura de la muñeca se empleó como tiempo circadiano 0 h, y las ondas medias diarias de intensidad de luz se calcularon y filtraron usando la curva de sensibilidad de secreción de melatonina a la luz. Después de eso, el equilibrio entre los avances y los retrasos de la curva de respuesta de fase a la luz se calculó individualmente antes y después de ambas transiciones DST. Para evaluar la desincronización interna, se comparó la hora de M5 de temperatura de la muñeca y L5 de tiempo en movimiento. Nuestros resultados mostraron que después de la transición de marzo no hubo diferencias significativas en los parámetros del sueño, pero después del cambio de octubre, los participantes se despertaron más de una hora más tarde que antes ($p < 0,005$, $t = -5,132$, $DF = 7$), y durmieron 1,09 horas más ($p < 0,05$, $t = -3,017$, $DF = 7$). Además, la hora de M5 tendió a avanzar después del cambio horario de marzo, a diferencia de la transición de octubre, donde la hora de M5 tendió a retrasarse en 0,42 horas, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Sobre el efecto de la exposición a la luz en la fase circadiana calculada a partir de las curvas de respuesta de fase, antes de la transición de primavera, el área bajo la curva de los avances de fase ascendió a una cantidad de 246 ± 37 (unidades arbitrarias), mientras que después del cambio de tiempo aumentaron con un total de 276 ± 42 (unidades arbitrarias) ($p = 0,6$, $t = -0,464$, $DF = 7$). Lo mismo ocurrió con los

retrasos de fase, antes del horario de verano ascendieron a 410 ± 64 (unidades arbitrarias), y luego aumentaron a 465 ± 59 (unidades arbitrarias), aunque las diferencias no fueron significativas ($p = 0,5$, $t = -0,635$, $DF = 7$). Por el contrario, durante el cambio de otoño, lo más notable fue la disminución en los avances de fase después del cambio horario en comparación con la semana anterior, de 302 ± 57 (unidades arbitrarias) a 231 ± 59 (unidades arbitrarias). Sin embargo, las diferencias no fueron significativas ($p = 0,3$, $t = 1,094$, $DF = 7$). Con respecto a la desincronización interna, el cambio de marzo produjo una desincronización más alta que la transición de octubre, especialmente a lo largo de la hora de L5 del tiempo en movimiento. Estos resultados muestran que durante ambas transiciones, la exposición a la luz de la mañana (en la zona de avance de fase) es la más influenciada por la nueva hora local, probablemente porque durante la tarde y la noche, el uso de iluminación artificial es predominante independientemente del cambio de hora. Hasta donde sabemos, éste es el primer estudio que monitoriza la exposición personal a la luz en participantes en condiciones naturales antes y después de los cambios horarios. Nuestros resultados reflejan que la transición de marzo actúa como un avance de fase y la adaptación es más difícil que la transición de octubre, ya que representa un retraso de fase, que es la tendencia natural del marcapasos central circadiano. Además, nuestros hallazgos reflejan la gran influencia de la iluminación artificial en los cambios de fase.

INTRODUCCIÓN

El cambio de hora se refiere a la práctica de adelantar los relojes una hora durante la primavera y desplazarlos hacia atrás durante el otoño. En un primer momento, fue adoptado por Alemania en 1916 y, a medida que continuó la I Guerra Mundial, el resto de Europa lo aplicó. Hoy en día, aproximadamente 1.600 millones de personas experimentan el cambio de hora (Aries & Newsham, 2008; Kantermann et al., 2007) y recientemente, ha sido un tema de debate desde que, en 2018, la Unión Europea realizó una consulta pública para modificarlo. El cambio de hora se creó originalmente para ahorrar energía al cambiar los patrones de actividad humana para hacer un mejor uso de la luz natural, reduciendo la cantidad de iluminación eléctrica necesaria durante la noche. Sin embargo, este aspecto sigue siendo controvertido, ya que el uso de energía y los patrones de comportamiento humano han cambiado considerablemente desde la primera introducción del cambio de hora (Aries & Newsham, 2008).

Por otra parte, varios estudios han investigado los efectos perjudiciales del cambio horario en la salud (Harrison, 2013). En este sentido, varios estudios encontraron una relación entre los

cambios circadianos provocados por las transiciones de hora y los eventos cardiovasculares, aunque con efectos moderados (Manfredini et al., 2018; Tarquini et al., 2019). La relación entre el horario de verano y los accidentes de tráfico también se ha estudiado con conclusiones inconsistentes (Coren, 1996; Ferguson et al., 1995; Lambe & Cummings, 2000; Varughese & Allen, 2001) y ningún efecto del cambio horario sobre enfermedades psiquiátricas (Shapiro et al., 1990). Sin embargo, pocos estudios se han centrado en los efectos del cambio de hora en el sueño, encontrando resincronización de los tiempos de vigilia después de cinco días (Monk & Folkard, 1976), después de una semana o incluso ajuste instantáneo para la hora de acostarse (Monk & Aplin, 1980), con una reducción en la duración del sueño de aproximadamente una hora después del cambio de primavera para los cronotipos matutinos y vespertinos (Lahti et al., 2006a; Lahti et al., 2006b).

Más recientemente, muy pocos estudios han monitoreado actigráficamente a sujetos sanos antes y después de cada transición, y pusieron de manifiesto un deterioro más fuerte de la calidad del ciclo de sueño / vigilia después del cambio de primavera en comparación con la transición de otoño (Tonetti et al., 2013). Sin embargo, al considerar el cronotipo sobre el efecto sobre el sueño, se descubrió que la transición de otoño era más perturbadora para los tipos matutinos y la transición de primavera para los tardíos (Kantermann et al., 2007; Lahti et al., 2008).

Es ampliamente conocido que el impacto de la luz en el sistema circadiano induce cambios de fase dependiendo del momento de exposición. Estos efectos dependientes del tiempo se integran en una curva de respuesta de fase a la luz. Una curva de respuesta de fase (PRC) representa el momento de una exposición a la luz y el cambio de fase que ésta evoca en el período de una oscilación (Minors et al., 1991), y fue establecida por primera vez por De Coursey en 1960. Según esto, se producirá un retraso de fase en nuestro sueño cuando la exposición a la luz aumente en la tarde y disminuya por la mañana con respecto a nuestro tiempo interno subjetivo, y viceversa (Meira e Cruz et al., 2019). Varias curvas de respuesta de fase han sido publicadas en bibliografía previa. Una de las más aceptadas fue desarrollada por Khalsa et al., (2003). El punto donde la PRC cambia de la zona de retraso a la zona de avance se conoce como fase circadiana 0h, y coincide aproximadamente con la hora del valor mínimo de la temperatura corporal, que generalmente ocurre a aproximadamente 2/3 del tiempo de sueño (Gooley, 2008; Khalsa et al., 2003; Krauchi & Deboer, 2010).

Por lo tanto, teniendo en cuenta que los cambios de hora modifican el comportamiento de los seres humanos, sus patrones personales de exposición a la iluminación, y, por lo tanto, el

funcionamiento del sistema circadiano, el objetivo de este estudio fue explorar los efectos de las transiciones DST en la sincronización circadiana de acuerdo con la RPC en condiciones de la vida real. Además, la grabación simultánea multivariable permite evaluar las diferencias en la sincronización entre diferentes ritmos de marcadores que podrían conducir a una cronodisrupción temporal.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Participantes

Ocho adultos sanos (4 mujeres, 4 hombres) de 33 ± 11 años de edad fueron reclutados para participar en este experimento. Ninguno de los voluntarios tomaba ningún medicamento que pudiera influir en los resultados del estudio. Se les pidió que mantuvieran su estilo de vida habitual, manteniendo el sueño lo más regular posible. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Murcia y estaba en línea con los estándares establecidos por la Declaración de Helsinki. Los participantes dieron su consentimiento informado por escrito antes de participar y completaron la versión corta del Cuestionario del Cronotipo de Munich para evaluar su preferencia matutina o vespertina (Roenneberg et al., 2003).

2. Dispositivo de monitoreo circadiano ambulatorio (ACM)

Para llevar a cabo este estudio, y como en capítulos anteriores, se utilizó Kronowise® (Kronohealth SL, Murcia, España). Es un dispositivo de pulsera, con un peso de aproximadamente 60 gramos, batería de hasta 10 días y almacenamiento de datos de hasta 3 semanas, permitiendo la extracción de datos a través de una conexión USB. Incluye varios sensores (Madrid-Navarro et al., 2018):

- Un sensor de temperatura, con una precisión de ± 0.1 ° C a 25 ° C y una resolución de 0.0635 ° C.
- Un acelerómetro MEMS calibrado triaxial con una sensibilidad lineal e igual a lo largo de los tres ejes, con un rango de ± 2 gy una sensibilidad de 0.001 g. La frecuencia de muestreo predeterminada se estableció en 10 Hz.
- Tres sensores de luz (Arguelles-Prieto et al., 2019) para determinar el espectro completo, la luz infrarroja y la luz azul, con un rango de entre 0.01 y 43,000 lux, 16 bits de resolución y supresión de parpadeo a 50/60 Hz. El sensor infrarrojo es sensible a la radiación de 800 a 1070 nm, mientras que el detector de luz azul está equipado con un

filtro gaussiano, que elimina toda la radiación visible por debajo de 440 y más de 500 nm, pero deja pasar la radiación infrarroja. El tiempo de integración para las mediciones se puede configurar a 50 ms, 100 ms y 400 ms.

La comunicación con una computadora se estableció mediante el software Kronoware 10.0 (Kronohealth SL, Murcia, España) a través un puerto USB. Este software permite la inspección visual de los datos para eliminar posibles artefactos y el cálculo de los parámetros básicos circadianos y de sueño.

3. Registros de monitorización circadiana ambulatoria (ACM)

Los participantes llevaron Kronoware® entre cuatro días antes y una semana después del cambio de marzo, y una semana antes y una semana después del cambio de octubre. Se les indicó que se lo quitaran solo por razones de higiene o para recargar la batería. El registro se dividió en dos partes a la hora exacta de los cambios de hora (2 PM en marzo y 3 PM en octubre), y cada una de ellas se analizó por separado. La hora local no se modificó en las grabaciones antes y después de las transiciones DST para permitir la comparación entre ellas. Para ambas situaciones, Kronoware 10.0 (Kronohealth SL, Murcia, España) proporcionó directamente las horas de inicio y final del sueño, duración del sueño, L5 y M5, utilizando algoritmos descritos anteriormente (Ortiz-Tudela et al., 2010).

4. Cálculos

Un resumen de los cálculos realizados en este estudio se representa en la Figura 1. Los datos brutos de ACM se procesan y analizan para obtener parámetros circadianos y exposición promedio a la luz. Después de eso, la sensibilidad circadiana a la luz se estima mediante la curva de respuesta de fase de melatonina (Zeitzer et al., 2000) y la exposición individual a la luz, y finalmente, la curva de respuesta de fase (Khalsa et al., 2003) a la luz se aplica para obtener las respuesta de fase circadiana a la luz personal.

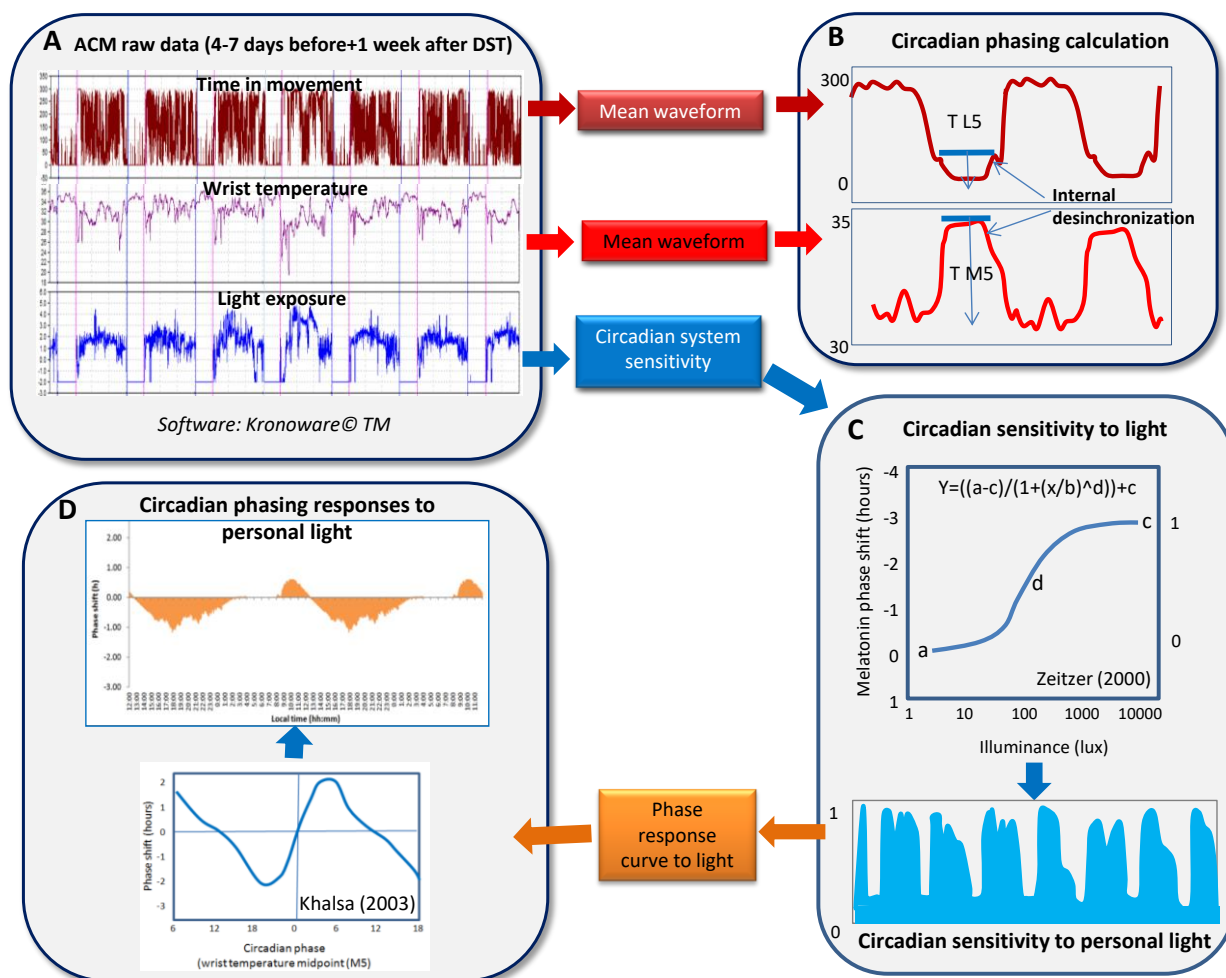


Figura 1. Esquema de los cálculos realizados para este estudio con el fin de analizar la exposición a la luz y los parámetros circadianos y obtener las curvas de respuesta de fase. Una vez que se descargan los datos brutos del dispositivo ACM (A), el software Kronoware © calcula las ondas medias para la temperatura de la muñeca, el tiempo en movimiento y la exposición a la luz y sus parámetros circadianos básicos, incluido la hora de L5 y M5. Por otro lado, se analizan los datos de exposición a la luz y se aplica la curva de respuesta de fase de melatonina (Zeitler et al., 2000) para delimitar la sensibilidad circadiana a la luz considerando la intensidad. Luego, se aplica la curva de respuesta de fase a la luz (Khalsa et al., 2003) para obtener la respuesta de fase circadiana a la luz personalizada

Para ello en primer lugar, se realizaron comparaciones de los parámetros de sueño promedio (inicio del sueño, final del sueño y duración del sueño) antes y después de cada cambio de hora. Luego, se analizaron los datos de exposición a la luz. Primero, se calculó la exposición media a la luz cada 30 segundos en unidades logarítmicas y se comparó la situación antes y después de cada cambio de hora. Después, se calculó la onda media de 24 h, cada 10 minutos, en unidades logarítmicas, tanto antes como después del cambio de hora en marzo y octubre.

La hora local de la exposición a la luz de los participantes no se modificó después de las transiciones. Para comparar estos datos con la luz solar, la intensidad media diaria de las ondas medias de luz solar en Murcia (España) durante marzo y octubre antes y después de los cambios de hora también se calculó a partir de los datos proporcionados por “Solcast API,” (2019).

Tradicionalmente, la fase circadiana 0 h se ha establecido al mínimo de la temperatura corporal central (CBT). Dado que la CBT y la temperatura distal de la piel siguen patrones opuestos (Krauchi & Deboer, 2010; Sarabia et al., 2008), la fase circadiana 0 h se estableció en la hora de M5 de la temperatura de la muñeca, es decir, la hora central del período de 5 horas consecutivas de máxima temperatura (Witting et al., 1990). Este parámetro es proporcionado por el software Kronoware (Kronohealth SL, Murcia, España) a partir de los registros de Kronowise® y se comparó antes y después de cada transición.

Para calcular las curvas de respuesta de fase sin perder información de exposición a la luz, la onda media de luz cada 30 segundos también se calculó en unidades logarítmicas. Después, el modelo logístico de 4 parámetros de la curva de respuesta de fase de la melatonina según la intensidad de la luz (Zeitzer, Dijk, Kronauer, Brown, & Czeisler, 2000) se aplicó a la onda media de luz como una forma de delimitar la sensibilidad del sistema circadiano a la luz. A continuación, la PRC de Khalsa et al., (2003) se aplicó a esta exposición a la luz, centrando la fase circadiana 0h en la hora de M5 de la temperatura de la muñeca de cada participante, de modo que se obtuvieron zonas de retraso y avance individuales, y luego, se calculó la PRC promedio antes y después de ambos cambios horarios. Para facilitar las comparaciones antes y después de los cambios de hora, no se modificó la hora local de los datos de los registros de los participantes. Para estimar la cantidad de zonas de retraso y avance, también se calculó el área bajo la curva (AUC) de cada una de ellas. Para comparar la PRC de los participantes con el patrón solar, se realizó el mismo proceso con la intensidad de la luz solar antes y después de los cambios de hora, centrando también la fase circadiana 0h de la PRC en la hora de M5 de la temperatura de la muñeca de cada participante, y calculando el promedio para cada situación.

Dado que nuestros participantes no fueron reclutados para este estudio dependiendo de su cronotipo, se calculó una simulación teórica de la PRC de luz solar para diferentes cronotipos usando la escala de Munich (Roenneberg et al., 2003). Para eso, la hora circadiana 0 h de cada PRC se cambió de acuerdo con cada puntuación de Munich del 1 al 7 para simular un gradiente de los cronotipos del matutino al vespertino. Luego, se calculó el AUC en cada situación (antes y después de cada cambio de hora) y la diferencia entre los avances y los cambios de fase.

El siguiente paso fue examinar la posible desincronización interna mediante la evaluación de la relación de fase diaria de los ritmos de tiempo en movimiento y temperatura de la muñeca (Ortiz-Tudela et al., 2016). Para ello, la hora de L5 del tiempo en movimiento, es decir, la media del período de 5 horas con los valores mínimos de actividad (Witting et al., 1990), se comparó con la hora del M5 de temperatura de la muñeca para cada participante y para cada día después de los cambios de hora. Estos dos parámetros fueron proporcionados directamente por el software Kronoware (Kronohealth SL, Murcia, España). Ambos parámetros se compararon con sus respectivos parámetros promedio de los días previos a las transiciones.

5. Análisis estadístico

Se realizaron pruebas t de Student de muestras relacionadas para comparar la hora de M5 de temperatura de la muñeca antes y después de las transiciones. Las pruebas t de Student para muestras relacionadas también se aplicaron para comparar los parámetros del sueño antes y después de las transiciones. Pruebas ANOVA de medidas repetidas con comparaciones post-hoc de Bonferroni y tipo de luz y fase como factores inter-sujeto se realizaron para comparar antes y después de ambas situaciones. Se realizaron correlaciones entre los avances y los retrasos de fase en todas las condiciones, y el cronotipo de Munich. La comparación entre la hora de M5 para la temperatura de la muñeca y la hora de L5 para el tiempo en movimiento durante los días posteriores al cambio se realizó mediante una prueba ANOVA de medidas repetidas, con comparaciones post-hoc de Bonferroni. Todas las pruebas estadísticas se realizaron con SPSS Statistics para Windows, versión 23.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, EE. UU.).

RESULTADOS

La exposición media a la luz personal antes y después del cambio de marzo se representa en la Figura 2, con valores altos durante el día y bajos durante la noche, como era de esperar. Después del cambio de primavera, la luz se encendió varias veces durante varios días durante la noche. La exposición personal a la luz para la transición de otoño se muestra en la Figura 3. En este caso, se puede apreciar más claramente que los participantes tendieron a encender y apagar las luces más tarde en comparación con la semana anterior al cambio de horario.

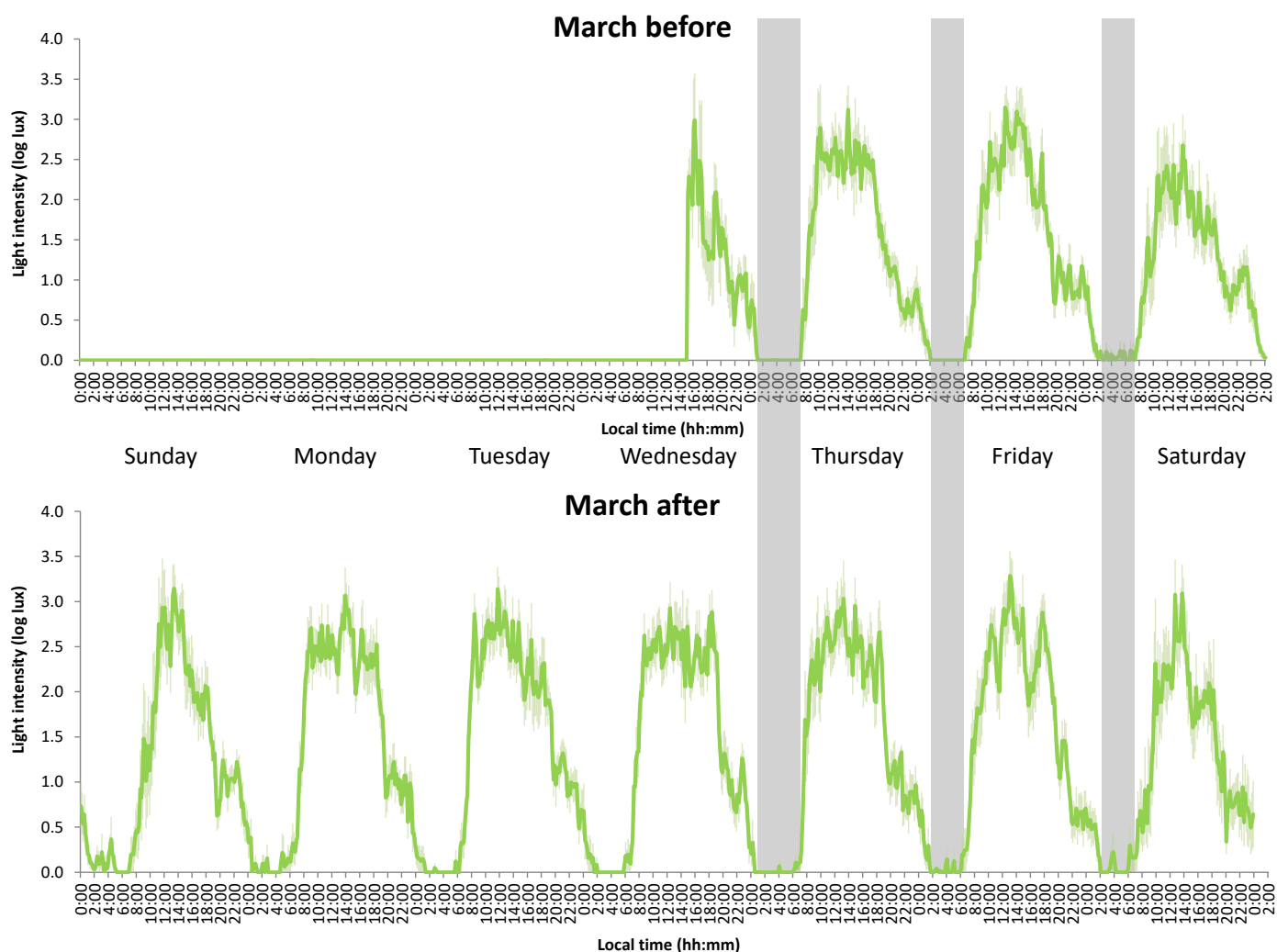


Figura 2. Exposición diaria media a la luz en unidades log lux ($\pm$ SEM) para todos los participantes ($n = 8$) antes y después de la transición de marzo. Las bandas grises indican el período de oscuridad para cada día de la semana antes del cambio. La hora local no se modificó en la semana posterior al horario de verano para facilitar las comparaciones.

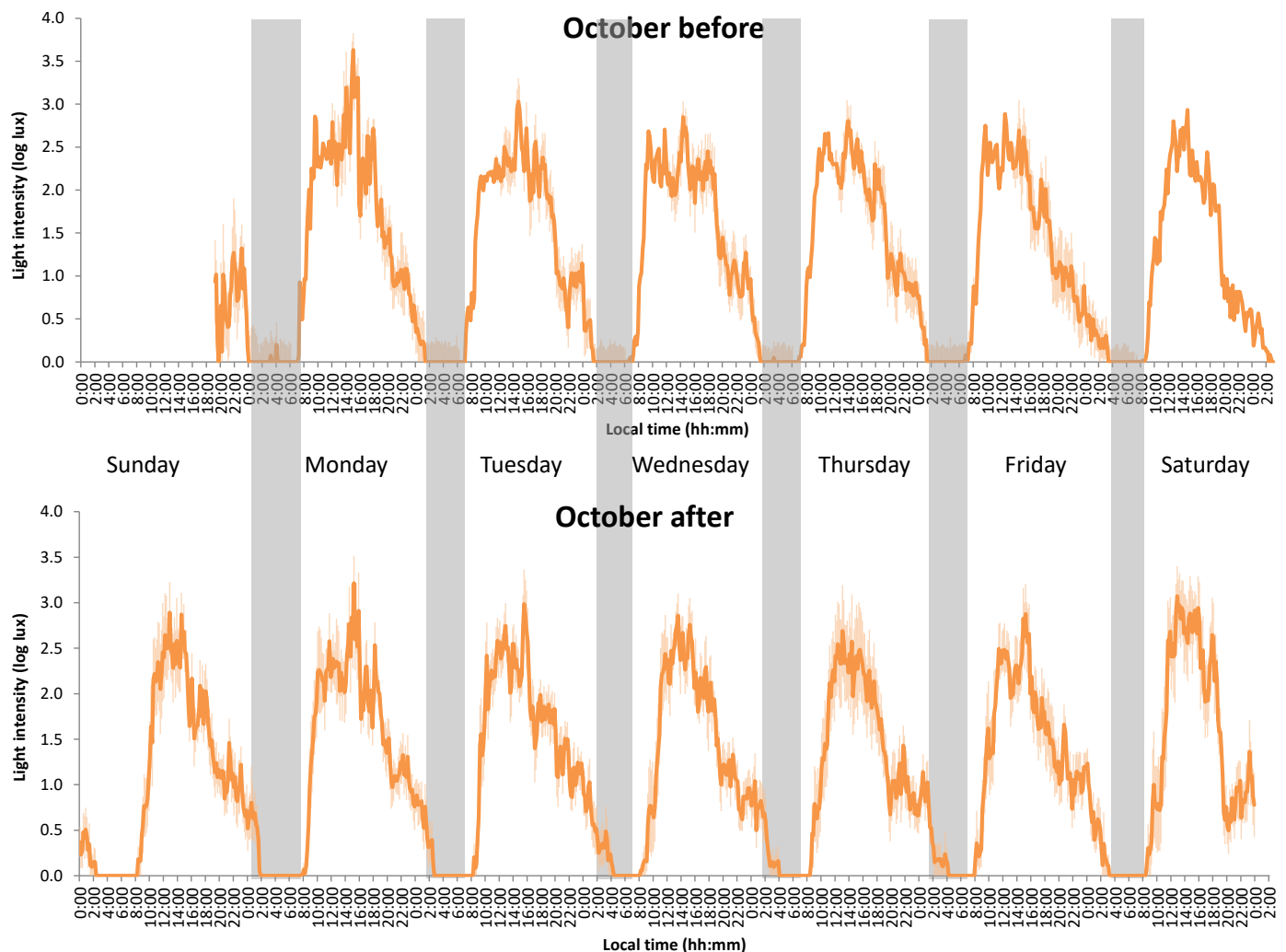


Figura 3. Exposición diaria media a la luz en unidades log lux ($\pm$ SEM) para todos los participantes ($n = 8$) antes y después de la transición de octubre. Las bandas grises indican el período de oscuridad para cada día de la semana antes del cambio. La hora local no se modificó en la semana posterior al cambio para facilitar las comparaciones.

La Figura 4 muestra la onda media de la exposición personal a la luz, incluida la luz solar antes y después de las transiciones de marzo (A) y octubre (B), así como los horarios promedio de sueño en todas las situaciones. Como se puede observar, la duración del sueño antes y después de la transición del horario de verano de marzo no fue significativamente diferente ($p = 0,3$, $t = 0,969$, $DF = 7$), al igual que la hora de inicio del sueño ($p = 0,6$, $t = 0,491$, $DF = 7$) y la hora del final del sueño ($p = 0,6$, $t = -0,407$, $DF = 7$). Sin embargo, en octubre, el inicio del sueño tendió a ocurrir más tarde que antes del cambio de hora, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p = 0,1$, $t = -1,699$, $DF = 7$). No obstante, en octubre, en el caso del final del sueño, los participantes se despertaron a las 7,59 h antes del cambio de

horario y a las 9,27 h después de la transición en promedio ($p < 0,005$, $t = -5,132$, $DF = 7$). Lo mismo ocurrió con la duración del sueño, ya que los participantes dormían más después del cambio horario que antes (6,67 horas antes del horario de verano y 7,76 horas después del horario de verano, $p < 0,05$, $t = -3,017$, $DF = 7$). Sobre la exposición a la luz, en general, durante la transición de marzo, los participantes tendían a exponerse a intensidades de luz similares antes y después del cambio de horario, aunque el patrón de luz se desplazó hacia la derecha. Sin embargo, en octubre, después de la transición, las personas tendieron a exponerse a la luz más tarde durante las mañanas en comparación con la situación antes del cambio.

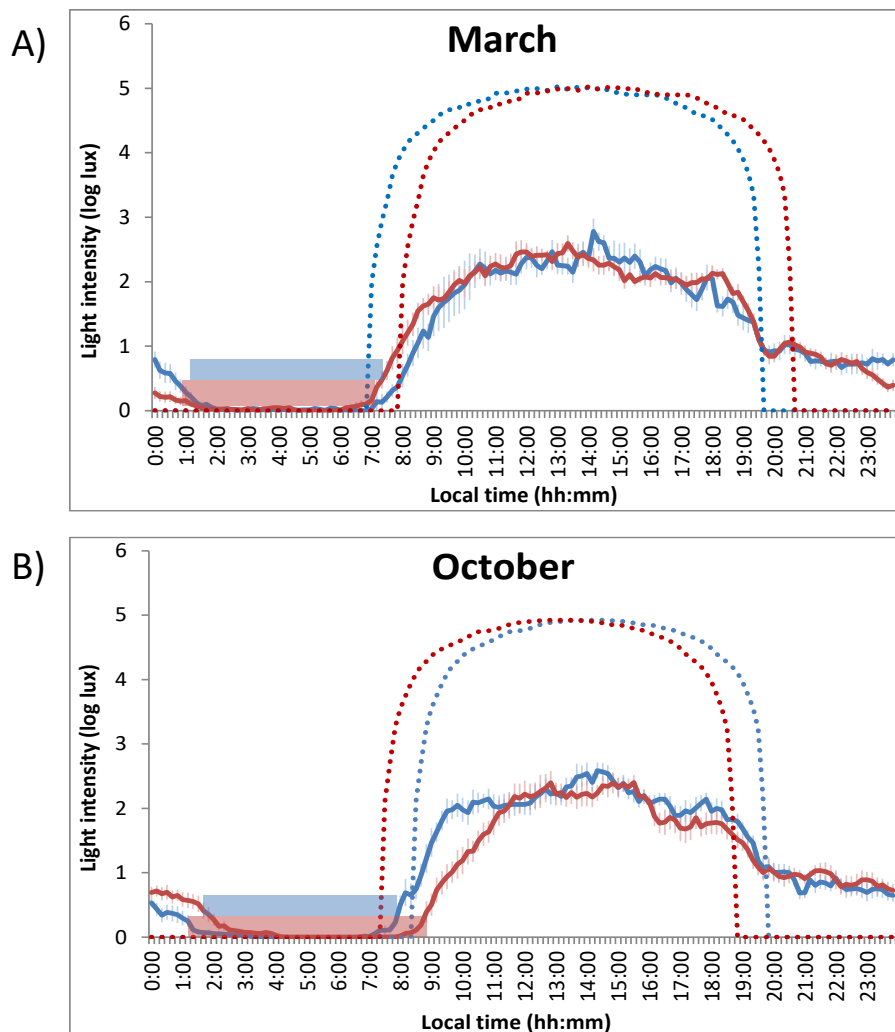


Figura 4. Ondas medias de 24 horas de exposición a la luz de los participantes ($n = 8$) y luz solar en el mismo período antes y después de cada transición en unidades log lux. A) para marzo y B) para octubre. Las líneas azules indican la exposición a la luz de los participantes antes del cambio de hora y las líneas rojas después del cambio de hora. Las líneas punteadas representan la intensidad de la luz solar, y las barras horizontales indican el período de sueño promedio ($n = 8$) antes de las transiciones (azul) y después (rojo). Los datos se expresan como media $\pm$ SEM.

El balance entre los avances de fase y los retrasos según el cronotipo para el cambio de marzo se representa en la Figura 5. Como se puede observar, antes del cambio de marzo, el equilibrio entre los avances de fase y los retrasos se produjo aproximadamente a las 4:00 h. Por lo tanto, las personas matutinas, cuando solo están expuestas a la luz del sol, retrasarían su reloj, mientras que las personas vespertinas avanzarían su sistema circadiano. Después del horario de verano, el equilibrio se retrasó a las 5:00 h, haciendo que este cambio de horario sea aún más difícil para los matutinos en caso de que solo estuvieran expuestos a la luz solar.

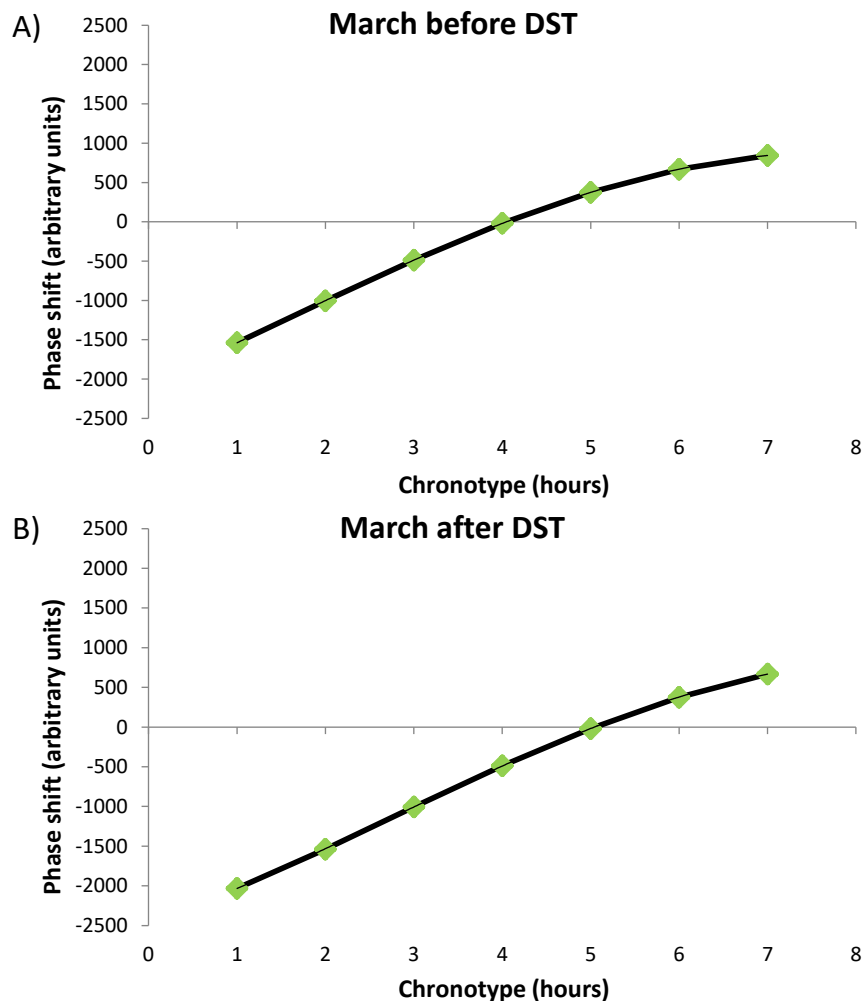


Figura 5. Modelo de cambios de fase de acuerdo con la curva de respuesta de fase (Khalsa et al., 2003) ($n = 8$) a la luz natural antes (A) y después (B) del cambio de primavera, según el cronotipo (MCTQ). Ver la sección de materiales y métodos para más detalles.

Para personalizar la curva de respuesta de fase a la luz, se usó la hora de M5 de temperatura de la muñeca (WT) como fase circadiana 0h. Antes de la transición de marzo, el M5 apareció a las $4,43 \pm 0,48$ h (media $\pm$ SEM), sin embargo, durante la semana posterior, se adelantó hasta las $4,11 \pm 0,37$ h (media $\pm$ SEM). Lo contrario ocurrió durante el cambio de otoño, la hora de

M5 fue de $4,94 \pm 0,25$ h (media $\pm$ SEM) pero después del cambio, se retrasó hasta las $5,36 \pm 0,43$ h (media $\pm$ SEM). Sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Con respecto al impacto de la exposición personal a la luz considerando la curva de respuesta de fase a la luz, en marzo (Figura 6), como se puede observar, antes del cambio de hora (Figura 6A), los sujetos comenzaron la exposición a la luz aproximadamente a las 8:00 h, cuando la luz solar inducía su máximo avance de fase. Durante la mañana, el avance de fase máximo alcanzado por los participantes fue de aproximadamente 0,60 horas. Sin embargo, durante las tardes, los retrasos de fase no fueron superiores a 0,45 horas, pero después de la puesta del sol (aproximadamente a las 19:30 h), la exposición de los participantes a la luz en la zona de retraso de fase continuó hasta la 1:00 h. Según la PRC de la luz solar, si no hubiera influencia de la iluminación artificial, los avances de fase alcanzarían un máximo de aproximadamente 1,45 horas y los retrasos de fase de aproximadamente 1,80 horas. Por otro lado, después de la transición de marzo (Figura 6B), la intensidad de la luz durante la mañana produjo avances de fase similares a los de antes, pero en este caso, la exposición a la luz artificial comenzó una hora antes (7:00 h), ya que el sol aún no había salido. Con respecto a los retrasos de fase, ocurría algo similar a la situación anterior, con exposición a la luz en la zona de retraso de fase después del atardecer, pero en este caso, los retrasos de fase alcanzaron un máximo de casi 1 hora y las luces se apagaron antes de las 00:00 h.

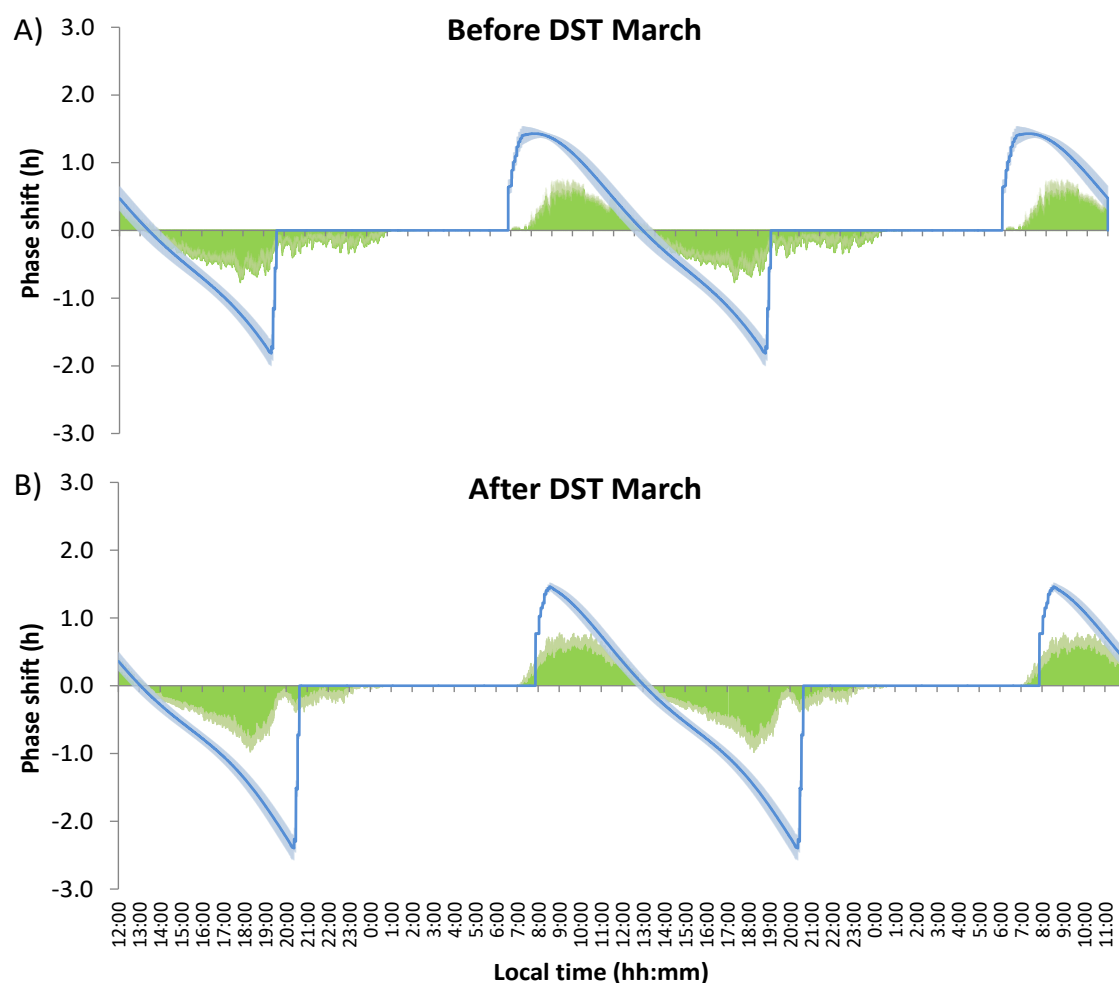


Figura 6. Áreas medias bajo la curva del avance y retraso de fase ($n = 8$) en unidades arbitrarias antes (A) y después (B) de la transición del horario de verano (DST) de marzo en función de la exposición personal a la luz (en verde) o personal luz solar (en azul) centrando la fase circadiana 0 h en la hora de M5 de la temperatura de la muñeca de cada participante. Ver la sección de materiales y métodos para más detalles. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM.

La cantidad acumulada de luz recibida en la zona de avance o retraso de fase se puede observar más claramente en la Figura 7. Globalmente, el tipo de luz (personal o solar) y el cambio de fase (avance o retraso) arrojaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$, $F = 46,186$, $DF = 1$ para luz personal vs. luz solar, y $p < 0,01$, $F = 8,748$, $DF = 1$ para avances vs. retrasos). Antes de la transición al horario de verano, el área bajo la curva en la zona de avance de fase de la PRC de los participantes era mucho más baja que en la PRC de la luz del sol (246 ± 37 unidades arbitrarias vs. 750 ± 70 , respectivamente; $p < 0,001$, $F = 26,202$, $DF = 1$), pero esta diferencia no fue tan marcada para el retraso de fase en la PRC de los participantes frente a la PRC solar (410 ± 64 unidades arb. Frente a 535 ± 6 unidades arb., respectivamente; $p < 0,05$, $F = 6,287$, $DF = 1$).

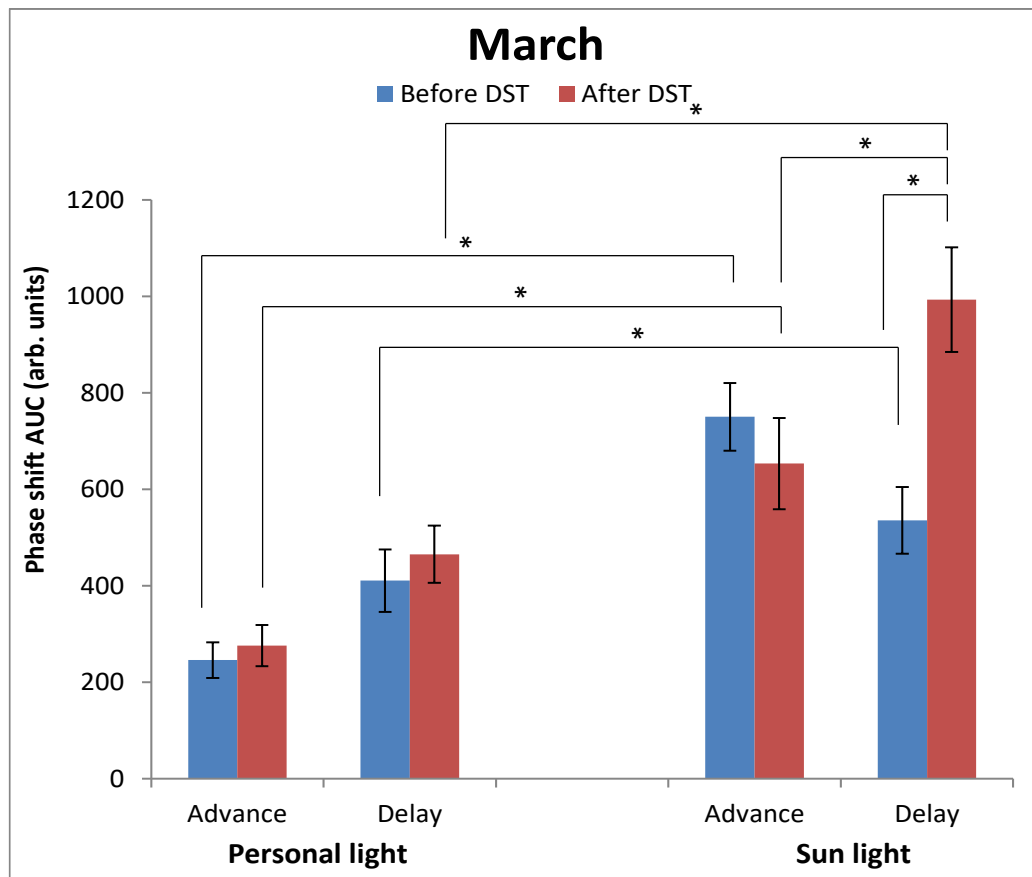


Figura 7. Cambio de fase promedio acumulado (avances o retrasos) de acuerdo con la curva de respuesta de fase (Khalsa et al., 2003) ($n = 8$) a la luz antes (azul) y después (rojo) de la transición del horario de verano centrando la fase circadiana 0h a la hora de M5 de la temperatura de la muñeca de cada participante ($n = 8$), ya sea para luz personal o luz solar. Los datos se expresan como área media debajo de la curva $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ (medidas repetidas ANOVA, Bonferroni comparaciones post hoc).

Después del cambio de hora, las diferencias en los avances de fase entre la luz personal y la luz solar disminuyeron ligeramente (276 ± 42 unidades arb. para luz personal frente a 653 ± 94 unidades arb. para luz solar) pero aun así fueron significativas ($p < 0,05$, $F = 5,173$, $DF = 1$). Acerca de los retrasos de fase después del cambio, para la luz solar casi duplicaron los de la luz personal (993 ± 108 vs 465 ± 59 unidades arb., respectivamente, $p = 0,001$, $F = 14,935$, $DF = 1$). Después del cambio, un aumento de los retrasos de fase en comparación con los avances de fase para la luz solar también fue estadísticamente significativo ($p < 0,05$, $F = 10,551$, $DF = 1$). Además, para la luz solar, los retrasos de fase aumentaron después del cambio de primavera en comparación con antes ($p < 0,05$, $F = 5,462$).

En cuanto a cuándo se produce el equilibrio entre los avances de fase y los retrasos, dependiendo del cronotipo para el cambio de octubre (Figura 8), si los participantes solo se expusieran a la luz natural, la transición del horario de verano sería más fácil para los tipos

matutinos que para los vespertinos, ya que el tiempo de equilibrio avanza de casi 5:00 a casi 4:00 h.

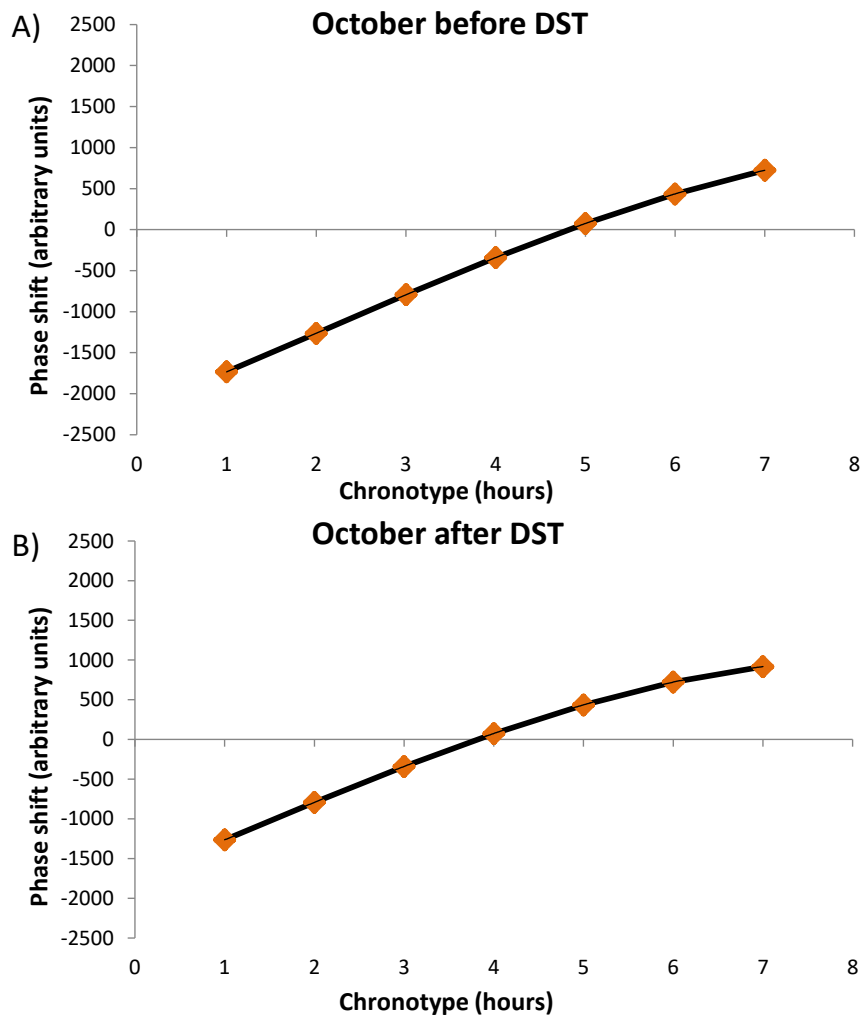


Figura 8. Modelado de los cambios de fase de acuerdo con la curva de respuesta de fase (Khalsa et al., 2003) ($n = 8$) a la luz natural antes (A) y después (B) de la transición del horario de verano según el cronotipo (MCTQ). Vea la sección de materiales y métodos para más detalles.

En cuanto a las curvas de respuesta de fase a la luz en octubre (Figura 9), ocurrió lo contrario que en marzo. Antes de la transición (Figura 9A), los sujetos comenzaron la exposición a la luz a las 8:00 h, un poco antes del amanecer, alcanzando avances de fase máximos de aproximadamente 0,80 horas y retrasos de fase de 0,50 horas. La puesta de sol ocurrió aproximadamente a las 19:30 h, pero la exposición de los participantes a la luz en la zona de retraso de fase continuó, ya que las luces se apagaron a la 1:00 h. Por el contrario, después de la transición DST (Figura 9B), la exposición a la luz comenzó casi a las 9:00 h, alcanzando un avance máximo de aproximadamente 0,70 y un retraso máximo de aproximadamente 0,40 h.

Según la PRC de la luz solar, el sol saldría a las 7:30 h y se pondría a las 19:00 h, pero la exposición a la luz de los participantes duró hasta las 2:00 h (sin cambiar la hora local).

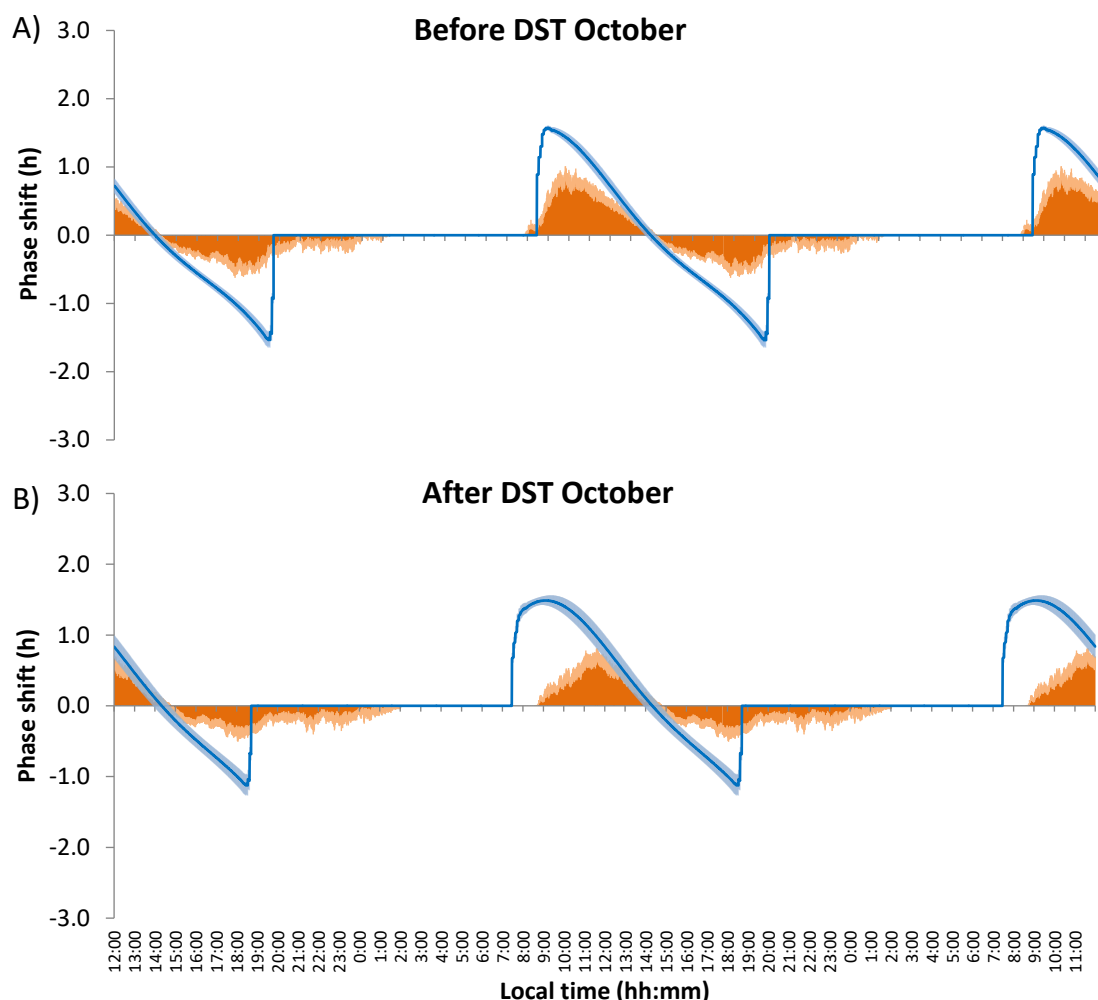


Figura 9. Áreas medias bajo la curva del avance y retraso de fase ($n = 8$) en unidades arbitrarias antes (A) y después (B) del cambio horario de octubre en función de la exposición personal a la luz (en verde) o personal luz solar (en azul) centrando la fase circadiana 0 h en la hora de M5 de la temperatura de la muñeca de cada participante. Ver la sección de materiales y métodos para más detalles. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM.

La Figura 10 muestra los valores acumulativos de avance de fase y retraso de fase antes y después de la transición de octubre. Globalmente, los cambios de luz solar fueron mayores que los generados por la luz personal ($p < 0,001$, $F = 37,418$, $DF = 1$) y los avances de fase más altos que los retrasos ($p < 0,05$, $F = 6,241$, $DF = 1$). El avance de fase antes del cambio fue mayor para la luz solar que para el personal ($p < 0,001$, $F = 19,736$, $DF = 1$), y lo mismo ocurrió después del cambio ($p < 0,001$, $F = 35,881$, $DF = 1$). Con respecto al retraso de fase, antes de la transición, también fue mayor para la luz solar que para la luz personal (533 ± 54 vs. 326 ± 37 ,

$p < 0,01$, $F = 8,382$, $DF = 1$), pero las diferencias después desaparecieron. Después del cambio de otoño, los avances generados por la luz solar fueron mucho más altos que los retrasos ($p < 0,001$, $F = 24,376$, $DF = 1$), y en comparación con antes, también aumentaron ($p < 0,05$, $F = 7,029$, $DF = 1$) mientras que los retrasos disminuyeron ($p < 0,05$, $F = 5,840$, $DF = 1$).

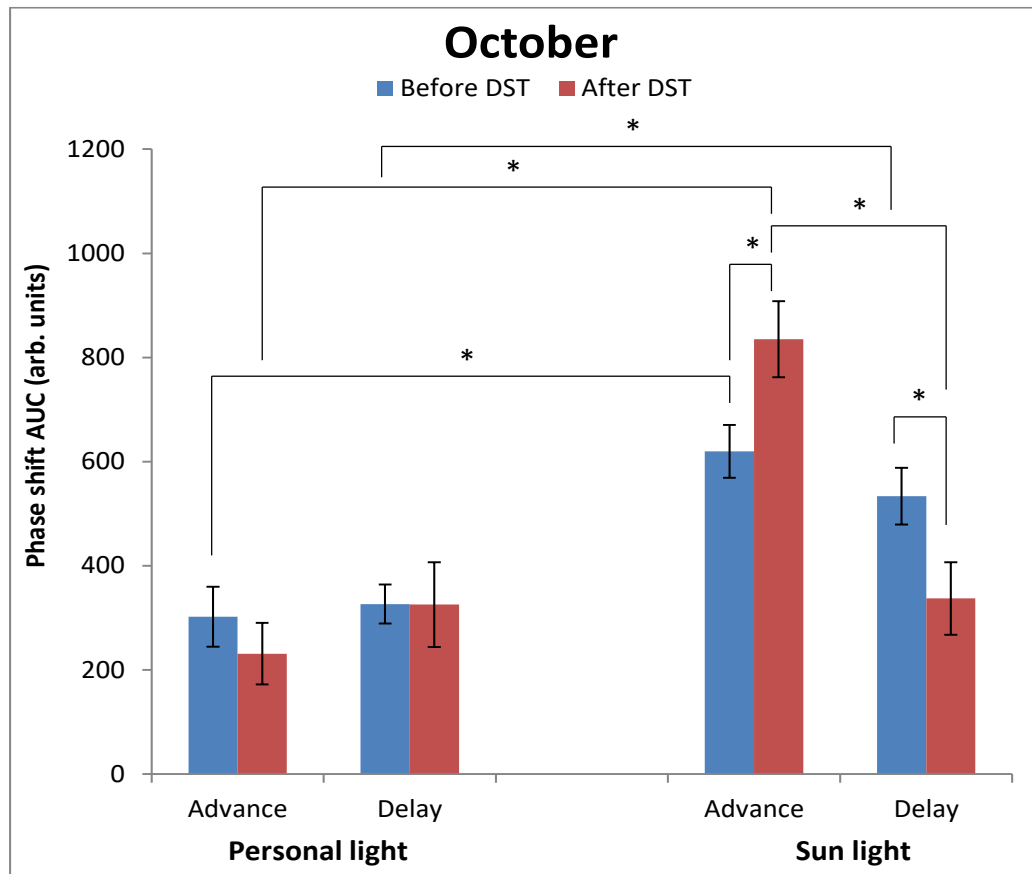


Figura 10. Desplazamiento de fase promedio acumulado (avances o retrasos) de acuerdo con la curva de respuesta de fase (Khalsa et al., 2003) ($n = 8$) a la luz antes (azul) y después (rojo) transición del horario de verano de octubre centrando la fase circadiana 0h a tiempo de M5 de la temperatura de la muñeca de cada participante ($n = 8$), ya sea para luz personal o luz solar. Los datos se expresan como área media debajo de la curva $\pm$ SEM. * indica $p < 0.05$ (medidas repetidas ANOVA, comparaciones post hoc de Bonferroni).

Para determinar la magnitud de la desincronización interna en el sistema circadiano, se utilizaron dos marcadores circadianos de dos variables complementarias (temperatura de la piel y actividad motora) (Figura 11).

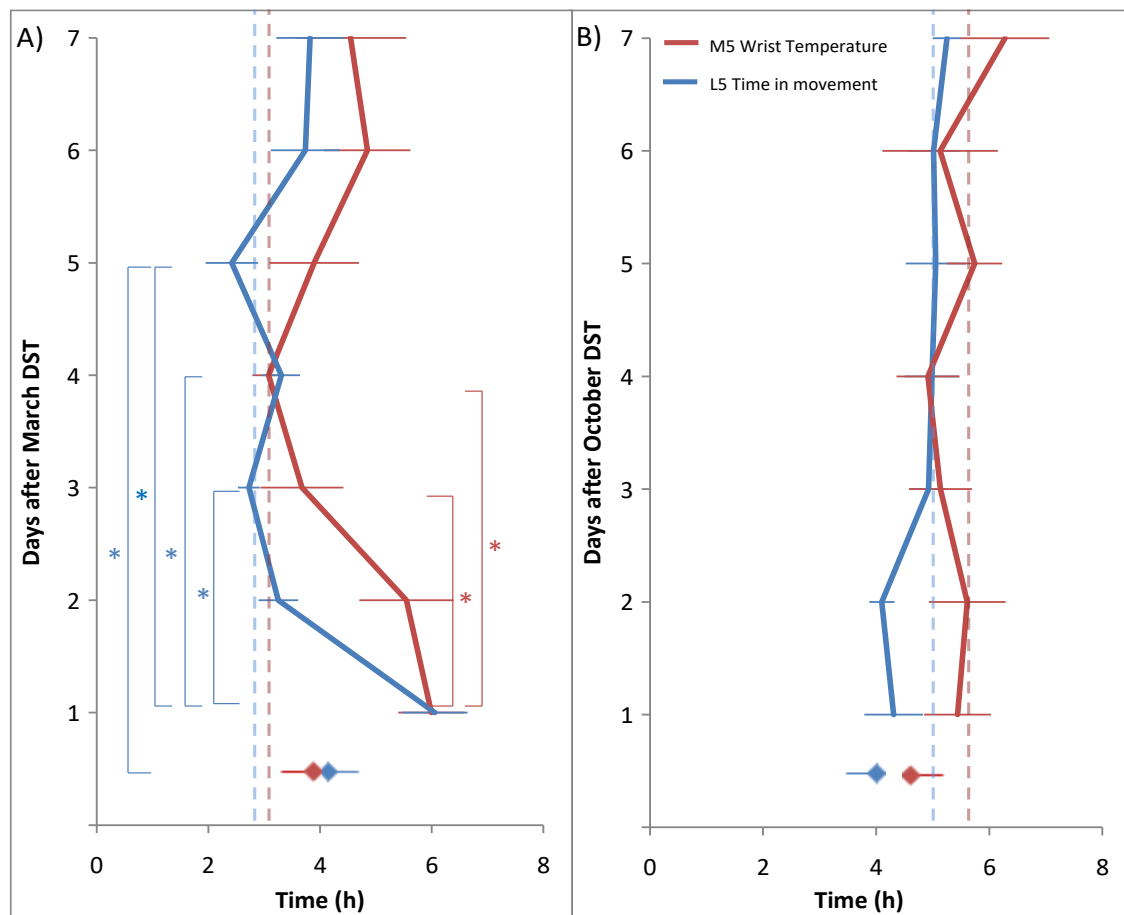


Figura 11. Hora de M5 para la temperatura de la muñeca (n = 8; línea roja) y L5 para el tiempo en movimiento (n = 8; línea azul) después de la transición al horario de verano (A) y después de la transición al horario de invierno (B). Como referencia, el tiempo promedio de M5 para la temperatura de la muñeca (punto rojo) y L5 para el tiempo en movimiento (punto azul) de los días previos a las transiciones está incluido. Las líneas punteadas indican el objetivo del tiempo a alcanzar después de las transiciones para ambas variables. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM. * indica $p < 0,05$ (medidas repetidas ANOVA, comparación post-hoc de Bonferroni).

Después de la transición de primavera, especialmente, durante los primeros días, parece surgir un aumento en la desincronización. En marzo, la hora de L5 para el tiempo en movimiento cambia después de la transición. Inicialmente, parece ocurrir un retraso, pero 5 días después del horario de verano, el L5 avanza con respecto al punto de referencia (promedio de los días anteriores; $p < 0,05$, $F = -2,063$, $DF = 7$) mientras que el primer día después de la transición se retrasa en comparación con los días 3, 4 y 5 ($p < 0,005$, $F = 3,369$ vs. día 3, $p < 0,05$, $F = 2,833$ vs. día 4, y $p < 0,01$, $F = 3,075$ vs. día 5, $DF = 7$ en todos los casos). El ritmo de temperatura también se retrasa inicialmente y progresivamente avanza desde el primer día hasta el tercero ($p < 0,05$, $F = 3,140$, $DF = 7$) y cuarto ($p < 0,05$, $F = 3,183$, $DF = 7$) después de la transición de primavera, pero se debe observar como hay una tendencia posterior al retraso en los días 6 y 7. Las

diferencias en el cambio entre L5 y M5 generan una desincronización interna que no parece estar presente durante el cambio de horario de otoño, ya que ambos parámetros permanecieron juntos y a la misma hora más que durante el cambio de marzo (la leve desalineación durante los primeros dos primeros días después del cambio no alcanzó significación estadística).

DISCUSIÓN

A menudo, se ha sugerido que la adaptación a un DST es similar a la adaptación a un vuelo transmeridiano que implica un cambio de hora de una hora, siendo el comienzo del horario de verano similar a un viaje hacia el este y el final del como un viaje hacia el oeste (Klein et al., 1972), sin embargo, la situación es muy diferente. Cuando viajamos una hora hacia el este, nuestro tiempo interno debe experimentar un avance de una hora y el sol también sale una hora antes, mientras que después de la transición al horario de verano tenemos que avanzar una hora nuestra fase, mientras que el sol continúa saliendo al mismo tiempo. Este efecto hace que una sincronización rápida, que sería deseable, resulte mucho más difícil de lograr. Del mismo modo, el cambio de hora en octubre implica un retraso de fase de una hora, mientras que el sol continúa saliendo a la misma hora solar. Este hecho difiere de un viaje al oeste porque hacia el oeste el sol sale más tarde, lo que acompaña al retraso interno de la fase circadiana. Además de recibir señales de luz natural en conflicto con nuestro proceso de resincronización, debemos tener en cuenta que el marcapasos central circadiano tiene una tendencia natural a retrasar su fase (Czeisler et al., 1999), por lo tanto, parece obvio que el cambio de horario de octubre sería menos perjudicial, y la adaptación a él sería más fácil que la transición de marzo. Según estudios previos (Monk & Aplin, 1980; Monk & Folkard, 1976) y a nuestros resultados, esta suposición parece ser cierta, ya que la hora de M5 de temperatura distal de la piel, de hecho, ocurrió más tarde después de la transición de octubre y más temprano después del cambio de marzo.

Centrándonos en la transición de marzo, el inicio del sueño, el final del sueño y la duración del sueño no arrojaron diferencias después del cambio de primavera en comparación con la situación de antes. Estos resultados concuerdan con los de Nicholson & Stone (1978) y los de Lahti et al., (2008) que no encontró ningún efecto significativo en la eficiencia del sueño durante el cambio de primavera, aunque otros autores (Lahti et al., 2006b) encontraron una reducción en la duración del sueño. Este desajuste podría deberse al hecho de que nuestros participantes ya dormían un número muy reducido de horas antes del horario de verano, por lo que las diferencias con la situación posterior serían más difíciles de encontrar. Por otro lado,

después del cambio de octubre, los participantes durmieron más y su inicio y final de sueño ocurrieron más tarde en promedio que antes. Estos hallazgos están en la misma línea que los encontrados por Barnes & Wagner (2009) que encontraron una tendencia del retraso de fase a aumentar la duración del sueño en 12.4 minutos más que los días sin cambio de fase. Más recientemente, Tonetti et al. (2013) realizaron un estudio actigráfico para explorar los efectos de la transición dentro y fuera del horario de verano en la calidad del ciclo de sueño / vigilia, y descubrieron que el sistema circadiano humano se ajusta más fácilmente al cambio de otoño que al de primavera. Como estudios previos han demostrado que la adaptación a las transiciones DST depende del cronotipo (Lahti et al., 2008; Lahti et al., 2006a; Lahti et al., 2006b), nuestro estudio posee una limitación, ya que nuestros participantes eran principalmente cronotipos indefinidos y tardíos. Para contrarrestar esta limitación, se realizó una simulación de lo que ocurriría si los participantes de diferentes cronotipos (desde muy matutinos hasta muy vespertinos) se expusieran solo a la luz del sol. Nuestros resultados arrojaron que la transición al horario de verano sería más difícil para los cronotipos matutinos ya que la luz del sol los obligaría a retrasar sus relojes una hora. Y sucedió lo contrario durante el cambio de horario de otoño, donde los cronotipos matutinos tendrían que adelantar sus relojes una hora. Estos resultados no están en línea con los descritos por Lahti et al. (2008) and Lahti et al., (2006b). Pero esta contradicción podría explicarse por la considerable influencia de la iluminación artificial, que no se ha considerado en nuestras simulaciones. Sobre las ondas medias de exposición a la luz, teniendo en cuenta que el tiempo de exposición de la luz de los participantes no cambió después de cambio horario, durante ambas transiciones, los niveles de intensidad de la luz fueron similares y se mantuvieron varias horas después del atardecer, aunque en octubre, antes del cambio de horario, hubo más horas de luz, lo cual tiene sentido porque corresponde al horario de verano.

Con respecto a las curvas de respuesta de fase, hasta donde sabemos, éste es el primer estudio que aplica una curva de respuesta de fase humana a la exposición a la luz de los participantes en condiciones naturales durante ambos cambios de hora. Nuestros resultados ponen de manifiesto la importancia de considerar la influencia de la iluminación artificial, ya que hubo grandes diferencias en los cambios de fase entre la luz personal y la luz solar. Antes del cambio de horario de marzo, se supone que la luz solar traerá una hora más de luz a las mañanas (Lahti et al., 2008; Meira e Cruz et al., 2019). Sin embargo, este hecho no se materializó en absoluto en las PRC de nuestros participantes, ya que la intensidad de la luz natural durante el invierno es menor que durante el verano y las personas pasan la mayor parte del tiempo en interiores, por lo que la intensidad de la luz no es lo suficientemente alta

como para aumentar los avances de fase. Por otro lado, se supone que la luz natural de la tarde es más alta y dura más tiempo durante el verano en comparación con el invierno, lo que produce retrasos de fase más altos. De hecho, esto se refleja tanto en los participantes como en los PRC solares. Además, antes del horario de verano, la ausencia de luz natural se suple mediante el uso de iluminación artificial, manteniendo niveles similares de retraso de fase que después del cambio de hora en la luz personal durante las noches. Después del horario de verano, el sol se pone más tarde y este hecho contribuye al aumento de los retrasos de fase de la luz solar y también explica la tendencia de los retrasos de fase producidos por la iluminación artificial a ascender, aunque las diferencias en este caso fueron más bajas, probablemente debido a la gran cantidad de tiempo pasado en interiores. Durante la transición de otoño, ocurre lo contrario para la luz del sol. Antes del cambio de tiempo, los avances de fase y los retrasos de fase estaban casi equilibrados, pero la introducción del horario de invierno trae más luz a las mañanas, aumentando los avances de fase y reduciendo los retrasos, ya que el sol se pone antes. Sin embargo, nuevamente, este hecho no se materializó en la exposición personal a la luz, donde los niveles de retraso incluso aumentaron después del cambio de tiempo en comparación con los avances, y alcanzaron niveles similares a los de antes de la transición al horario de verano como consecuencia del aumento en el uso de iluminación artificial en las tardes que suministra la ausencia de luz natural.

Sobre la desincronización interna, nuestros resultados respaldan que la adaptación a la transición de octubre es más fácil que el cambio de primavera. Después del cambio de marzo, apareció una desincronización en ambos parámetros, actividad motora y temperatura de la piel de la muñeca, especialmente durante los primeros tres días. El día del cambio de horario de primavera, ambos parámetros sufrieron un retraso, pero parecieron sincronizarse entre ellos y con el nuevo horario los primeros días hábiles después del cambio, adelantando su hora hasta alcanzar el objetivo del horario de verano (1 hora antes). Sin embargo, cuando llegó el fin de semana, volvieron a las horas anteriores al cambio de primavera. Esto parece reflejar el hecho de que los participantes se obligaron a despertarse más temprano debido al horario de trabajo, pero su fisiología no estaba realmente sincronizada con la nueva hora. Las diferencias fueron mayores en la hora de L5 de tiempo en movimiento, ya que también hubo una desalineación entre la hora promedio de la semana anterior y el día 5 después de la transición, porque el tiempo en movimiento es una variable que responde a las demandas de comportamiento. Si bien las diferencias en M5 de la temperatura de la piel fueron menores probablemente debido al hecho de que la temperatura es una variable endógena y, por lo tanto, más estable. Centrándose en la transición de octubre, ambos parámetros se

mantuvieron unidos la mayor parte del tiempo y alcanzaron el objetivo del horario de invierno en dos días (tiempo en movimiento) y cuatro días (temperatura de la muñeca), lo que respalda el hecho de que la transición de otoño es menos perjudicial y la adaptación a es más fácil en comparación con la de primavera (Kantermann et al., 2007; Meira e Cruz et al., 2019; Tonetti et al., 2013). El límite principal de este estudio fueron los factores no controlados como los días no laborables y el jet lag social. En cualquier caso, estos resultados reflejan que, a pesar de las diferencias individuales, una semana después de la primavera, la adaptación de la transición al horario de verano no se completó, lo cual concuerda con estudios anteriores (Valdez et al., 2003).

CONCLUSIÓN

Hasta donde sabemos, éste es el primer estudio que aplica una curva de respuesta de fase monitorizando la exposición a luz de los participantes siguiendo su estilo de vida habitual durante ambas transiciones. La transición al horario de verano aumenta la duración de la luz natural y la zona de retraso de fase de la luz solar. Sin embargo, esto no ocurre cuando se aplica a personas vespertinas. Tiende a aumentar ambos cambios (avance y demoras) de la curva de respuesta de fase y a disminuir la hora de M5 de temperatura de la piel y L5 de tiempo en movimiento. De manera similar, la transición fuera del horario de verano, reduce la intensidad de la luz natural y, según la luz del sol, actuaría como un retraso de fase. En nuestros participantes (cronotipos indefinidos y tardíos) aumenta la hora de M5 de temperatura de la piel y L5 de tiempo en movimiento, así como la duración del sueño, y tiende a disminuir los avances de fase y mantener los retrasos de fase, facilitando la adaptación a la misma. Nuestros resultados reflejan la importancia del uso de la iluminación artificial al considerar los efectos del cambio de hora en el sistema circadiano humano.

REFERENCES

- Arguelles-Prieto, R., Bonmati-Carrion, M. A., Rol, M. A., & Madrid, J. A. (2019). Determining Light Intensity, Timing and Type of Visible and Circadian Light From an Ambulatory Circadian Monitoring Device. *Frontiers in Physiology*, 10(June), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00822>
- Aries, M. B. C., & Newsham, G. R. (2008). Effect of daylight saving time on lighting energy use: A literature review. *Energy Policy*, 36(6), 1858–1866. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2007.05.021>

- Barnes, C. M., & Wagner, D. T. (2009). Changing to Daylight Saving Time Cuts Into Sleep and Increases Workplace Injuries. *Journal of Applied Psychology, 94*(5), 1305–1317. <https://doi.org/10.1037/a0015320>
- Coren, S. (1996). Daylight savings time and traffic accidents. *The New England Journal of Medicine, 334*(14), 924–925. <https://doi.org/10.1056/nejm199604043341416>
- Czeisler, C. A., Duffy, J. F., Shanahan, T. L., Brown, E. N., Mitchell, J. F., Rimmer, D. W., ... Kronauer, R. E. (1999). Stability, Precision, and Near-24-Hour Period of the Human Circadian Pacemaker. *Science, 284*(5423), 2177–2181.
- De Coursey, P. J. (1960). Daily Light Sensitivity Rhythm in a Rodent. *Science, 131*, 33–35. <https://doi.org/10.1126/science.131.3392.33>
- Ferguson, S. A., Preusser, D. F., Lund, A. K., Zador, P. L., & Ulmer, R. G. (1995). Daylight Saving Time and Motor Vehicle Crashes: The Reduction in Pedestrian and Vehicle Occupant Fatalities Susan. *American Journal of Public Health, 85*(1), 92–95. <https://doi.org/10.2105/ajph.85.1.92>
- Gooley, J. J. (2008). Treatment of Circadian Rhythm Sleep Disorders with Light. *Annals Academy of Medicine, 37*(8), 669–676.
- Harrison, Y. (2013). The impact of daylight saving time on sleep and related behaviours. *Sleep Medicine Reviews, 17*(4), 285–292. <https://doi.org/10.1016/j.smrv.2012.10.001>
- Kantermann, T., Juda, M., Merrow, M., & Roenneberg, T. (2007). The Human Circadian Clock's Seasonal Adjustment Is Disrupted by Daylight Saving Time. *Current Biology, 17*(22), 1996–2000. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.10.025>
- Khalsa, S. B. S., Jewett, M. E., Cajochen, C., & Czeisler, C. A. (2003). A phase response curve to single bright light pulses in human subjects. *Journal of Physiology, 549*(3), 945–952. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.040477>
- Klein, K. E., Wegmann, H. M., & Hunt, B. I. (1972). Desynchronization of body temperature and performance circadian rhythm as a result of outgoing and homegoing transmeridian flights. *Aerospace Medicine, 43*, 119–132.
- Krauchi, K., & Deboer, T. (2010). The interrelationship between sleep regulation and thermoregulation. *Frontiers in Bioscience, 15*, 604–625.

- Lahti, T. A., Leppämäki, S., Lönnqvist, J., & Partonen, T. (2006). Transition to daylight saving time reduces sleep duration plus sleep efficiency of the deprived sleep. *Neuroscience Letters*, 406(3), 174–177. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.07.024>
- Lahti, T. A., Leppämäki, S., Lönnqvist, J., & Partonen, T. (2008). Transitions into and out of daylight saving time compromise sleep and the rest-activity cycles. *BMC Physiology*, 8(1), 2–7. <https://doi.org/10.1186/1472-6793-8-3>
- Lahti, T. A., Leppämäki, S., Ojanen, S. M., Haukka, J., Tuulio-Henriksson, A., Lönnqvist, J., & Partonen, T. (2006). Transition into daylight saving time influences the fragmentation of the rest-activity cycle. *Journal of Circadian Rhythms*, 4, 1–6. <https://doi.org/10.1186/1740-3391-4-1>
- Lambe, M., & Cummings, P. (2000). The shift to and from daylight savings time and motor vehicle crashes. *Accident Analysis and Prevention*, 32(4), 609–611. [https://doi.org/10.1016/S0001-4575\(99\)00088-3](https://doi.org/10.1016/S0001-4575(99)00088-3)
- Madrid-Navarro, C. J., Escamilla-Sevilla, F., Mínguez-Castellanos, A., Campos, M., Ruiz-Abellán, F., Madrid, J. A., & Rol, M. A. (2018). Multidimensional circadian monitoring by wearable biosensors in Parkinson's disease. *Frontiers in Neurology*, 9(MAR), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00157>
- Manfredini, R., Fabbian, F., Cappadona, R., & Modesti, P. A. (2018). Daylight saving time, circadian rhythms, and cardiovascular health. *Internal and Emergency Medicine*, 13(5), 641–646. <https://doi.org/10.1007/s11739-018-1900-4>
- Meira e Cruz, M., Miyazawa, M., Manfredini, R., Cardinali, D., Madrid, J. A., Reiter, R., ... Acuña-Castroviejo, D. (2019). Impact of Daylight Saving Time on circadian timing system: An expert statement. *European Journal of Internal Medicine*, 60(January), 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2019.01.001>
- Minors, D. S., Waterhouse, J. M., & Wirz-Justice, A. (1991). A human phase-response curve to light. *Neuroscience Letters*, 133(1), 36–40. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.003>
- Monk, T. H., & Aplin, L. C. (1980). Spring and Autumn daylight saving time changes: Studies of adjustment in sleep timings, mood, and efficiency. *Ergonomics*, 23(2), 167–178. <https://doi.org/10.1080/00140138008924730>

- Monk, T. H., & Folkard, S. (1976). Adjusting to the changes to and from Daylight Saving Time. *Nature*, 261(5562), 688–689. <https://doi.org/10.1038/261688a0>
- Nicholson, A. N., & Stone, B. M. (1978). Adaptation of sleep to British Summer Time. *The Journal of Physiology*, 275, 22–23.
- Ortiz-Tudela, E., Innominato, P. F., Rol, M. A., Lévi, F., & Madrid, J. A. (2016). Relevance of internal time and circadian robustness for cancer patients. *BMC Cancer*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2319-9>
- Ortiz-Tudela, E., Martinez-Nicolas, A., Campos, M., Rol, M. Á., & Madrid, J. A. (2010). A new integrated variable based on thermometry, actimetry and body position (TAP) to evaluate circadian system status in humans. *PLoS Computational Biology*, 6(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000996>
- Roenneberg, T., Wirz-Justice, A., & Mellow, M. (2003). Life between clocks: Daily temporal patterns of human chronotypes. *Journal of Biological Rhythms*, 18(1), 80–90. <https://doi.org/10.1177/0748730402239679>
- Sarabia, J. A., Rol, M. A., Mendiola, P., & Madrid, J. A. (2008). Circadian rhythm of wrist temperature in normal-living subjects A candidate of new index of the circadian system. *Physiology & Behavior*, 95(4), 570–580. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.08.005>
- Shapiro, C. M., Blake, F., Fossey, E., & Adams, B. (1990). Daylight saving time in psychiatric illness. *Journal of Affective Disorders*, 19(3), 177–181. [https://doi.org/10.1016/0165-0327\(90\)90089-Q](https://doi.org/10.1016/0165-0327(90)90089-Q)
- Solcast API. (2019). Retrieved from <https://solcast.com/>
- Tarquini, R., Carbone, A., Martinez, M., & Mazzocchi, G. (2019). Daylight saving time and circadian rhythms in the neuro-endocrine-immune system: impact on cardiovascular health. *Internal and Emergency Medicine*, 14(1), 17–19. <https://doi.org/10.1007/s11739-018-1984-x>
- Tonetti, L., Erbacci, A., Fabbri, M., Martoni, M., & Natale, V. (2013). Effects of transitions into and out of daylight saving time on the quality of the sleep/wake cycle: An actigraphic study in healthy university students. *Chronobiology International*, 30(10), 1218–1222. <https://doi.org/10.3109/07420528.2013.812651>
- Valdez, P., Ramirez, C., & Garcia, A. (2003). Adjustment of the sleep-wake cycle to small (1-2 h)

changes in schedule. *Biological Psychiatry*, 34(2), 145–155.

Varughese, J., & Allen, R. P. (2001). Fatal accidents following changes in daylight savings time: The American experience. *Sleep Medicine*, 2(1), 31–36. [https://doi.org/10.1016/S1389-9457\(00\)00032-0](https://doi.org/10.1016/S1389-9457(00)00032-0)

Witting, W., Kwa, I. H., Eikelenboom, P., Mirmiran, M., & Swaab, D. F. (1990). Alterations in the circadian rest-activity rhythm in aging and Alzheimer's Disease. *Biological Psychiatry*, 27, 563–572. [https://doi.org/10.1016/0006-3223\(90\)90523-5](https://doi.org/10.1016/0006-3223(90)90523-5)

Zeitzer, J. M., Dijk, D. J., Kronauer, R. E., Brown, E. N., & Czeisler, C. A. (2000). Sensitivity of the human circadian pacemaker to nocturnal light: Melatonin phase resetting and suppression. *Journal of Physiology*, 526(3), 695–702. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00695.x>

4. DISCUSIÓN GENERAL

The circadian timing system is the main responsible for the generation of daily rhythms in mammals and is in charge of maintaining the internal temporal order and the synchronization to external timing cues. The way of life in modern societies, that implies rotational shift work, nocturnal leisure time and transmeridian flights is increasingly associated with an inadequate exposure to light, which is the main *zeitgeber* to the circadian system. These conditions lead to a misalignment between the internal temporal order and environmental time signals, giving rise to the appearance of a phenomenon known as chronodisruption (CD) (Erren & Reiter, 2009a, 2013).

Chronodisruption manifests as flattened and fragmented rhythms, loss of stability and rhythmicity, and phase shifts between suprachiasmatic nuclei (SCN, the master clock) and environmental cues. This impairment has been linked with a wide variety of pathologies, such as cognitive and affective disorders, cardiovascular events, reproductive alterations, sleep disorders, metabolic syndrome, premature aging and even several types of cancer (Erren & Reiter, 2009b; Evans & Davidson, 2013; Garaulet & Madrid, 2009, 2010; Hansen, 2001; Pauley, 2004; Reiter et al., 2012; Schernhammer et al., 2001; Viswanathan et al., 2007).

To prevent these pathologies and to palliate CD effects on human health, it becomes essential to deep in our knowledge of the relationship between *zeitgebers* or inputs to the SCN, and output pathways and marker rhythms. This will help us to develop practical and non-invasive tools, as well as therapeutic interventions, that will facilitate the restoration of synchronization to the external environment and, therefore, the re-establishment of the internal temporal order of the circadian system.

In this PhD Thesis, that was precisely the main objective: to establish a link between input and output pathways to the SCN as an indirect form of measuring CD. As said before, the most important *zeitgeber* is the light-dark cycle (Roenneberg et al., 2003; Roenneberg & Foster, 1997), and the circadian system is especially sensitive to that light between 460-480 nm (Berson et al., 2002; Brainard et al., 2001; Hattar et al., 2002), so it seems obvious that assessing input pathways should definitely involve measuring physical characteristics of a light source. The most accurate and practical way to perform these measurements and connect input and output pathways is to develop and improve an ambulatory circadian monitoring device: Kronowise®. This is precisely the aim of **Chapter 1**. Up to our knowledge, this was the first time blue light is monitored in conjunction with visible light and several marker rhythms and circadian variables, such as activity, sleep and distal skin temperature, which has a stable phase relationship with core body temperature (Krauchi & Deboer, 2010; Ortiz-Tudela et al.,

2014; Ortiz-Tudela et al., 2010; Sarabia et al., 2008). Kronowise® is provided with three light sensors of different sensitivity: visible light, infrared light (from 800 to 1070 nm) and a circadian light sensor which is equipped with a blue filter matching the sensitivity curve of ipRGCs, but validation was still needed. For that, we developed an algorithm to directly calculate circadian light from Kronowise® recordings, using a spectroradiometer as a control device, and according to the infrared (IR) content of a lighting, to differentiate among three types of lights: artificial lights with high IR content (such as incandescent bulbs), artificial lights with low IR content (such as RGB LEDs or fluorescent lamps) and sun light. Our results proved the reliability of Kronowise® and our algorithm to accurately monitor visible and circadian light exposure, discriminating among light types, and making our device a practical tool to evaluate both inputs to the central pacemaker (light-dark cycle) and output pathways or marker rhythms, on large populations under free-living conditions.

The start point of the input pathways are the melanopsin containing retinal ganglion cells (ipRGCs). These cells not only project their axons to the SCN (Berson et al., 2002; Brainard et al., 2001; Hattar et al., 2002) but also to the olivary pretectal nucleus (Baver et al., 2008; Chen et al., 2011), which is responsible for regulation of pupil light reflex. According to previous literature, ipRGCs controlled the first seconds of pupil response after the light stimulus is off (Adhikari et al., 2016; Adhikari et al., 2015; Bonmati-Carrion et al., 2018, 2016; Gamlin et al., 2007; Markwell et al., 2010; McDougal & Gamlin, 2010). Therefore, measuring the pupil light reflex could provide information about the main input pathway to the circadian system: the ipRGCs, so in **Chapter 2**, we aim to explore a possible link between pupil light reflex and the “gold standard” of the output pathways or marker rhythms: melatonin secretion (Bonmati-Carrion et al., 2013; Lewy et al., 1999; Lewy & Sack, 1989; Pandi-Perumal et al., 2007). Besides, it is widely known that blue light suppress melatonin secretion (Brainard et al., 2008; Christian Cajochen et al., 2005; Kozaki et al., 2016; Lewy et al., 1980; Smith & Eastman, 2009), and that ageing process reduces the sensitivity to light of the human circadian system (Kondratov, 2007; Martinez-Nicolas et al., 2018; Turner & Mainster, 2008), thus, other objectives of this chapter were to investigate the effects of different contents in blue light (different correlated color temperatures) on melatonin secretion and pupil light reflex, but also whether these effects were similar both on elders and youngsters. Our findings showed that both light sources produced significant melatonin inhibition in comparison with the dim light condition (control condition), although it was higher under 5700 K, but we did not find an effect of aging in the experimental conditions, although under control condition, melatonin concentration was lower in the elder group, as expected (Hardeland, 2012; Münch et al., 2005; Sack et al.,

1986). Otherwise, our results proved higher contraction in pupil response under the more bluish condition at response times controlled by ipRGCs. These findings support the assumption that blue light have a greater effect on circadian rhythms, but they also expose the fact that even warm CCTs, as 3000 K, still have enough blue radiation to suppress melatonin secretion and, thus, affect circadian rhythms. Although we did not find any relation between pupil light reflex parameters and melatonin inhibition, according to our results, both techniques provide complementary information and, therefore, both should be employed when exploring the circadian effects of a light source.

Since we had already studied the circadian inputs (light and ipRGCs) and the output pathways (melatonin secretion), based on our results and the experience acquired during the development of this PhD Thesis, we proposed a method to evaluate any light source according to their physical characteristics, subjective variables and biological markers (**Chapter 3**). This method, which is intellectually registered, consists of three steps: the first one is an analysis of the spectrum and intensity, as well as the theoretical activation the light produces on each population of photoreceptors (CIE S 026/E:2018; Lucas et al., 2014; Rea et al., 2002). Since light between 460-480 nm is the one reaching the ipRGCs and the SCN (Berson et al., 2002; Brainard et al., 2001, 2008; Hattar et al., 2002), obtaining the spectrum of a light source would be the first inspection to do. After that, the second step consists of a color constancy test and a questionnaire about light comfort and preferred time of use. Color constancy and good color discrimination are also variables to take into account, especially in some workplaces such as factories and hospitals (Canazei et al., 2017). Finally, the third part involves the determination of biological tests. Here, we employed melatonin secretion and pupil light reflex since both of them provide information about the status of the circadian system, their inputs and their outputs. Melatonin secretion is the best known and characterized marker rhythm (Benloucif et al., 2005; Lewy et al., 1999; Van Someren & Nagtegaal, 2007; Voultsios et al., 1997) and sustained pupilloconstriction after light offset is mainly controlled by ipRGCs (Adhikari et al., 2015; Bonmati-Carrion et al., 2018; Feigl & Zele, 2014; Joyce et al., 2015; Markwell et al., 2010; McDougal & Gamlin, 2010) that transmit information both to the SCN and the olivary pretectal nucleus (Bonmati-Carrion et al., 2016; Clarke & Ikeda, 1985; Gamlin et al., 1995). Our results proved the validity of this method to assess the effects and suitability as a night light or day light of any light source. Up to our knowledge, this is the first method that attempted to evaluate a light source from an integrative perspective including both objective and subjective variables, as well as physical and biological measurements.

As a final chapter of this PhD Thesis, to put into practice the knowledge acquired, we decided to perform a naturalistic experiment. To do that, we applied the ambulatory circadian monitoring device to investigate marker rhythms in conditions that may alter the circadian synchronization. Due to the fact that it is a recent matter of discussion, we selected the daylight saving time (DST) transitions experienced by approximately 1.6 billion people (Kantermann et al., 2007). Traditionally, transition into DST has been compared to a trip eastwards and change out of DST to a trip westwards (Klein et al., 1972). However, reality is very different, since when we travel one hour to the east, our internal time must experience an advance of one hour and the sun also rises one hour earlier, while after DST transition we have to advance one hour our phase, while the sun continues rising at the same time. And the same occurs with autumn time change but in the opposite direction. Therefore, the main objective of **Chapter 4** was to explore the effects of DST transitions on human circadian rhythms and phase response curve (PRC) to light. To do that, we aim to personalize as much as possible the ACM recordings of light exposure and circadian rhythms, by centering the PRC at the midtime of the five hours of maximal skin temperature (M5) (Witting et al., 1990) in all situations. Our results showed that spring transition was more disruptive than the autumn one, as previously described (Lahti et al., 2006, 2008; Manfredini et al., 2018; Monk & Aplin, 1980; Monk & Folkard, 1976; Tonetti et al., 2013), advancing the time of skin temperature and activity rhythms and increasing the differences between them. Moreover, when morning chronotypes were simulated using sun light exposure, our findings showed that even for them, spring transition under sun light would force our system to delay its phase, making adaptation more difficult for them. On the contrary, October transition tended to delay the timing of skin temperature and activity rhythms and reduce the internal desynchronization in comparison with March change, and delaying is the natural tendency of the human circadian system (Czeisler et al., 1999). Our findings also exposed the importance of take into account the use of artificial lighting. As said before, natural light intensity is higher during summer time and dusk appears one hour later, so that it would be reasonable to expect higher phase delays. This fact is not reflected in our participants' personal exposure, where differences were minimal, due to the high amount of time spent indoors under poor light intensities. And the same occurs for phase advances, tending to increase as well but almost imperceptibly. After autumn transition, however, the contrary occurs with sun light, advances increased and delays decreased due to shorter days and larger nights during winter time. But results on personal light exposure maintained similar levels both for phase advances and delays, since the absence of natural light is supplied with the use of artificial lighting. Besides, this study proved the usefulness of Kronowise® to be applied in a wide variety of situations and populations, and it will help us to

understand mechanisms underlying chronodisruption and, consequently, to prevent it. Further investigation focused on monitoring large populations that may be subjected to chronodisruptive conditions in their daily routines would be helpful and welcome.

5. CONCLUSIONES

1. Kronowise® constitutes a reliable and sensitive ACM device to assess light exposure of different spectra.
2. The algorithm developed in this PhD Thesis has proved its validity to directly calculate from Kronowise® data visible and circadian light exposure, as well as to discriminate among different light types.
3. An increase in color temperature of commercial light sources produce an increase in melatonin inhibition and a greater pupil contraction regardless of the age of subjects.
4. Melatonin inhibition and PLR are not correlated at individual level. Thus each technique provides complementary information on the impact of light sources on circadian markers and both should be employed in the evaluation of circadian effects of a light.
5. The method developed in this PhD Thesis is an integrative tool to evaluate the circadian effects of any light source, since it includes objective and subjective variables, as well as physical and biological measurements.
6. March daylight saving time transition is more disruptive than the autumn one, advancing and desynchronizing skin temperature and activity rhythms. October transition, on the contrary, is comparable to a phase delay, and tended to delay those rhythms and to maintain similar levels of advances and delays provoked by personal light exposure. This fact makes transition into winter time easier, since delaying is the natural tendency of the human circadian system.
7. People spend most of their time indoors using artificial lighting, and this is reflected in the minimal differences on phase advances and delays before and after daylighting saving time transitions. This fact should be considered when studying chronodisruptive conditions and their effects, and when making decisions about them.

GENERAL CONCLUSIONS

Both natural and artificial lighting have an effect on the human circadian system, and this latter constitutes an important variable to consider. Kronowise® light sensors and our algorithm are useful tools to assess these effects under free living conditions and in chronodisruptive situations, such as daylight saving time transitions. The development of integrative and non-invasive protocols and measurements will help us to deep in understanding of circadian adjustment and mechanisms involved in chronodisruption.

6. REFERENCIAS

- Abrahamson, E. E., & Moore, R. Y. (2001). Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Research*, 916, 172–191.
- Acuña-Castroviejo, D., & Escames, G. (2006). Ritmos circadianos de neurotransmisores y melatonina, implicaciones en la salud y enfermedad. In J. A. Madrid & M. A. Rol (Eds.), *Cronobiología básica y clínica* (Edittec@red). Madrid: Edittec@red.
- Adhikari, P., Feigl, B., & Zele, A. J. (2016). Rhodopsin and melanopsin contributions to the early redilation phase of the post-illumination pupil response (PIPR). *PLoS ONE*, 11(8), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161175>
- Adhikari, P., Pearson, C. A., Anderson, A. M., Zele, A. J., & Feigl, B. (2015). Effect of Age and Refractive Error on the Melanopsin Mediated Post-Illumination Pupil Response (PIPR). *Scientific Reports*, 5, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep17610>
- Adhikari, P., Zele, A. J., & Feigl, B. (2015). The post-illumination pupil response (PIPR). *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 56(6), 3838–3849. <https://doi.org/10.1167/iov.14-16233>
- American Academy of Sleep Disorders. (2005). *International Classification of Sleep Disorders: Diagnostic and Coding Manual (ICSD-2)* (M. J. Thorpy, Ed.).
- Ancoli-Israel, S., Cole, R., Alessi, C., Chambers, M., Moorcroft, W., & Pollak, C. P. (2003). The Role of Actigraphy in the Study of Sleep and Circadian Rhythms. *Sleep*, 26(3), 342–392.
- Arendt, J. (1994). *Melatonin and the mammalian pineal gland* (J. Arendt, Ed.). London: Chapman & Hall.
- Arendt, J., & Skene, D. J. (2005). Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Medicine Reviews*, 9(1), 25–39. <https://doi.org/10.1016/j.smr.2004.05.002>
- Arendt, J., Wirz-Justice, A., Bradtke, J., & Kornemark, M. (1979). Long-Term Studies on Immunoreactive Human Melatonin. *Annals of Clinical Biochemistry: An International Journal of Biochemistry and Laboratory Medicine*, 16, 307–312. <https://doi.org/10.1177/000456327901600182>
- Argüelles-Prieto, R., & Bonmati-Carrion, M. A. (2015). Melatonina, la hormona de la noche. *Revista Eubacteria*, 33, 16–21.

- Arguelles-Prieto, R., Bonmati-Carrion, M. A., Rol, M. A., & Madrid, J. A. (2019). Determining Light Intensity, Timing and Type of Visible and Circadian Light From an Ambulatory Circadian Monitoring Device. *Frontiers in Physiology*, 10(June), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00822>
- Aries, M. B. C. (2005). Human Lighting Demands, healthy lighting in an office environment. In *Technische Universiteit Eindhoven* 2005. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.6100/IR594257>
- Aschoff, J., Daan, S., & Honma, K.-I. (1982). Zeitgebers, Entrainment, and Masking: Some Unsettled Questions. In J. Aschoff, S. Daan, & G. Groos (Eds.), *Vertebrate Circadian Systems* (pp. 13–24). https://doi.org/10.1007/978-3-642-68651-1_2
- Aschoff, J., & von Goetz, C. (1988). Masking of Circadian Activity Rhythms in Male Golden Hamsters by the Presence of Females. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 22(6), 409–412.
- Atkinson, G., Edwards, B., Reilly, T., & Waterhouse, J. (2007). Exercise as a synchroniser of human circadian rhythms: An update and discussion of the methodological problems. *European Journal of Applied Physiology*, 99(4), 331–341. <https://doi.org/10.1007/s00421-006-0361-z>
- Baver, S. B., Pickard, G. E., Sollars, P. J., & Pickard, G. E. (2008). Two types of melanopsin retinal ganglion cell differentially innervate the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and the olivary pretectal nucleus. *European Journal of Neuroscience*, 27(7), 1763–1770. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06149.x>
- Belenky, M. A., Smeraski, C. A., Provencio, I., Sollars, P. J., & Pickard, G. E. (2003). Melanopsin retinal ganglion cells receive bipolar and amacrine cell synapses. *Journal of Comparative Neurology*, 460(3), 380–393. <https://doi.org/10.1002/cne.10652>
- Ben-Shlomo, R., & Kyriacou, C. P. (2010a). Chronodisruption alter expression of tumorigenesis associated transcripts in mouse brain. *WSEAS Transactions on Biology and Biomedicine*, 7(2), 41–50.
- Ben-Shlomo, R., & Kyriacou, C. P. (2010b). Light pulses administered during the circadian dark phase alter expression of cell cycle associated transcripts in mouse brain. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 197(1), 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2009.11.003>

- Benloucif, S., Guico, M. J., Reid, K. J., Wolfe, L. F., L'Hermite-Balériaux, M., & Zee, P. C. (2005). Stability of melatonin and temperature as circadian phase markers and their relation to sleep times in humans. *Journal of Biological Rhythms*, 20(2), 178–188. <https://doi.org/10.1177/0748730404273983>
- Berson, D. M., Dunn, F. A., & Takao, M. (2002). Phototransduction by Retinal Ganglion Cells That Set the Circadian Clock. *Science*, 295(5557), 1070–1073. <https://doi.org/10.1126/science.1067262>
- Blazquez, A., Martinez-Nicolas, 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. *Chronobiology International*, 29(6), 747–756. <https://doi.org/10.3109/07420528.2012.679328>
- Bonmati-Carrion, M. A., Álvarez-Sánchez, N., Hardeland, R., Madrid, J. A., & Rol, M. A. (2013). A comparison of B16 melanoma cells and 3T3 fibroblasts concerning cell viability and ROS production in the presence of melatonin, tested over a wide range of concentrations. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(2), 3901–3920. <https://doi.org/10.3390/ijms14023901>
- Bonmati-Carrion, M. A., Arguelles-Prieto, R., Martinez-Madrid, M. J., Reiter, R., Hardeland, R., Rol, M. A., & Madrid, J. A. (2014). Protecting the melatonin rhythm through circadian healthy light exposure. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(12). <https://doi.org/10.3390/ijms151223448>
- Bonmati-Carrion, M. A., Hild, K., Isherwood, C. M., Sweeney, S. J., Revell, V. L., Madrid, J. A., ... Skene, D. J. (2018). Effect of Single and Combined Monochromatic Light on the Human Pupillary Light Response. *Frontiers in Neurology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.01019>
- Bonmati-Carrion, M. A., Hild, K., Isherwood, C., Sweeney, S. J., Revell, V. L., Skene, D. J., ... Madrid, J. A. (2016). Relationship between human pupillary light reflex and circadian system status. *PLoS ONE*, 11(9), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162476>
- Bonmati-Carrion, M. A., Middleton, B., Revell, V., Skene, D. J., Rol, M. A., & Madrid, J. A. (2013). Circadian phase assessment by ambulatory monitoring in humans : Correlation with dim light melatonin onset. *Chronobiology International*, 31(1), 37–51. <https://doi.org/10.3109/07420528.2013.820740>

- Bouwman, M. E. J., Bos, E. H., Booij, S. H., Van Faassen, M., Oldehinkel, A. J., & De Jonge, P. (2015). Intra- and inter-individual variability of longitudinal daytime melatonin secretion patterns in depressed and non-depressed individuals. *Chronobiology International*, 32(3), 441–446. <https://doi.org/10.3109/07420528.2014.973114>
- Brainard, G. C., Hanifin, J. P., Greeson, J. M., Byrne, B., Glickman, G., Gerner, E., & Rollag, M. D. (2001). Action Spectrum for Melatonin Regulation in Humans: Evidence for a Novel Circadian Photoreceptor. *The Journal of Neuroscience*, 21(16), 6405–6412. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-16-06405.2001>
- Brainard, G. C., Sliney, D., Hanifin, J. P., Glickman, G., Byrne, B., Greeson, J. M., ... Rollag, M. D. (2008). Sensitivity of the human circadian system to short-wavelength (420-nm) light. *Journal of Biological Rhythms*, 23(5), 379–386. <https://doi.org/10.1177/0748730408323089>
- Brown, G. M., Pandi-Perumal, S. R., Trakht, I., & Cardinali, D. P. (2009). Melatonin and its relevance to jet lag. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 7(2), 69–81. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2008.09.004>
- Brzezinski, A., Seibel, M. M., Lynch, H. J., Deng, M. H., & Wurtman, R. J. (1987). Melatonin in human preovulatory follicular fluid. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 64(4), 865–867. <https://doi.org/10.1210/jcem-64-4-865>
- Buijs, R. M., & Kalsbeek, A. (2001). Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(July), 521.
- Buijs, R. M., La Fleur, S. E., Wortel, J., Van Heyningen, C., Zuiddam, L., Mettenleiter, T. C., ... Nijijima, A. (2003). The suprachiasmatic nucleus balances sympathetic and parasympathetic output to peripheral organs through separate preautonomic neurons. *Journal of Comparative Neurology*, 464(1), 36–48. <https://doi.org/10.1002/cne.10765>
- Byeon, Y., & Back, K. (2016). Melatonin production in Escherichia coli by dual expression of serotonin N-acetyltransferase and caffeic acid O-methyltransferase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(15), 6683–6691. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7458-z>
- Cajochen, C., Münch, M., Kriebel, S., Kräuchi, K., Steiner, R., Oelhafen, P., ... Wirz-Justice, A. (2005). High sensitivity of human melatonin, alertness, thermoregulation, and heart rate to short wavelength light. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90(3), 1311–1316. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0957>

- Canazei, M., Pohl, W., Bliem, H. R., & Weiss, E. M. (2017). Acute effects of different light spectra on simulated night-shift work without circadian alignment. *Chronobiology International*, 34(3), 303–317. <https://doi.org/10.1080/07420528.2016.1222414>
- Chen, L., & Yang, G. (2014). PPARs Integrate the Mammalian Clock and Energy Metabolism. *PPAR Research*, 2014, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2014/653017>
- Chen, S. K., Badea, T. C., & Hattar, S. (2011). Photoentrainment and pupillary light reflex are mediated by distinct populations of ipRGCs. *Nature*, 476(7358), 92–96. <https://doi.org/10.1038/nature10206>
- Chini, C. C. S., Escande, C., Nin, V., & Chini, E. N. (2013). DBC1 (Deleted in Breast Cancer 1) modulates the stability and function of the nuclear receptor Rev-erba. *Biochemical Journal*, 451(3), 453–461. <https://doi.org/10.1042/bj20121085>
- CIE S 026/E:2018 CIE System for Metrology of Optical Radiation for ipRGC-Influenced Responses to Light. (2018). In *Color Research & Application* (Vol. 44). <https://doi.org/10.1002/col.22350>
- Cipolla-Neto, J., Amaral, F. G., Afeche, S. C., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2014). Melatonin, energy metabolism, and obesity: A review. *Journal of Pineal Research*, 56(4), 371–381. <https://doi.org/10.1111/jpi.12137>
- Clarke, R. J., & Ikeda, H. (1985). Luminance and darkness detectors in the olivary and posterior pretectal nuclei and their relationship to the pupillary light reflex in the rat. *Experimental Brain Research*, 57(2), 224–232. <https://doi.org/10.1007/BF00236527>
- Cochrane, A., Robertson, I. H., & Coogan, A. N. (2012). Association between circadian rhythms, sleep and cognitive impairment in healthy older adults: An actigraphic study. *Journal of Neural Transmission*, 119(10), 1233–1239. <https://doi.org/10.1007/s00702-012-0802-2>
- Coren, S. (1996). Daylight savings time and traffic accidents. *The New England Journal of Medicine*, 334(14), 924–925. <https://doi.org/10.1056/nejm199604043341416>
- Cutando, A., López-Valverde, A., Arias-Santiago, S., De Vicente, J., & De Diego, R. G. (2012). Role of melatonin in cancer treatment. *Anticancer Research*, 32(7), 2747–2754.
- Czeisler, C. A., Duffy, J. F., Shanahan, T. L., Brown, E. N., Mitchell, J. F., Rimmer, D. W., ... Kronauer, R. E. (1999). Stability, Precision, and Near-24-Hour Period of the Human Circadian Pacemaker. *Science*, 284(5423), 2177–2181.

- Dacey, D. M. (1996). Circuitry for color coding in the primate retina Colloquium Paper. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 93(January), 582–588.
- Dacey, D. M., Liao, H.-W., Peterson, B. B., Robinson, F. R., Vivianne C. Smith, Pokorny, J., ... Gamlin, P. D. (2005). Melanopsin-expressing ganglion cells in primate retina signal colour and irradiance and project to the LGN. *Nature*, 433(7027), 741–745. <https://doi.org/10.1038/nature03344>
- De Coursey, P. J. (1960). Daily Light Sensitivity Rhythm in a Rodent. *Science*, 131, 33–35. <https://doi.org/10.1126/science.131.3392.33>
- De Weerth, C., Zijl, R. H., & Buitelaar, J. K. (2003). Development of cortisol circadian rhythm in infancy. *Early Human Development*, 73(1–2), 39–52. [https://doi.org/10.1016/S0378-3782\(03\)00074-4](https://doi.org/10.1016/S0378-3782(03)00074-4)
- Deboer, T., Overeem, S., Visser, N. A. H., Duindam, H., Frölich, M., Lammers, G. J., & Meijer, J. H. (2004). Convergence of circadian and sleep regulatory mechanisms on hypocretin-1. *Neuroscience*, 129(3), 727–732. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.07.049>
- DeCoursey, P. J. (2004). Overview of biological timing from unicells to humans. In J.C: Dunlap, J. J. Loros, & P. J. DeCoursey (Eds.), *Chronobiology: Biological Timekeeping* (pp. 2–24). Sunderland, MA (USA): Sinauer Associates.
- Di Milia, L., Waage, S., Pallesen, S., & Bjorvatn, B. (2013). Shift Work Disorder in a Random Population Sample - Prevalence and Comorbidities. *PLoS ONE*, 8(1), 4–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055306>
- Dubocovich, M. L., & Markowska, M. (2005). Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*, 27(2), 101–110. <https://doi.org/10.1385/endo:27:2:101>
- Dubocovich, M. L., Rivera-Bermudez, M. A., Gerdin, M. J., & Masana, M. I. (2003). Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Frontiers in Bioscience*, 8(2), 1093–1108.
- Duffy, J. F., Zeitzer, J. M., & Czeisler, C. A. (2007). Decreased sensitivity to phase-delaying effects of moderate intensity light in older subjects. *Neurobiology of Aging*, 28(5), 799–807. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.03.005>
- Eastman, C. I., Gazda, C. J., Burgess, H. J., Crowley, S. J., & Fogg, L. F. (2005). Advancing circadian rhythms before eastward flight: A strategy to prevent or reduce jet lag. *Sleep*,

28(1), 33–44. <https://doi.org/10.1093/sleep/28.1.33>

Ekmekcioglu, C. (2006). Melatonin receptors in humans: Biological role and clinical relevance. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 60(3), 97–108. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2006.01.002>

Emet, M., Ozcan, H., Ozel, L., Yayla, M., Halici, Z., & Hacimuftuoglu, A. (2016). A Review of Melatonin, Its Receptors and Drugs. *The Eurasian Journal of Medicine*, 48(2), 135–141. <https://doi.org/10.5152/eurasianjmed.2015.0267>

Erren, T. C., & Reiter, R. J. (2009a). Defining chronodisruption. *Journal of Pineal Research*, 46(3), 245–247. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2009.00665.x>

Erren, T. C., & Reiter, R. J. (2009b). Light Hygiene: Time to make preventive use of insights - old and new - into the nexus of the drug light, melatonin, clocks, chronodisruption and public health. *Medical Hypotheses*, 73(4), 537–541. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2009.06.003>

Erren, T. C., & Reiter, R. J. (2013). Revisiting chronodisruption: When the physiological nexus between internal and external times splits in humans. *Naturwissenschaften*, 100(4), 291–298. <https://doi.org/10.1007/s00114-013-1026-5>

Escames, G., López, L. C., Ortiz, F., López, A., García, J. A., Ros, E., & Acuña-Castroviejo, D. (2007). Attenuation of cardiac mitochondrial dysfunction by melatonin in septic mice. *FEBS Journal*, 274(8), 2135–2147. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05755.x>

Escribano, B. M., Moreno, A., Tasset, I., & Túnez, I. (2014). Impact of light/dark cycle patterns on oxidative stress in an adriamycin-induced nephropathy model in rats. *PLoS ONE*, 9(5), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097713>

Evans, J. A., & Davidson, A. J. (2013). Health consequences of circadian disruption in humans and animal models. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (1st ed., Vol. 119). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396971-2.00010-5>

Fain, G. L., Hardie, R., & Laughlin, S. B. (2010). Phototransduction and the Evolution of Photoreceptors. *Current Biology*, 20(3), R114–R124. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.12.006>

Falchi, F., Cinzano, P., Elvidge, C. D., Keith, D. M., & Haim, A. (2011). Limiting the impact of light pollution on human health, environment and stellar visibility. *Journal of Environmental*

- Management*, 92(10), 2714–2722. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.06.029>
- Feigl, B., & Zele, A. J. (2014). Melanopsin-expressing, Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells (ipRGCs) in Retinal Disease. *OPTOMETRY AND VISION SCIENCE*, 91(8), 894–903. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21413413>
- Ferguson, S. A., Preusser, D. F., Lund, A. K., Zador, P. L., & Ulmer, R. G. (1995). Daylight Saving Time and Motor Vehicle Crashes: The Reduction in Pedestrian and Vehicle Occupant Fatalities Susan. *American Journal of Public Health*, 85(1), 92–95. <https://doi.org/10.2105/ajph.85.1.92>
- Fischer, T. W., Zmijewski, M. A., Zbytek, B., Sweatman, T. W., Slominski, R. M., Wortsman, J., & Slominski, A. (2006). Oncostatic effects of the indole melatonin and expression of its cytosolic and nuclear receptors in cultured human melanoma cell lines. *International Journal of Oncology*, 29(3), 665–672.
- Follenius, M., Weibel, L., & Brandenberger, G. (1995). Distinct modes of melatonin secretion in normal men. *Journal of Pineal Research*, 18(3), 135–140. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.1995.tb00151.x>
- Fonken, L. K., & Nelson, R. J. (2014). The effects of light at night on circadian clocks and metabolism. *Endocrine Reviews*, 35(4), 648–670. <https://doi.org/10.1210/er.2013-1051>
- Fu, L., Pelicano, H., Liu, J., Huang, P., & Lee, C. C. (2002). The circadian gene Period2 plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell*, 111, 41–50.
- Gamlin, P. D. R., McDougal, D. H., Pokorny, J., Smith, V. C., Yau, K. W., & Dacey, D. M. (2007). Human and macaque pupil responses driven by melanopsin-containing retinal ganglion cells. *Vision Research*, 47(7), 946–954. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2006.12.015>
- Gamlin, P. D. R., Zhang, H., & Clarke, R. J. (1995). Luminance neurons in the pretectal olivary nucleus mediate the pupillary light reflex in the rhesus monkey. *Experimental Brain Research*, 106(1), 177–180. <https://doi.org/10.1007/BF00241367>
- Garaulet, M., & Madrid, J. A. (2009). Chronobiology, genetics and metabolic syndrome. *Current Opinion in Lipidology*, 20(2), 127–134. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e3283292399>
- Garaulet, M., & Madrid, J. A. (2010). Chronobiological aspects of nutrition, metabolic syndrome and obesity. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(9–10), 967–978. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.05.005>

- Godley, B. F., Shamsi, F. A., Liang, F. Q., Jarrett, S. G., Davies, S., & Boulton, M. (2005). Blue light induces mitochondrial DNA damage and free radical production in epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(22), 21061–21066. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502194200>
- Gooley, J. J., Lu, J., Fischer, D., & Saper, C. B. (2003). Behavioral/Systems/Cognitive A Broad Role for Melanopsin in Nonvisual Photoreception. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(18), 7093–7106. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-18-07093.2003>
- Goriki, A., Hatanaka, F., Myung, J., Kim, J. K., Yoritaka, T., Tanoue, S., ... Takumi, T. (2014). A Novel Protein, CHRONO, Functions as a Core Component of the Mammalian Circadian Clock. *PLoS Biology*, 12(4), e1001839. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001839>
- Grimaldi, B., Nakahata, Y., Kaluzova, M., Masubuchi, S., & Sassone-Corsi, P. (2009). Chromatin remodeling, metabolism and circadian clocks: The interplay of CLOCK and SIRT1. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 41(1), 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.08.035>
- Gronfier, C., Wright, K. P., Kronauer, R. E., & Czeisler, C. A. (2007). Entrainment of the human circadian pacemaker to longer-than-24-h days. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(21), 9081–9086. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702835104>
- Guerrero, J. M., Carrillo-Vico, A., & Lardone, P. J. (2007). La Melatonina. *Investigación y Ciencia, Octubre*, 30–38.
- Haim, A., & Portnov, B. A. (2013). *Light Pollution as a New Risk Factor for Human Breast and Prostate Cancers*. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6220-6>
- Hankins, M. W., Peirson, S. N., & Foster, R. G. (2008). Melanopsin: an exciting photopigment. *Trends in Neurosciences*, 31(1), 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.11.002>
- Hannibal, J. (2002). Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell and Tissue Research*, 309(1), 73–88. <https://doi.org/10.1007/s00441-002-0574-3>
- Hansen, J. (2001). Light at night, shiftwork, and breast cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(20), 1513–1515. <https://doi.org/10.1093/jnci/93.20.1513>
- Hardeland, R. (2012). Melatonin in aging and disease -multiple consequences of reduced

- secretion, options and limits of treatment. *Aging and Disease*, 3(2), 194–225. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22724080><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3377831>
- Hardeland, R. (2013). Melatonin and the theories of aging: A critical appraisal of melatonin's role in antiaging mechanisms. *Journal of Pineal Research*, 55(4), 325–356. <https://doi.org/10.1111/jpi.12090>
- Hardeland, R. (2015). Melatonin and circadian oscillators in aging - A dynamic approach to the multiply connected players. In A. Yashin & S. Jazwinski (Eds.), *Aging and Health - A Systems Biology Perspective* (Vol. 40, pp. 128–140). <https://doi.org/10.1159/000364975>
- Hardeland, R., Madrid, J. A., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2012). Melatonin, the circadian multioscillator system and health: The need for detailed analyses of peripheral melatonin signaling. *Journal of Pineal Research*, 52(2), 139–166. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00934.x>
- Hardeland, R., & Poeggeler, B. (2003). Non-vertebrate melatonin. *Journal of Pineal Research*, 34(4), 233–241. <https://doi.org/10.1034/j.1600-079X.2003.00040.x>
- Harrington, M. E. (1997). The ventral lateral geniculate nucleus and the intergeniculate leaflet: Interrelated structures in the visual and circadian systems. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 21(5), 705–727. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(96\)00019-X](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(96)00019-X)
- Hashimoto, S., Kohsaka, M., Nakamura, K., Honma, H., Honma, S., & Honma, K. I. (1997). Midday exposure to bright light changes the circadian organization of plasma melatonin rhythm in humans. *Neuroscience Letters*, 221(2–3), 89–92. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(96\)13291-2](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(96)13291-2)
- Hattar, S., Liao, H. W., Takao, M., Berson, D. M., & Yau, K. W. (2002). Melanopsin-containing retinal ganglion cells: Architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science*, 295(5557), 1065–1070. <https://doi.org/10.1126/science.1069609>
- Hébert, M., Martin, S., Lee, C., & Eastman, C. (2002). The effects of prior light history on the suppression of melatonin by light in humans. *Journal of Pineal Research*, 33(4), 198–203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178059>
- Hoffman, R. A., & Reiter, R. J. (1965). Pineal Gland : Influence on Gonads of Male Hamsters.

Science, 148(3677), 1609–1611.

Hofstra, W. A., & de Weerd, A. W. (2008). How to assess circadian rhythm in humans: A review of literature. *Epilepsy and Behavior*, 13(3), 438–444.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2008.06.002>

Johnson, C. H. (1992). Phase Response Curves: What can they tell us about circadian clock? In T. Hiroshige & K. Honma (Eds.), *Circadian clocks for Cell to Human*. Sapporo: Hokkaido University Press.

Joyce, D. S., Feigl, B., Cao, D., & Zele, A. J. (2015). Temporal characteristics of melanopsin inputs to the human pupil light reflex. *Vision Research*, 107, 58–66.
<https://doi.org/10.1016/j.visres.2014.12.001>

Jung, C. H., Kim, E. M., Park, J. K., Hwang, S. G., Moon, S. K., Kim, W. J., & Um, H. D. (2013). Bmal1 suppresses cancer cell invasion by blocking the phosphoinositide 3-kinase-Akt-MMP-2 signaling pathway. *Oncology Reports*, 29(6), 2109–2113.
<https://doi.org/10.3892/or.2013.2381>

Kantermann, T., Juda, M., Merrow, M., & Roenneberg, T. (2007). The Human Circadian Clock's Seasonal Adjustment Is Disrupted by Daylight Saving Time. *Current Biology*, 17(22), 1996–2000. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.10.025>

Kaupila, A., Kivelä, A., Pakarinen, A., & Vakkuri, O. (1987). Inverse seasonal relationship between melatonin and ovarian activity in humans in a region with a strong seasonal contrast in luminosity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 65(5), 823–828.
<https://doi.org/10.1210/jcem-65-5-823>

Khalsa, S. B. S., Jewett, M. E., Cajochen, C., & Czeisler, C. A. (2003). A phase response curve to single bright light pulses in human subjects. *Journal of Physiology*, 549(3), 945–952.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.040477>

Klein, K. E., Wegmann, H. M., & Hunt, B. I. (1972). Desynchronization of body temperature and performance circadian rhythm as a result of outgoing and homegoing transmeridian flights. *Aerospace Medicine*, 43, 119–132.

Knutsson, A., & Bøggild, H. (2000). Shiftwork and cardiovascular disease: Review of disease mechanisms. *Reviews on Environmental Health*, 15(4), 359–372.
<https://doi.org/10.1515/REVEH.2000.15.4.359>

- Ko, C. H., & Takahashi, J. S. (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human Molecular Genetics*, 15(2), 271–277. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl207>
- Kolla, B. P., & Auger, R. R. (2011). Jet lag and shift work sleep disorders: How to help reset the internal clock. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 78(10), 675–684. <https://doi.org/10.3949/ccjm.78a.10083>
- Kolodyazhniy, V., Späti, J., Frey, S., Götz, T., Wirz-justice, A., Kräuchi, K., ... Wilhelm, H. (2011). Estimation of Human Circadian Phase via a Multi-Channel Ambulatory Monitoring System and a Multiple Regression Model. *Journal of Biological Rhythms*, 26(1), 55–67. <https://doi.org/10.1177/0748730410391619>
- Kondratov, R. V. (2007). A role of the circadian system and circadian proteins in aging. *Ageing Research Reviews*, 6(1), 12–27. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2007.02.003>
- Kozaki, T., Kubokawa, A., Taketomi, R., & Hatae, K. (2016). Light-induced melatonin suppression at night after exposure to different wavelength composition of morning light. *Neuroscience Letters*, 616, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.12.063>
- Kräuchi, K. (2002). How is the circadian rhythm of core body temperature regulated? *Clinical Autonomic Research*, 12(3), 147–149. <https://doi.org/10.1007/s10286-002-0043-9>
- Kräuchi, K., Cajochen, C., & Wirz-Justice, A. (2005). Thermophysiologic aspects of the three-process-model of sleepiness regulation. *Clinics in Sports Medicine*, 24(2), 287–300. <https://doi.org/10.1016/j.csm.2004.12.009>
- Krauchi, K., & Deboer, T. (2010). The interrelationship between sleep regulation and thermoregulation. *Frontiers in Bioscience*, 15, 604–625.
- Lahti, T. A., Leppämäki, S., Lönnqvist, J., & Partonen, T. (2006). Transition to daylight saving time reduces sleep duration plus sleep efficiency of the deprived sleep. *Neuroscience Letters*, 406(3), 174–177. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.07.024>
- Lahti, T. A., Leppämäki, S., Lönnqvist, J., & Partonen, T. (2008). Transitions into and out of daylight saving time compromise sleep and the rest-activity cycles. *BMC Physiology*, 8(1), 2–7. <https://doi.org/10.1186/1472-6793-8-3>
- Lahti, T. A., Leppämäki, S., Ojanen, S. M., Haukka, J., Tuulio-Henriksson, A., Lönnqvist, J., & Partonen, T. (2006). Transition into daylight saving time influences the fragmentation of the rest-activity cycle. *Journal of Circadian Rhythms*, 4, 1–6.

<https://doi.org/10.1186/1740-3391-4-1>

- Lambe, M., & Cummings, P. (2000). The shift to and from daylight savings time and motor vehicle crashes. *Accident Analysis and Prevention*, 32(4), 609–611. [https://doi.org/10.1016/S0001-4575\(99\)00088-3](https://doi.org/10.1016/S0001-4575(99)00088-3)
- Lerner, A., Case, J., Takahashi, Y., Lee, T., & Mori, W. (1958). Isolation of melatonin, the pineal gland hormone factor the lightens melanocytes. *Communications to the Editor*, 934(2), 2907.
- Lewy, A. J., Cutler, N. L., & Sack, R. L. (1999). The Endogenous Melatonin Profile as a Marker for Circadian Phase Position. *Journal of Biological Rhythms*, 14(3), 227–236. <https://doi.org/10.1177/074873099129000641>
- Lewy, A. J., & Sack, R. L. (1989). The dim light melatonin onset as a marker for circadian phase position. *Chronobiology International*, 6(1), 93–102. <https://doi.org/10.3109/07420528909059144>
- Lewy, A. J., Sack, R. L., & Singer, C. M. (1985). Immediate and Delayed Effects of Bright Light on Human Melatonin Production: Shifting “Dawn” and “Dusk” Shifts the Dim Light Melatonin Onset (DLMO). *Annals of the New York Academy of Sciences*, 453(1), 253–259. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1985.tb11815.x>
- Lewy, A. J., Wehr, T. A., Goodwin, F. K., Newsome, D. A., & Markey, S. P. (1980). Light suppresses melatonin secretion in humans. *Science*, 210(4475), 1267–1269. <https://doi.org/10.1126/science.7434030>
- Lucas, R. J., Peirson, S. N., Berson, D. M., Brown, T. M., Cooper, H. M., Czeisler, C. A., ... Brainard, G. C. (2014). Measuring and using light in the melanopsin age. *Trends in Neurosciences*, 37(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.10.004>
- Madrid-Navarro, C. J., Escamilla-Sevilla, F., Mínguez-Castellanos, A., Campos, M., Ruiz-Abellán, F., Madrid, J. A., & Rol, M. A. (2018). Multidimensional circadian monitoring by wearable biosensors in Parkinson’s disease. *Frontiers in Neurology*, 9(MAR), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00157>
- Madrid, J. A., & Rol, M. A. (2006). *Cronobiología básica y clínica*. Editec@ red.
- Manfredini, R., Fabbian, F., Cappadona, R., & Modesti, P. A. (2018). Daylight saving time, circadian rhythms, and cardiovascular health. *Internal and Emergency Medicine*, 13(5),

641–646. <https://doi.org/10.1007/s11739-018-1900-4>

Mansbach, P. (2019). Phase Response Curve (PRC).

Mariani, A. P. (1983). Giant bistratified bipolar cells in monkey retina. *The Anatomical Record*, 206(2), 215–220. <https://doi.org/10.1002/ar.1092060210>

Markwell, E. L., Feigl, B., & Zele, A. J. (2010). Intrinsically photosensitive melanopsin retinal ganglion cell contributions to the pupillary light reflex and circadian rhythm. *Clinical and Experimental Optometry*, 93(3), 137–149. <https://doi.org/10.1111/j.1444-0938.2010.00479.x>

Marques, M. D., & Waterhouse, J. M. (1994). Masking and the evolution of circadian rhythmicity. *Chronobiology International*, 11(3), 146–155. <https://doi.org/10.3109/07420529409057234>

Martinez-Nicolas, A., Almada-Pagan, P. F., Martinez-Madrid, M. J., Arguelles-Prieto, R., Ortega-Sabater, C., Fernandez-Ortiz, M., ... Rol, M. A. (2018). Ageing of the circadian system. From monitoring to chronoenhancement. *Approaches to Ageing Control*, 22, 62–72.

Martinez-Nicolas, A., Ortiz-Tudela, E., Madrid, J. A., & Rol, M. A. (2011). Crosstalk between environmental light and internal time in humans. *Chronobiology International*, 28(7), 617–629. <https://doi.org/10.3109/07420528.2011.593278>

Masland, R. H. (2001). The fundamental plan of the retina. *Nature Neuroscience*, 4(9), 877–886. <https://doi.org/10.1038/nn0901-877>

McDougall, D. H., & Gamlin, P. D. (2010). The influence of intrinsically-photosensitive retinal ganglion cells on the spectral sensitivity and response dynamics of the human pupillary light reflex. *Vision Research*, 50(1), 72–87. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2009.10.012>

McIntyre, I. M., Norman, T. R., Burrows, G. D., & Armstrong, S. M. (1989). Human Melatonin Suppression by Light is Intensity Dependent. *Journal of Pineal Research*, 6(2), 149–156. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.1989.tb00412.x>

Mendoza, J. (2007). Circadian clocks: Setting time by food. *Journal of Neuroendocrinology*, 19(2), 127–137. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2006.01510.x>

Minors, D. S., Waterhouse, J. M., & Wirz-Justice, A. (1991). A human phase-response curve to light. *Neuroscience Letters*, 133(1), 36–40.

<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.003>

- Minors, D. S., & Waterhouse, J. M. (1989). Masking in humans: The problem and some attempts to solve it. *Chronobiology International*, 6(1), 29–53. <https://doi.org/10.3109/07420528909059140>
- Mistlberger, R. E., & Skene, D. J. (2004). Social influences on mammalian circadian rhythms: Animal and human studies. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 79(3), 533–556. <https://doi.org/10.1017/S1464793103006353>
- Monk, T. H., & Aplin, L. C. (1980). Spring and Autumn daylight saving time changes: Studies of adjustment in sleep timings, mood, and efficiency. *Ergonomics*, 23(2), 167–178. <https://doi.org/10.1080/00140138008924730>
- Monk, T. H., & Folkard, S. (1976). Adjusting to the changes to and from Daylight Saving Time. *Nature*, 261(5562), 688–689. <https://doi.org/10.1038/261688a0>
- Moore, R. Y. (1995). Neural control of the pineal gland. *Behavioural Brain Research*, 73(1–2), 125–130. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(96\)00083-6](https://doi.org/10.1016/0166-4328(96)00083-6)
- Morgenthaler, T. I., Lee-Chiong, T., Alessi, C., Friedman, L., Aurora, R. N., Boehlecke, B., ... Zak, R. (2017). Practice Parameters for the Clinical Evaluation and Treatment of Circadian Rhythm Sleep Disorders. *Sleep*, 30(11), 1445–1459. <https://doi.org/10.1093/sleep/30.11.1445>
- Morin, L. P., & Allen, C. N. (2006). The circadian visual system, 2005. *Brain Research Reviews*, 51(1), 1–60. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2005.08.003>
- Mormont, M. C., Langouët, A. M., Claustrat, B., Bogdan, A., Marion, S., Waterhouse, J., ... Lévi, F. (2002). Marker rhythms of circadian system function: A study of patients with metastatic colorectal cancer and good performance status. *Chronobiology International*, 19(1), 141–155. <https://doi.org/10.1081/CBI-120002593>
- Mrosovsky, N. (1999). Masking: history, definitions, and measurement. *Chronobiology International*, 16(4), 415–429.
- Mullenders, J., Fabius, A. W. M., Madiredjo, M., Bernards, R., & Beijersbergen, R. L. (2009). A large scale shRNA barcode screen identifies the circadian clock component ARNTL as putative regulator of the p53 tumor suppressor pathway. *PLoS ONE*, 4(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004798>

- Münch, M., Knoblauch, V., Blatter, K., Schröder, C., Schnitzler, C., Kräuchi, K., ... Cajochen, C. (2005). Age-related attenuation of the evening circadian arousal signal in humans. *Neurobiology of Aging*, 26(9), 1307–1319. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.03.004>
- Myers, B. L., & Badia, P. (1995). Changes in circadian rhythms and sleep quality with aging: Mechanisms and interventions. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 19(4), 553–571. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(95\)00018-6](https://doi.org/10.1016/0149-7634(95)00018-6)
- Nagare, R., Rea, M. S., Plitnick, B., & Figueiro, M. G. (2019a). Effect of White Light Devoid of “Cyan” Spectrum Radiation on Nighttime Melatonin Suppression Over a 1-h Exposure Duration. *Journal of Biological Rhythms*, 34(2), 195–204. <https://doi.org/10.1177/0748730419830013>
- Nagare, R., Rea, M. S., Plitnick, B., & Figueiro, M. G. (2019b). Nocturnal Melatonin Suppression by Adolescents and Adults for Different Levels, Spectra, and Durations of Light Exposure. *Journal of Biological Rhythms*, 34(2), 178–194. <https://doi.org/10.1177/0748730419828056>
- Nakanishi-Ueda, T., Majima, H. J., Watanabe, K., Ueda, T., Indo, H. P., Suenaga, S., ... Koide, R. (2013). Blue LED light exposure develops intracellular reactive oxygen species, lipid peroxidation, and subsequent cellular injuries in cultured bovine retinal pigment epithelial cells. *Free Radical Research*, 47(10), 774–780. <https://doi.org/10.3109/10715762.2013.829570>
- Nam, H. J., Boo, K., Kim, D., Han, D. H., Choe, H. K., Kim, C. R., ... Baek, S. H. (2014). Phosphorylation of LSD1 by PKC α Is Crucial for Circadian Rhythmicity and Phase Resetting. *Molecular Cell*, 53(5), 791–805. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.01.028>
- Navara, K. J., & Nelson, R. J. (2007). The dark side of light at night: Physiological, epidemiological, and ecological consequences. *Journal of Pineal Research*, 43(3), 215–224. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00473.x>
- Ortiz-Tudela, E. (2014). *Ambulatory Assessment of the Functional Status of the Human Circadian System*. University of Murcia.
- Ortiz-Tudela, E., Bonmati-Carrion, M. D. L. A., De la Fuente, M., & Mendiola, P. (2012). La cronodisrupción como causa de envejecimiento. *Revista Española de Geriatria y Gerontología*, 47(4), 168–173. <https://doi.org/10.1016/j.regg.2011.09.013>

- Ortiz-Tudela, E., Martinez-Nicolas, A., Albares, J., Segarra, F., Campos, M., Estivill, E., ... Madrid, J. A. (2014). Ambulatory Circadian Monitoring (ACM) based on Thermometry, motor Activity and body Position (TAP): A comparison with polysomnography. *Physiology and Behavior*, 126, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.12.009>
- Ortiz-Tudela, E., Martinez-Nicolas, A., Campos, M., Rol, M. Á., & Madrid, J. A. (2010). A new integrated variable based on thermometry, actimetry and body position (TAP) to evaluate circadian system status in humans. *PLoS Computational Biology*, 6(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000996>
- Panda, S., Nayak, S. K., Campo, B., Walker, J. R., Hogenesch, J. B., & Jegla, T. (2005). Illumination of the Melanopsin Signaling Pathway. *Science*, 307(5709), 600–604.
- Pandi-Perumal, S. R., Smits, M., Spence, W., Srinivasan, V., Cardinali, D. P., Lowe, A. D., & Kayumov, L. (2007). Dim light melatonin onset (DLMO): A tool for the analysis of circadian phase in human sleep and chronobiological disorders. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 31(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2006.06.020>
- Pandi-Perumal, S. R., Srinivasan, V., Maestroni, G. J. M., Cardinali, D. P., Poeggeler, B., & Hardeland, R. (2006). Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS Journal*, 273(13), 2813–2838. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05322.x>
- Park, J. C., Moura, A. L., Raza, A. S., Rhee, D. W., Kardon, R. H., & Hood, D. C. (2011). Toward a clinical protocol for assessing rod, cone, and melanopsin contributions to the human pupil response. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 52(9), 6624–6635. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-7586>
- Pauley, S. M. (2004). Lighting for the human circadian clock: Recent research indicates that lighting has become a public health issue. *Medical Hypotheses*, 63(4), 588–596. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2004.03.020>
- Peirson, S., & Foster, R. G. (2006). Melanopsin: Another way of signaling light. *Neuron*, 49(3), 331–339. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.01.006>
- Pittendrigh, C. S. (1954). On Temperature Independence in the Clock System Controlling Emergence Time in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 40(10), 1018–1029. <https://doi.org/10.1073/pnas.40.10.1018>

- Pittendrigh, C. S. (1960). Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 25, 159–184. <https://doi.org/10.1101/SQB.1960.025.01.015>
- Pittendrigh, C. S. (1981). Circadian Systems: General Perspective. In J. Aschoff (Ed.), *Handbook of Behavioral Neurobiology* (pp. 57–80). https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6552-9_5
- Provencio, I., Rodriguez, I. R., Jiang, G., Hayes, W. P., Moreira, E. F., & Rollag, M. D. (2000). A Novel Human Opsin in the Inner Retina. *The Journal of Neuroscience*, 20(2), 600–605. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-02-00600.2000>
- Rahman, S. A., Marcu, S., Shapiro, C. M., Brown, T. J., & Casper, R. F. (2011). Spectral modulation attenuates molecular, endocrine, and neurobehavioral disruption induced by nocturnal light exposure. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 300(3), 518–527. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00597.2010>
- Ramsey, K. M., Yoshino, J., Brace, C. S., Abrassart, D., Kobayashi, Y., Marcheva, B., ... Bass, J. (2009). Circadian Clock Feedback Cycle Through NAMPT-Mediated NAD⁺ Biosynthesis. *Science*, 324(5927), 651–654. <https://doi.org/10.1126/science.1171641>
- Rea, M. S., & Figueiro, M. (2018). Light as a circadian stimulus for architectural lighting. *Lighting Research and Technology*, 50(4), 497–510. <https://doi.org/10.1177/1477153516682368>
- Rea, M. S., Figueiro, M., Bierman, A., & Hamner, R. (2012). Modelling the spectral sensitivity of the human circadian system. *Lighting Research and Technology*, 44(4), 386–396. <https://doi.org/10.1177/1477153511430474>
- Rea, M. S., Figueiro, M. G., Bierman, A., & Bullough, J. D. (2010). Circadian Light. *Journal of Circadian Rhythms*, 8(2), 77–80. <https://doi.org/10.1186/1740-3391-8-2>
- Rea, M. S., Figueiro, M. G., & Bullough, J. D. (2002). Circadian photobiology: An emerging framework for lighting practice and research. *Lighting Research & Technology*, 34(3), 177–187. <https://doi.org/10.1191/1365782802lt057oa>
- Rea, M. S., Figueiro, M. G., Bullough, J. D., & Bierman, A. (2005). A model of phototransduction by the human circadian system. *Brain Research Reviews*, 50(2), 213–228. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2005.07.002>
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Osuna, C., & Gatto, E. (2000). Actions of Melatonin in the Reduction of

- Oxidative Stress. *Journal of Biomedical Science*, 3900(210), 444–458.
- Reiter, R., Tan, D., Sanchez-Barcelo, E., Mediavilla, M., Gitto, E., & Korkmaz, A. (2011). Circadian mechanisms in the regulation of melatonin synthesis: disruption with light at night and the pathophysiological consequences. *Journal of Experimental and Integrative Medicine*, 1(1), 13–22. <https://doi.org/10.5455/jeim.101210.ir.001>
- Reiter, Russel J., Tan, D.-X., Korkmaz, A., Erren, T. C., Piekarski, C., Tamura, H., & Manchester, L. C. (2012). Light at Night, Chronodisruption, Melatonin Suppression, and Cancer Risk: A Review. *Critical ReviewsTM in Oncogenesis*, 13(4), 303–328. <https://doi.org/10.1615/critrevoncog.v13.i4.30>
- Reiter, Russel J., Tan, D. X., Korkmaz, A., & Ma, S. (2012). Obesity and metabolic syndrome: Association with chronodisruption, sleep deprivation, and melatonin suppression. *Annals of Medicine*, 44(6), 564–577. <https://doi.org/10.3109/07853890.2011.586365>
- Rietveld, W. J., Minors, D. S., & Waterhouse, J. M. (1993). Circadian rhythms and masking: An overview. *Chronobiology International*, 10(4), 306–312. <https://doi.org/10.1080/07420529309059713>
- Robles, M. S., Boyault, C., Knutti, D., Padmanabhan, K., & Weitz, C. J. (2010). Identification of RACK1 and protein kinase C α as integral components of the mammalian circadian clock. *Science*, 327(5964), 463–466. <https://doi.org/10.1126/science.1180067>
- Rodriguez-Naranjo, M. I., Torija, M. J., Mas, A., Cantos-Villar, E., & Garcia-Parrilla, M. D. C. (2012). Production of melatonin by *Saccharomyces* strains under growth and fermentation conditions. *Journal of Pineal Research*, 53(3), 219–224. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2012.00990.x>
- Rodríguez, M. I., Carretero, M., Escames, G., López, L. C., Maldonado, M. D., Tan, D. X., ... Acuña-Castroviejo, D. (2007). Chronic melatonin treatment prevents age-dependent cardiac mitochondrial dysfunction in senescence-accelerated mice. *Free Radical Research*, 41(1), 15–24. <https://doi.org/10.1080/10715760600936359>
- Roenneberg, T., Daan, S., & Merrow, M. (2003). The Art of Entrainment. *Journal of Biological Rhythms*, 18(3), 183–194. <https://doi.org/10.1177/0748730403253393>
- Roenneberg, T., & Foster, R. G. (1997). Twilight Times: Light and the Circadian System. *Photochemistry and Photobiology*, 66(5), 549–561.

- Rüger, M., St Hilaire, M. A., Brainard, G. C., Khalsa, S. B. S., Kronauer, R. E., Czeisler, C. A., & Lockley, S. W. (2013). Human phase response curve to a single 6.5 h pulse of short-wavelength light. *Journal of Physiology*, 591(1), 353–363. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.239046>
- Sack, R. L., Lewy, A. J., Erb, D. L., Vollmer, W. M., & Singer, C. M. (1986). Human melatonin decreases with age. *Journal of Pineal Research*, 3, 379–388.
- Saper, C. B., Chou, T. C., & Scammell, T. E. (2001). The sleep switch: Hypothalamic control of sleep and wakefulness. *Trends in Neurosciences*, 24(12), 726–731. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)02002-6](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)02002-6)
- Saper, C. B., Lu, J., Chou, T. C., & Gooley, J. (2005). The hypothalamic integrator for circadian rhythms. *Trends in Neurosciences*, 28(3), 152–157. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.12.009>
- Saper, C. B., Scammell, T. E., & Lu, J. (2005). Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature*, 437(7063), 1257–1263. <https://doi.org/10.1038/nature04284>
- Sarabia, J. A., Rol, M. A., Mendiola, P., & Madrid, J. A. (2008). Circadian rhythm of wrist temperature in normal-living subjects A candidate of new index of the circadian system. *Physiology & Behavior*, 95(4), 570–580. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.08.005>
- Sasseville, A., & Hébert, M. (2010). Using blue-green light at night and blue-blockers during the day to improves adaptation to night work: A pilot study. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 34(7), 1236–1242. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.06.027>
- Schernhammer, E. S., Speizer, F. E., Walter, C., Hunter, D. J., & Colditz, G. A. (2001). Rotating Night Shifts and Risk of Breast Cancer in Women Participating in the Nurses ' Health Study. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(20), 1563–1568. <https://doi.org/10.1093/jnci/93.20.1563>
- Schernhammer, E. S., Speizer, F. E., Walter, C., Hunter, D. J., Fuchs, C. S., & Colditz, G. A. (2003). Night-shift work and risk of colorectal cancer in the nurse's health study. *Journal of the National Cancer Institute*, 95(11), 825–828.
- Shang, Y. M., Wang, G. S., Sliney, D., Yang, C. H., & Lee, L. L. (2014). White light-emitting diodes (LEDs) at domestic lighting levels and retinal injury in a rat model. *Environmental Health*

Perspectives, 122(3), 269–276. <https://doi.org/10.1289/ehp.1307294>

- Shapiro, C. M., Blake, F., Fossey, E., & Adams, B. (1990). Daylight saving time in psychiatric illness. *Journal of Affective Disorders*, 19(3), 177–181. [https://doi.org/10.1016/0165-0327\(90\)90089-Q](https://doi.org/10.1016/0165-0327(90)90089-Q)
- Silman, R. E., Leone, R. M., Hooper, R. J. L., & Preece, M. A. (1979). Melatonin, the pineal gland and human puberty [19]. *Nature*, 282(5736), 301–303. <https://doi.org/10.1038/282301a0>
- Simonneaux, V., & Ribelayga, C. (2003). Generation of the melatonin endocrine message in mammals: A review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacological Reviews*, 55(2), 325–395. <https://doi.org/10.1124/pr.55.2.2>
- Slominski, A., Fischer, T. W., Zmijewski, M. A., Wortsman, J., Semak, I., Zbytek, B., ... Tobin, D. J. (2005). On the Role of Melatonin in Skin Physiology and Pathology M. *Endocrine*, 27(2), 137–148. <https://doi.org/10.1385/ENDO:27:2:137>.
- Smith, M. R., & Eastman, C. I. (2009). Phase delaying the human circadian clock with blue-enriched polychromatic light. *Chronobiology International*, 26(4), 709–725. <https://doi.org/10.1080/07420520902927742>
- St Hilaire, M. A., Gooley, J. J., Khalsa, S. B. S., Kronauer, R. E., Czeisler, C. A., & Lockley, S. W. (2012). Human phase response curve to a 1 h pulse of bright white light. *Journal of Physiology*, 590(13), 3035–3045. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.227892>
- Stokkan, A. K., Yamazaki, S., Tei, H., Sakaki, Y., Stokkan, K., Yamazaki, S., & Tei, H. (2001). Entrainment of the Circadian Clock in the Liver by Feeding. *Science*, 291(5503), 490–493.
- Stratmann, M., & Schibler, U. (2006). Properties, entrainment, and physiological functions of mammalian peripheral oscillators. *Journal of Biological Rhythms*, 21(6), 494–506. <https://doi.org/10.1177/0748730406293889>
- Szczepanik, M. (2007). Melatonin and its influence on immune system. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 58(SUPPL. 6), 115–124.
- Tarquini, R., Carbone, A., Martinez, M., & Mazzocchi, G. (2019). Daylight saving time and circadian rhythms in the neuro-endocrine-immune system: impact on cardiovascular health. *Internal and Emergency Medicine*, 14(1), 17–19. <https://doi.org/10.1007/s11739-018-1984-x>

- Thapan, K., Arendt, J., & Skene, D. J. (2001). An action spectrum for melatonin suppression: evidence for a novel non-rod, non-cone photoreceptor system in humans. *Journal of Physiology*, 535(1), 261–267.
- Tonetti, L., Erbacci, A., Fabbri, M., Martoni, M., & Natale, V. (2013). Effects of transitions into and out of daylight saving time on the quality of the sleep/wake cycle: An actigraphic study in healthy university students. *Chronobiology International*, 30(10), 1218–1222. <https://doi.org/10.3109/07420528.2013.812651>
- Touitou, Y., & Haus, E. (1992). *Biological rhythms in clinical and laboratory medicine* (Y. Touitou & E. Haus, Eds.). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Touitou, Y., Reinberg, A., & Touitou, D. (2017). Association between light at night, melatonin secretion, sleep deprivation, and the internal clock: Health impacts and mechanisms of circadian disruption. *Life Sciences*, 173, 94–106. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.02.008>
- 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 in Clinical Neuroscience*, 14(4), 381–399.
- Trejo, L. J., & Cicerone, C. M. (1984). Cells in the pretectal olivary nucleus are in the pathway for the direct light reflex of the pupil in the rat. *Brain Research*, 300(1), 49–62. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)91340-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(84)91340-4)
- Turner, P. L., & Mainster, M. A. (2008). Circadian photoreception: Ageing and the eye's important role in systemic health. *British Journal of Ophthalmology*, 92(11), 1439–1444. <https://doi.org/10.1136/bjo.2008.141747>
- Ueda, H. R., Hayashi, S., Chen, W., Sano, M., Machida, M., Shigeyoshi, Y., ... Hashimoto, S. (2005). System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nature Genetics*, 37(2), 187–192. <https://doi.org/10.1038/ng1504>
- Van Bommel, W. J. M. (2006). Non-visual biological effect of lighting and the practical meaning for lighting for work. *Applied Ergonomics*, 37(4 SPEC. ISS.), 461–466. <https://doi.org/10.1016/j.apergo.2006.04.009>
- Van Someren, E. J. W. (2000). More than a marker: Interaction between the circadian regulation of temperature and sleep, age-related changes, and treatment possibilities. *Chronobiology International*, 17(3), 313–354. <https://doi.org/10.1081/CBI-100101050>

- Van Someren, E. J. W. (2004). Sleep propensity is modulated by circadian and behavior-induced changes in cutaneous temperature. *Journal of Thermal Biology*, 29(7-8 SPEC. ISS.), 437–444. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2004.08.003>
- Van Someren, E. J. W., & Nagtegaal, E. (2007). Improving melatonin circadian phase estimates. *Sleep Medicine*, 8(6), 590–601. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2007.03.012>
- Van Someren, E. J. W., & Riemersma-Van Der Lek, R. F. (2007). Live to the rhythm, slave to the rhythm. *Sleep Medicine Reviews*, 11(6), 465–484. <https://doi.org/10.1016/j.smr.2007.07.003>
- Varughese, J., & Allen, R. P. (2001). Fatal accidents following changes in daylight savings time: The American experience. *Sleep Medicine*, 2(1), 31–36. [https://doi.org/10.1016/S1389-9457\(00\)00032-0](https://doi.org/10.1016/S1389-9457(00)00032-0)
- Viswanathan, A. N., Hankinson, S. E., & Schernhammer, E. S. (2007). Night shift work and the risk of endometrial cancer. *Cancer Research*, 67(21), 10618–10622. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2485>
- Voultsios, A., Kennaway, D. J., & Dawson, D. (1997). Salivary Melatonin as a Circadian Phase Marker: Validation and Comparison to Plasma Melatonin. *Journal of Biological Rhythms*, 12(5), 457–466. <https://doi.org/10.1177/074873049701200507>
- Waterhouse, J. M., & DeCoursey, P. J. (2004). The relevance of circadian rhythms for human welfare Title. In J.C. Dunlap, J. J. Loros, & P. J. DeCoursey (Eds.), *Chronobiology: Biological Timekeeping* (pp. 325–356). Sunderland, MA (USA): Sinauer Associates.
- Waterhouse, J. M., Drust, B., Weinert, D., Edwards, B., Gregson, W., Atkinson, G., ... Reilly, T. (2005). The circadian rhythm of core temperature: Origin and some implications for exercise performance. *Chronobiology International*, 22(2), 207–225. <https://doi.org/10.1081/CBI-200053477>
- Waterhouse, J. M., Reilly, T., Atkinson, G., & Edwards, B. (2007). Jet lag: trends and coping strategies. *Lancet*, 369(9567), 1117–1129. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60529-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60529-7)
- Wilkinson-Berka, J. L. (2004). Diabetes and retinal vascular disorders: Role of the renin-angiotensin system. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 6(15), 1–18. <https://doi.org/10.1017/S1462399404008129>

- Witting, W., Kwa, I. H., Eikelenboom, P., Mirmiran, M., & Swaab, D. F. (1990). Alterations in the circadian rest-activity rhythm in aging and Alzheimer's Disease. *Biological Psychiatry*, 27, 563–572. [https://doi.org/10.1016/0006-3223\(90\)90523-5](https://doi.org/10.1016/0006-3223(90)90523-5)
- Wittmann, M., Dinich, J., Mellow, M., & Roenneberg, T. (2006). Social jetlag: Misalignment of biological and social time. *Chronobiology International*, 23(1–2), 497–509. <https://doi.org/10.1080/07420520500545979>
- Wright, H. R., & Lack, L. C. (2001). Effect of light wavelength on suppression and phase delay of the melatonin rhythm. *Chronobiology International*, 18(5), 801–808. <https://doi.org/10.1081/CBI-100107515>
- Wright, H. R., Lack, L. C., & Partridge, K. J. (2001). Light emitting diodes can be used to phase delay the melatonin rhythm. *Journal of Pineal Research*, 31(4), 350–355. <https://doi.org/10.1034/j.1600-079X.2001.310410.x>
- Yang, X., Wood, P. A., Ansell, C. M., Quiton, D. F. T., Oh, E. Y., Du-Quiton, J., & Hrushesky, W. J. M. (2009). The circadian clock gene *per1* suppresses cancer cell proliferation and tumor growth at specific times of day. *Chronobiology International*, 26(7), 1323–1339. <https://doi.org/10.3109/07420520903431301>
- Yau, K. W., & Hardie, R. C. (2009). Phototransduction Motifs and Variations. *Cell*, 139(2), 246–264. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.029>
- Zeitzer, J. M., Dijk, D. J., Kronauer, R. E., Brown, E. N., & Czeisler, C. A. (2000). Sensitivity of the human circadian pacemaker to nocturnal light: Melatonin phase resetting and suppression. *Journal of Physiology*, 526(3), 695–702. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00695.x>
- Zhou, Q. Y., & Cheng, M. Y. (2005). Prokineticin 2 and circadian clock output. *FEBS Journal*, 272(22), 5703–5709. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04984.x>

7. ANEXO

7.1. SCIENTIFIC PUBLICATIONS

1. Bonmati-Carrion MA, **Arguelles-Prieto R**, Martinez-Madrid MJ, et al. Protecting the melatonin rhythm through circadian healthy light exposure. *Int J Mol Sci*. 2014;15(12). doi:10.3390/ijms151223448
2. **Arguelles-Prieto R**, Bonmati-Carrion MA. Melatonina, la hormona de la noche. *Rev Eubacteria*. 2015;33:16-21.
3. Bonmati-Carrion MA, Arguelles-Prieto R. La luz en el sistema circadiano. *Rev Eubacteria*. 2015;33:9-15.
4. Argüelles JC, Argüelles-Prieto R. Are the editors responsible for our obsession with the impact factor? *MBio*. 2017;8(6). doi:10.1128/mBio.02019-17
5. Martinez-Nicolas A, Almaida-Pagan PF, Martinez-Madrid MJ, Arguelles-Prieto R, et al. Ageing of the circadian system. From monitoring to chronoenhancement. *Approaches to Ageing Control*. 2018;22:62-72.
6. Argüelles JC, Argüelles-Prieto R. The impact factor: implications for research policy, editorial rules and scholarly reputation. *FEMS Microbiol Lett*. 2019;366(11):10-12. doi:10.1093/femsle/fnz132
7. Arguelles-Prieto R, Bonmati-Carrion M-A, Rol MA, Madrid JA. Determining Light Intensity, Timing and Type of Visible and Circadian Light From an Ambulatory Circadian Monitoring Device. *Front Physiol*. 2019;10(June):1-10. doi:10.3389/fphys.2019.00822
8. Bonmati-Carrión MA, Padilla J, Arguelles-Prieto R, Osterholm AM, Reynolds JR, Madrid JA, Rol MA. Electrochromic selective filtering of chronodisruptive visible wavelengths. 2019. Scientific Reports. (IN PRESS).

7.2. COMMUNICATIONS TO NATIONAL AND INTERNATIONAL CONGRESSES, WORKSHOPS AND SEMINARS

1. Arguelles-Prieto R., Martinez-Nicolas A., Bonmati-Carrion M.A., Rol M.A., Madrid J.A. (2013). Circadian Healthy Lights: Biological Assessment. First International Congress of Young Researches from the Mediterranean. Murcia, Spain.
2. Arguelles-Prieto R., Bonmati-Carrion M.A., Rol M.A., Madrid J.A. (2014). Presentation of Cronolab working areas. First Annual Meeting of Spanish Network of Light Pollution.

Cellers, Spain.

3. Argüelles-Prieto R., Bonmati-Carrion M.A., Rol M.A., Madrid J.A. (2016). Development and validation of an assessment method for circadian lighting. II PhD Meeting from University of Murcia. Murcia, Spain.
4. Argüelles-Prieto R., Bonmati-Carrion M.A., Rol M.A., Madrid J.A. (2016). Pupillometry applied to light assessment. IV Conference of Research in Biology. Murcia, Spain.
5. Argüelles-Prieto R., Bonmati-Carrion M.A., Rol M.A., Madrid J.A. (2019). Determining light intensity, timing and type of visible and circadian light from an ambulatory circadian monitoring device. European Biological Rhythms Society. Lyon, France.

7.3. INTELLECTUAL PROPERTY RIGHTS REGISTRATION

1. Argüelles Prieto R., Bonmatí Carrión M.A., Rol de Lama M.A., Madrid Pérez J.A. (2019). KRONOLUZ: Método para evaluar fuentes de iluminación, según sus características espectrales y sus efectos sobre constancia del color, confort subjetivo y marcadores circadianos. (MU-447-2019).

7.4. STAYS IN LABORATORIES OUT OF SPAIN DURING THIS PHD

1. Institute of Neuroscience, University of Newcastle, Newcastle upon Tyne, United Kingdom.

Responsible researcher: Professor Anya Hurlbert.

Duration: 3 months (20/9/2016-20/12/2016).

7.5. RESEARCH PROJECTS SUPPORTING THE PRESENT PHD

- **32179** Scaling-up of and evidence-based intervention programme in older people with diabetes and frailty in.

Entidad: Comisión De Las Comunidades Europeas

Comienzo: 01/01/2019, fin: 31/12/2022

Investigador principal: Rol De Lama, M. D. L. A.

- **32547** Exposición a la luz azul y disrupción circadiana: nuevas perspectivas gracias a la monitorización con dispositivos vestibles.

Entidad: Ministerio De Ciencia, Innovación Y Universidades

Comienzo: 01/01/2019 ,fin: 31/12/2022

Investigadores principales: Rol De Lama, M. D. L. A.; Madrid Perez, J. A.

- **SAF2013-49132-C2-1-R** Respuestas circadianas y neurocomportamentales a la luz artificial saludable. Importancia en el bienestar; el trabajo a turnos y el envejecimiento.

Entidad/es financiadora/s: Ministerio de Economía y Competitividad Fecha de inicio-fin:

01/01/2014 - 31/12/2017

Nombres investigadores principales: Juan Antonio Madrid Pérez; María De Los Angeles Rol De Lama.

* **30898** Evaluación mediante sensores vestibles de la fragilidad circadiana y de hábitos circadianos saludables.

Entidad: Fundación General Csic

Comienzo: 03/08/2018 ,fin: 31/12/2019

Investigador Principal: Rol De Lama, M. D. L. A.

* **15328** Asesoría Circadiana.

Entidad: Entidad Confidencial

Comienzo: 20/06/2012 ,fin: 20/06/2023

Investigadores Principales: Madrid Perez, J. A.; Rol De Lama, M. D. L. A.

7.6. FUNDING

During her PhD and the writing of the Doctoral Thesis, Raquel Argüelles Prieto has been granted with a Spanish Ministry of Science PhD Scholarship FPU13/01421 (FPU: Formación de Profesorado Universitario), from January 2015 to December 2018 and a Researcher's contract by Fundación General CSIC from July 2019 to date.

8. RESUMEN EN ESPAÑOL

OBJETIVOS

El principal objetivo de esta Tesis Doctoral fue investigar los efectos de la luz, tanto natural como artificial, en el sistema circadiano humano. Para ello, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

1. Mejorar y validar las nuevas características de Kronowise® para permitir el registro no invasivo de luz visible y circadiana en condiciones de vida libre.
2. Desarrollar un algoritmo para diferenciar entre exposición a luz natural y artificial, así como para calcular la fotoestimulación circadiana y visible exactas.
3. Determinar la influencia de la temperatura de color correlacionada (CCT) de la luz en dos marcadores circadianos: inhibición de melatonina y reflejo pupilar a la luz, en voluntarios jóvenes y ancianos.
4. Investigar la posible relación entre la inhibición de la secreción de melatonina y el reflejo pupilar a la luz.
5. Desarrollar un método práctico para evaluar fuentes de iluminación artificial, basándose no solo en su potencia espectral y la correspondiente estimulación de los fotorreceptores circadianos, sino también en la discriminación cromática, la comodidad y los efectos sobre marcadores circadianos, como inhibición de melatonina y reflejo pupilar a la luz, en voluntarios sanos.
6. Explorar los efectos de una situación cronodisruptiva, como los cambios horarios de marzo y octubre, en la sincronización circadiana según la curva de respuesta de fase a la luz en condiciones de vida libre.

Capítulo 1. Determinación de la intensidad, el horario y el tipo de luz visible y circadiana a partir de un dispositivo de monitorización circadiana ambulatoria.

Durante las últimas décadas, el modo de vida las sociedades modernas ha modificado profundamente el ajuste temporal del sistema circadiano, principalmente debido al uso inapropiado de iluminación artificial y a la alta prevalencia del jet-lag social. Por lo tanto, se hace necesario diseñar herramientas prácticas y no invasivas para monitorizar ritmos circadianos marcadores pero también su principal sincronizador, el ciclo de luz-oscuridad, en condiciones de vida libre. El objetivo de este trabajo fue mejorar las capacidades del dispositivo de monitorización circadiana ambulatoria (ACM, Kronowise®) desarrollando un algoritmo que permita determinar la intensidad de la luz, el horario y la estimulación de luz circadiana, diferenciando entre luz visible, luz circadiana, luz infrarroja, así como discriminar entre distintas fuentes de luz (natural, artificial con alto contenido infrarrojo, artificial con bajo

contenido infrarrojo) en voluntarios en condiciones de vida libre. El dispositivo de ACM está provisto de tres sensores de luz: i) un sensor de amplio espectro (380-1100 nm); ii) un sensor infrarrojo (700-1100 nm) y iii) un sensor equipado con un filtro azul que mimetiza la curva de sensibilidad de la melanopsina y la curva de supresión de melatonina por luz. Para calibrar del dispositivo de ACM, la luz solar y diferentes fuentes de luz comerciales se midieron a cuatro distancias estandarizadas, tanto con un espectrorradiómetro (SPR) como con el dispositivo de ACM. La herramienta desarrollada por CIE S 026/E:2018 se utilizó para calcular la estimulación melanópica a partir de los datos medidos por el SPR. Aunque la correlación entre los datos brutos de iluminancia medidos con el ACM y el SPR eran bastante fuertes tanto para el espectro completo ($r = 0,946$, $p < 0,0001$) como para el canal circadiano ($r = 0,902$, $p < 0,0001$), se obtuvieron correlaciones aún más fuertes ($r = 0,997$, $p < 0,0001$ y $r = 0,998$, $p < 0,0001$, respectivamente) cuando las luces se clasificaron en tres grupos: natural, artificial con alto infrarrojo y artificial con bajo infrarrojo, y se aplicaron las correspondientes correlaciones lineales. Nuestros resultados muestran que el dispositivo de ACM provisto de los tres sensores de luz y el algoritmo desarrollado en este estudio permiten una detección exacta del tipo, la intensidad y el horario de luz tanto para luz visible como circadiana, junto con la monitorización simultánea de varios ritmos circadianos marcadores, que abren la posibilidad de explorar la sincronización por luz en grandes grupo poblacionales mientras mantiene su modo de vida habitual.

Capítulo 2. Efectos de la luz con alto y bajo contenido en azul sobre marcadores circadianos. Relación entre inhibición de melatonina y reflejo pupilar a la luz.

La vía de entrada que lleva la señal luminosa al sistema circadiano empieza en las células ganglionares de la retina intrínsecamente fotosensibles (ipRGCs). Esta vía de entrada, sin embargo, no solo está implicada en la sincronización del reloj central (núcleo supraquiasmático, SCN) sino que también es parcialmente responsable del reflejo pupilar a la luz (PLR). De entre todas las vías de salida del sistema circadiano, la secreción de melatonina es la mejor caracterizada. La síntesis de esta indolamina se suprime por acción de la luz, especialmente de aquellas longitudes de onda entre 460 y 480 nm. El modo de vida de las sociedades modernas ha dado lugar a la aparición de la disfunción circadiana o cronodisrupción, que está asociada con varios problemas de salud. La importancia de estas circunstancias hace esencial entender los efectos del espectro y la intensidad de la luz en marcadores circadianos. El principal objetivo de este trabajo fue determinar la influencia de la temperatura de color de la luz en dos marcadores circadianos: inhibición de melatonina y reflejo pupilar a la luz en personas jóvenes y ancianas. Además, también investigamos el

modelo teórico de inhibición de melatonina cuyas predicciones se ajusten mejor a nuestros resultados. Para ello, dieciséis voluntarios jóvenes y ocho ancianos fueron reclutados para participar en este estudio, y dos luces experimentales de diferente temperatura de color correlacionada (CCT) fueron empleadas (3000 K y 5700 K). La primera semana de estudio, los voluntarios llevaron un dispositivo de monitorización circadiana ambulatoria (ACM): Kronowise® para medir sus patrones habituales de exposición a luz. Para llevar a cabo la prueba de supresión de melatonina, se dio instrucciones a los participantes para seguir el protocolo de inicio de melatonina bajo luz tenue (DLMO) en su propia casa. EL mismo día de las dos semanas siguientes, fueron sometidos al protocolo de inhibición de melatonina en el laboratorio, llevando a cabo un diseño cruzado y aleatorizado para cada tipo de luz. El protocolo para medir el reflejo pupilar a la luz fue adaptado de Park et al. (2011), aplicando un estímulo luminoso de 1 segundo. Las respuestas pupilares a los 6 segundos (6S-PIPR) y a los 30 segundos (30S-PIPR) después del estímulo fueron medidas, al igual que el diámetro pupilar mínimo y la velocidad de contracción. Nuestros resultados produjeron supresión de melatonina significativa bajo ambas condiciones de luz en comparación con la condición de luz tenue (41,7 %, $p < 0,001$, t de Student = 6,687, grados de libertad = 21 para la luz de 5700 K, y 33,3 %, $p < 0,005$, t de Student = 3,852, grados de libertad = 21, para la luz de 3000 K), de acuerdo con las predicciones de los modelos teóricos (47 % para la luz de 5700 K y 44 % para la luz de 3000 K). Además, la luz de 5700K produjo una mayor contracción en 6S-PIPR (82,8 % para la luz de 5700 K vs. 87,5 % para la de 3000 K, $p < 0,001$, $F = 18,123$, grados de libertad = 22), y descubrimos que en los participantes ancianos, el diámetro mínimo fue menor (59,1 % vs. 68,5 % para los jóvenes, $p < 0,005$, $F = 12,157$, grados de libertad = 1) y la velocidad de contracción, más rápida (35,0 % vs. 26,3 % para los jóvenes, $p < 0,005$, $F = 12,683$, grados de libertad = 1) en comparación con los jóvenes. Nuestros resultados confirmaron que incluso la luz con menor contenido en radiación azul produjo inhibición de melatonina significativa. Por otro lado, mayor contenido en luz azul produjo mayor contracción en la respuesta pupilar después del estímulo luminoso que está regulada por las ipRGCs. En conclusión, ambas técnicas son útiles para analizar el impacto de la luz en el sistema circadiano, ya que proporcionan información diferente y complementaria.

Capítulo 3. Un nuevo método integral para evaluar fuentes de iluminación artificial basado en características físicas y en marcadores biológicos y psicológicos.

Hoy en día, se sabe que el correcto funcionamiento del sistema circadiano, incluyendo el mantenimiento del perfil de secreción de melatonina, requiere tanto exposición a luz brillante durante el día como oscuridad durante la noche. Sin embargo, parámetros como la intensidad,

el espectro, el horario y la duración de la exposición a la luz tienen efectos sobre el sistema circadiano. No obstante, solo recientemente hemos empezado a conocer los efectos dañinos para la salud humana causados por la cronodisrupción o el desajuste del orden temporal interno. Además, el confort subjetivo también debería ser una variable a tener en cuenta, puesto que ya en 1941, se definieran niveles altos y bajos de iluminación a los cuales la luz era considerada “agradable” para cada temperatura de color. El objetivo de este estudio fue desarrollar un método práctico para evaluar fuentes de iluminación artificial, basándose no solo en su potencia espectral y, por lo tanto, la correspondiente activación de los fotorreceptores circadianos, sino también en la discriminación cromática, el confort y los efectos circadianos. El protocolo fue dividido en tres partes: la primera consistió en un análisis físico de las fuentes de luz, donde el espectro y la intensidad en irradiancia se midieron con un espectrorradiómetro. Se emplearon las siguientes fuentes de luz: LED de 5700 K, LED de 3000 K, LED ámbar, cuatro configuraciones diferentes de LEDs monocromáticos rojo-verde-azul (RGB) y cuatro configuraciones de rojo-verde-violeta (RGV) generadas con un prototipo del Laboratorio de Cronobiología, lámpara de vapor de mercurio, lámpara incandescente y lámpara fluorescente. Se utilizaron 8 cartas Munsell de colores estándar (7.5R 6/4, 5Y 6/4, 5GY 6/8, 2.5G 6/6, 10BG 6/4, 5PB 6/8, 2.5P 6/8, 10P 6/8) para realizar la segunda parte del método: los test subjetivos y de discriminación cromática, donde un voluntario tenía que permanecer sentado en una habitación completamente blanca identificando las cartas de color bajo las diferentes fuentes de luz. También se requería que respondiera a un cuestionario sobre el confort que le producía la luz y el momento del día preferido para su uso. El último paso consistió en medir el efecto de la fuente de luz sobre dos marcadores circadianos: la inhibición de melatonina y el reflejo pupilar a la luz, empleando para ello los protocolos utilizados en el capítulo 2. Nuestros resultados demuestran que el método propuesto en este estudio es una herramienta adecuada para evaluar los efectos de cualquier fuente de iluminación en el sistema circadiano, puesto que aborda la valoración desde tres perspectivas diferentes que son complementarias e interdependientes, y además considera tanto variables objetivas como subjetivas.

Capítulo 4. Efectos del cambio horario sobre los ritmos circadianos humanos y la curva de respuesta de fase a la luz.

Varios estudios han investigado la relación del cambio horario (DST) con las alteraciones del sueño, las enfermedades psiquiátricas, los problemas cardiovasculares y el comportamiento. Sin embargo, muy pocos han monitorizado a los participantes mientras mantenían su estilo de vida habitual antes y después de los cambios de hora. Teniendo en cuenta que las transiciones

DST modifican el comportamiento humano y, por lo tanto, sus patrones de exposición a la luz, el objetivo de este estudio fue investigar esa relación considerando también el sueño y la curva de respuesta de fase humana a la luz. Para hacer eso, se reclutaron ocho adultos sanos para controlar su actividad, temperatura, sueño y exposición a la luz utilizando un dispositivo de monitorización circadiana ambulatoria: Kronowise®. El registro de datos comenzó una semana antes de cada transición DST y terminó una semana después. A continuación, se utilizó el software Kronoware 10.0 para obtener los siguientes parámetros: la hora central del período de tiempo de las cinco horas de máxima temperatura de la muñeca (M5) y de las cinco horas de mínimo tiempo en movimiento (L5), así como el inicio del sueño, el final del sueño, la duración del sueño y la intensidad de luz. La hora de M5 de la temperatura de la muñeca se empleó como tiempo circadiano 0 h, y las ondas medias diarias de intensidad de luz se calcularon y filtraron usando la curva de sensibilidad de secreción de melatonina a la luz. Después de eso, el equilibrio entre los avances y los retrasos de la curva de respuesta de fase a la luz se calculó individualmente antes y después de ambas transiciones DST. Para evaluar la desincronización interna, se comparó la hora de M5 de temperatura de la muñeca y L5 de tiempo en movimiento. Nuestros resultados mostraron que después de la transición de marzo no hubo diferencias significativas en los parámetros del sueño, pero después del cambio de octubre, los participantes se despertaron más de una hora más tarde que antes ($p < 0,005$, $t = -5,132$, $DF = 7$), y durmieron 1,09 horas más ($p < 0,05$, $t = -3,017$, $DF = 7$). Además, la hora de M5 tendió a avanzar después del cambio horario de marzo, a diferencia de la transición de octubre, donde la hora de M5 tendió a retrasarse en 0,42 horas, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Sobre el efecto de la exposición a la luz en la fase circadiana calculada a partir de las curvas de respuesta de fase, antes de la transición de primavera, el área bajo la curva de los avances de fase ascendió a una cantidad de 246 ± 37 (unidades arbitrarias), mientras que después del cambio de tiempo aumentaron con un total de 276 ± 42 (unidades arbitrarias) ($p = 0,6$, $t = -0,464$, $DF = 7$). Lo mismo ocurrió con los retrasos de fase, antes del horario de verano ascendieron a 410 ± 64 (unidades arbitrarias), y luego aumentaron a 465 ± 59 (unidades arbitrarias), aunque las diferencias no fueron significativas ($p = 0,5$, $t = -0,635$, $DF = 7$). Por el contrario, durante el cambio de otoño, lo más notable fue la disminución en los avances de fase después del cambio horario en comparación con la semana anterior, de 302 ± 57 (unidades arbitrarias) a 231 ± 59 (unidades arbitrarias). Sin embargo, las diferencias no fueron significativas ($p = 0,3$, $t = 1,094$, $DF = 7$). Con respecto a la desincronización interna, el cambio de marzo produjo una desincronización más alta que la transición de octubre, especialmente a lo largo de la hora de L5 del tiempo en movimiento. Estos resultados muestran que durante ambas transiciones, la exposición a la luz de la mañana

(en la zona de avance de fase) es la más influenciada por la nueva hora local, probablemente porque durante la tarde y la noche, el uso de iluminación artificial es predominante independientemente del cambio de hora. Hasta donde sabemos, éste es el primer estudio que monitoriza la exposición personal a la luz en participantes en condiciones naturales antes y después de los cambios horarios. Nuestros resultados reflejan que la transición de marzo actúa como un avance de fase y la adaptación es más difícil que la transición de octubre, ya que representa un retraso de fase, que es la tendencia natural del marcapasos central circadiano. Además, nuestros hallazgos reflejan la gran influencia de la iluminación artificial en los cambios de fase.

CONCLUSIONES

1. Kronowise® es un dispositivo de monitorización circadiana ambulatoria preciso y sensible para evaluar la exposición a luz de diferentes espectros.
2. El algoritmo desarrollado en esta Tesis Doctoral ha demostrado su validez para calcular directamente a partir de los datos de Kronowise® la exposición a luz visible y circadiana, así como para discriminar diferentes tipos de luz.
3. Un aumento en la temperatura de color de fuentes de iluminación comerciales produce un aumento en la inhibición de melatonina y una mayor contracción pupilar independientemente de la edad de los sujetos.
4. La inhibición de melatonina y el reflejo pupilar a la luz no se correlacionan a nivel individual. Por lo tanto, cada una de estas técnicas proporciona información complementaria sobre el impacto de las fuentes de luz en marcadores circadianos, y ambas deberían ser empleadas cuando se estudien los efectos circadianos de una luz.
5. El método de evaluación desarrollado en esta Tesis Doctoral constituye una herramienta integral para evaluar los efectos circadianos de cualquier fuente de luz, ya que incluye variables objetivas y subjetivas, así como medidas físicas y biológicas.
6. El cambio horario de marzo produce mayores alteraciones que el de otoño, avanzando y desincronizando los ritmos de temperatura de la piel y de actividad. El cambio horario de octubre, por el contrario, es comparable a un retraso de fase, y tiende a retrasar dichos ritmos y a mantener niveles similares en los avances y retrasos provocados por la exposición personal a luz. Este hecho hace que la adaptación al horario de invierno sea más fácil, ya que el retraso es la tendencia natural del sistema circadiano humano.

7. Los seres humanos pasan la mayor parte de su tiempo en interiores, utilizando luz artificial, y esto se refleja en las mínimas diferencias que aparecen en los avances y retrasos antes y después de los cambios horarios. Este hecho debería ser tenido en cuenta cuando se estudien situaciones que produzcan cronodisrupción y sus efectos, y se tomen decisiones con respecto a ellas.

CONCLUSIONES GENERALES

Tanto la luz natural como la iluminación artificial tienen efectos sobre el sistema circadiano humanos, y esta última es constituye una importante variable a considerar. Los sensores de luz de Kronowise® y nuestro algoritmo son herramientas útiles para evaluar estos efectos en condiciones de vida libre y en situaciones que puedan producir cronodisrupción, como los cambios horarios. El desarrollo de protocolos y medidas integrales y no invasivos nos ayudará a profundizar en el entendimiento de la sincronización circadiana y los mecanismos implicados en la cronodisrupción.

9. SUMMARY IN ENGLISH

OBJECTIVES

The main objective of this Doctoral Thesis was to investigate the effects of light, both natural and artificial, on the human circadian system. To do that, the following specific objectives were established:

1. To improve and validate new features of Kronowise® to allow the non-invasive recording of full visible and circadian light under free-living conditions.
2. To develop an algorithm to differentiate between natural and artificial light exposure as well as to calculate the precise full visible and circadian photostimulation.
3. To determine the influence of light correlated color temperature (CCT) on two circadian markers: melatonin inhibition and pupillary light reflex in young and aged people.
4. To explore the possible relationship between inhibition of melatonin secretion and pupil light reflex.
5. To develop a practical method to evaluate artificial lighting sources, based not only on their spectral power and thus, the corresponding activation of circadian photoreceptors, but also on chromatic discrimination, comfort and effects on circadian markers, such as melatonin inhibition and pupil light reflex on healthy volunteers.
6. To investigate the effects of a chronodisruptive situation, as March and October daylight saving time transitions, on circadian synchronization, in accordance to the phase response curve to light under real life conditions.

Chapter 1. Determining light intensity, timing and type of visible and circadian light from an ambulatory circadian monitoring device

During last decades, the way of life in modern societies has deeply modified the temporal adjustment of the circadian system, mainly due to the inappropriate use of artificial lighting and the high prevalence of social jet-lag. Therefore, it becomes necessary to design non-invasive and practical tools to monitor circadian marker rhythms but also its main synchronizer, the light-dark cycle under free-living conditions. The aim of this work was to improve the ambulatory circadian monitoring device (ACM, Kronowise®) capabilities by developing an algorithm that allows to determine light intensity, timing and circadian light stimulation by differentiating between full visible, infrared and circadian light, as well as to discriminate between different light sources (natural and artificial with low and high infrared composition) in subjects under free living conditions.

The ACM device is provided with three light sensors: i) a wide-spectrum sensor (380-1100 nm); ii) an infrared sensor (700-1100 nm) and iii) a sensor equipped with a blue filter that mimics the sensitivity curve of the melanopsin photopigment and the melatonin light suppression curve. To calibrate the ACM device, different commercial light sources and sunlight were measured at four different standardized distances with both a spectroradiometer (SPR) and the ACM device. CIE S 026/E:2018 toolbox software was used to calculate the melanopic stimulation from data recorded by SPR. Although correlation between raw data of luminance measured by ACM and SPR was strong for both full spectrum ($r = 0.946$, $p < 0.0001$) and circadian channel ($r = 0.902$, $p < 0.0001$), even stronger correlations were obtained when light sources were clustered in three groups: natural, infrared-rich artificial light and infrared-poor artificial light, and their corresponding linear correlations with SPR were considered ($r = 0.997$, $p < 0.0001$ and $r = 0.998$, $p < 0.0001$, respectively).

Our results show that the ACM device provided with three light sensors and the algorithm developed here allow an accurate detection of light type, intensity and timing for full visible and circadian light, with simultaneous monitoring of several circadian marker rhythms that will open the possibility to explore light synchronization in population groups while they maintain their normal lifestyle.

Chapter 2. Effects of high and low blue light content on circadian markers. Relation with melatonin inhibition and pupil light reflex

The input pathway carrying the light signal to the circadian system starts at the intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (ipRGCs). This way is involved not only in the synchronization of the central clock (suprachiasmatic nuclei, SCN) but also is in part responsible of the pupil light reflex (PLR). Among output pathways of circadian system, melatonin secretion is the best characterized. The synthesis of this indolamine is suppressed by light, especially by those wavelengths between 460 and 480 nm. Lifestyle in modern societies has leaded to the emergence of circadian dysfunction or chronodisruption that is associated with several health issues. The importance of these circumstances makes essential to understand the effects of light intensity and spectra on circadian markers. The main objective of this work was to determine the influence of light color temperature on two circadian markers: melatonin inhibition and pupillary light reflex in young and aged people. Furthermore, we aimed to investigate the best theoretical model that fits its prediction to our results. To do that, 16 young and 8 elder volunteers were recruited to participate in this study, and two lighting conditions of different correlated color temperature (CCT) were used (3000 K

and 5700 K). The first week of the study, volunteers wore an ambulatory circadian monitoring device (ACM): Kronowise® to measure their usual light exposure patterns. To perform the melatonin suppression test, participants were instructed to follow a dim light melatonin onset protocol at home. The same day of the two following weeks they were subjected to the melatonin inhibition protocol at the laboratory performing a crossed and randomized design for each type of light. The protocol to measure pupil light reflex (PLR) was adapted from Park et al. (2011), providing a light stimulus of 1 second. Post illumination pupil responses 6 seconds (6S-PIPR) and 30 seconds (30S-PIPR) after stimulus were measured, as well as minimum pupil diameter and velocity of contraction. Our results yielded significant melatonin suppression under both lighting conditions in comparison with the dim light one (41.7 %, $p < 0.001$, Student's $t = 6.687$, $DF = 21$ for 5700 K light, and 33.3 %, $p < 0.005$, Student's $t = 3.852$, $DF = 21$, for 3000 K light). Besides, the 5700 K light produced a higher contraction in 6S-PIPR (82.8 % for 5700 K vs. 87.5 % for 3000 K, $p < 0.001$, $F = 18.123$, $DF = 22$), and we found that in elder participant the minimum diameter was lower (59.1 % vs. 68.5 % for youngsters, $p < 0.005$, $F = 12.157$, $DF = 1$) and the velocity faster (35.0 % vs. 26.3 % for youngsters, $p < 0.005$, $F = 12.683$, $DF = 1$) in comparison with youngsters. We confirmed that even the light condition with less content in blue radiation produced significant melatonin suppression. On the other hand, higher content in blue spectrum produced higher contraction in the PIPR regulated by ipRGCs. In conclusion, both PLR and melatonin suppression can be useful techniques to analyze light impact on circadian system since they provide different and complementary information.

Chapter 3. A new integrative method to evaluate artificial lighting sources based on physical characteristics and biological and psychological markers

At present, it is well known a healthy circadian system, including maintaining the melatonin secretion profile, demands both bright light exposure during the day and dark at night. Nevertheless, parameters such as intensity, spectrum, timing and duration of exposure to light have effects on the circadian system (Rea, Figueiro, & Bullough, 2002). However, we have only recently begun to know the harmful effects for human health caused by chronodisruption or internal order impairment. Moreover, subjective comfort is also a variable to consider since in 1941, it already was a matter of study. A. A. Kruithof (1941) defined high and low levels of illumination at which light was considered “pleasing” for every correlated color temperature (CCT). The objective of this study was to develop a practical method to evaluate artificial light sources, based not only on their spectral power and thus, the corresponding activation of circadian photoreceptors, but also chromatic discrimination, comfort and circadian effects. The

protocol was divided in three steps: the first one consisted of a physical analysis of lighting sources, where spectra and intensity in irradiance of light sources were measured with a spectroradiometer. The following lights were employed: 5700K LED, 3000K LED, amber LED, four different configurations of red-green-blue (RGB) LEDs and four configurations of red-green-violet (RGV) LED generated with a prototype made in the Chronobiology Laboratory (Cronolab) composed by LED strips, mercury vapor, incandescent, and fluorescent bulbs. Eight standard Munsell color cads (7.5R 6/4, 5Y 6/4, 5GY 6/8, 2.5G 6/6, 10BG 6/4, 5PB 6/8, 2.5P 6/8, 10P 6/8) were used to perform the second step of this method: the chromatic discrimination and subjective tests, where a volunteer had to remain seated in a completely white room identifying the color cards under the different light sources. They also had to answer a questionnaire about light comfort and preferred moment to use each light. The final step consisted of measuring the effect of a light source on two circadian markers: melatonin inhibition and pupil light reflex, using the protocols employed on Chapter 2. Our results proved the method here proposed is an adequate tool to evaluate the effects of any light source on the circadian system, since it focuses the assessment from three different approaches that are complementary and interdependent and considers both objective and subjective variables.

Chapter 4. Effects of daylight saving time transitions on human circadian rhythms and phase response curve to light

Several studies have investigated the relationship of daylight saving time (DST) with sleep alterations, psychiatric illness, cardiovascular issues and behavior. However, very few have monitored participants while maintaining their usual lifestyle before and after DST. Considering that DST transitions modify human behavior and, therefore, their lighting exposure patterns, the aim of this study was to investigate that relationship considering also sleep and the human phase response curve to light. To do that, eight healthy adults were recruited to monitor their activity, temperature, sleep and light exposure by wearing an ambulatory circadian monitoring device: Kronowise®. Data recording started one week before each DST transition and finished one week after it. Then, Kronoware 10.0 software was used to obtain the following parameters: midtime of the five hours of maximum wrist temperature (M5) and of the five hours of minimum time in movement (L5), as well as sleep onset, sleep offset, sleep duration and light intensity. Time of M5 of wrist temperature was employed as circadian time 0 h, and daily mean waveforms of light intensity were calculated and filtered using the sensitivity curve of melatonin secretion to light. After that, the balance between advances and delays of the phase response curve to light were calculated individually before

and after both DST transitions. To assess internal desynchronization, the time of M5 of wrist temperature and L5 of time in movement were compared. Our results showed that after March DST transition there was no significant differences in sleep parameters, but after October shift participants woke up more than one hour later than before ($p < 0.005$, $t = -5.132$, $DF = 7$), and they slept 1.09 hours more ($p < 0.05$, $t = -3.017$, $DF = 7$). Moreover, time of M5 tended to advance after March DST, unlike during October DST transition, where time of M5 tended to delay by 0.42 hours, although differences were not statistically significant. About the effect of light exposure on circadian phase calculated from phase response curves, before spring transition, the area under the curve of phase advances ascended to an amount of 246 ± 37 (arbitrary units), while after time change they became higher with a total of 276 ± 42 (arbitrary units) ($p = 0.6$, $t = -0.464$, $DF = 7$). The same occurred with phase delays, before DST they ascended to 410 ± 64 (arbitrary units), and after, they increased to 465 ± 59 (arbitrary units), although differences were not significant ($p = 0.5$, $t = -0.635$, $DF = 7$). On the contrary, during autumn change the most remarkable thing was the decrease in phase advances after DST in comparison with previous week, from 302 ± 57 (arbitrary units) to 231 ± 59 (arbitrary units). However, differences were not significant ($p = 0.3$, $t = 1.094$, $DF = 7$). With respect to internal desynchronization, March DST change produced a higher desynchronization than October transition, especially along time of L5 of time in movement. These results show that during both DST transitions, the morning light exposure (in the phase advance zone) is the most influenced by the new local time, probably because during the afternoon and night, the use of artificial lighting is predominant regardless the time shift. Up to our knowledge, this is the first study monitoring personal light exposure in participants under natural conditions before and after DST transitions. Our results reflects that March DST transition acts as a phase advance and adaptation to it is more difficult than to October transition, since it represents a phase delay, which is the natural tendency of circadian central pacemaker. Moreover, our findings reflect the great influence of artificial lighting on phase shifts.

CONCLUSIONS

1. Kronowise® constitutes a reliable and sensitive ACM device to assess light exposure of different spectra.
2. The algorithm developed in this PhD Thesis has proved its validity to directly calculate from Kronowise® data visible and circadian light exposure, as well as to discriminate among different light types.

3. An increase in color temperature of commercial light sources produce an increase in melatonin inhibition and a greater pupil contraction regardless of the age of subjects.
4. Melatonin inhibition and PLR are not correlated at individual level. Thus each technique provides complementary information on the impact of light sources on circadian markers and both should be employed in the evaluation of circadian effects of a light.
5. The method developed in this PhD Thesis is an integrative tool to evaluate the circadian effects of any light source, since it includes objective and subjective variables, as well as physical and biological measurements.
6. March daylight saving time transition is more disruptive than the autumn one, advancing and desynchronizing skin temperature and activity rhythms. October transition, on the contrary, is comparable to a phase delay, and tended to delay those rhythms and to maintain similar levels of advances and delays provoked by personal light exposure. This fact makes transition into winter time easier, since delaying is the natural tendency of the human circadian system.
7. People spend most of their time indoors using artificial lighting, and this is reflected in the minimal differences on phase advances and delays before and after daylighting saving time transitions, and the high differences between personal light and sun light. This fact should be considered when studying chronodisruptive conditions and their effects, and when making decisions about them.

GENERAL CONCLUSIONS

Both natural and artificial lighting have an effect on the human circadian system, and this latter constitutes an important variable to consider. Kronowise® light sensors and our algorithm are useful tools to assess these effects under free living conditions and in chronodisruptive situations, such as daylight saving time transitions. The development of integrative and non-invasive protocols and measurements will help us to deep in understanding of circadian adjustment and mechanisms involved in chronodisruption.