

Evaluación de la fase circadiana mediante monitorización ambulatoria en humanos: correlación con el *dim light melatonin onset*

María Ángeles Bonmatí-Carrión, María Ángeles Rol, Juan Antonio Madrid*

Laboratorio de Cronobiología. Departamento de Fisiología. Universidad de Murcia, 30100. Espinardo. Murcia (España).

* correspondencia: mbc11365@um.es, angerol@um.es, jamadrid@um.es

Resumen

Es fundamental desarrollar un sistema que detecte la fase endógena de forma sencilla, ya que las actuales técnicas implican cuantificación de melatonina o monitorización de temperatura central mediante sondas rectales. En este trabajo se validó un sistema de registro ambulatorio. Las variables monitorizadas, durante 10 días en 13 sujetos, fueron temperatura periférica, mediante un sensor en la muñeca; actividad y posición, utilizando un actímetro en el brazo; y luz, mediante un sensor colgado alrededor del cuello. Se obtuvo el marcador de fase estándar *dim light melatonin onset* (DLMO) en saliva para evaluar la precisión de las demás variables. Además, rellenaron un diario de sueño que evaluó la probabilidad de sueño y los cuestionarios de matutinidad-vespertinidad (Horne-Östberg), de calidad de sueño (Pittsburgh) y de somnolencia (Epworth) para evaluar la preferencia diurna y su influencia en la calidad del sueño.

El aumento vespertino de la temperatura periférica se produjo con anterioridad a la elevación de melatonina; el descenso en la actividad, la posición, la variable compuesta TAP, y el aumento en la probabilidad de sueño, con posterioridad al incremento de melatonina. Las puntuaciones de los cuestionarios de matutinidad-vespertinidad y calidad del sueño mostraron alta correlación con el DLMO, confirmando que DLMO tardíos implican mayor vespertinidad y peor calidad del sueño.

Este método permite detectar de manera precisa la fase del sistema circadiano sin modificar los hábitos de vida. Los nuevos marcadores de fase propuestos basados en el ritmo de temperatura periférica (WTON and WTiO) serían adecuados en ámbitos clínicos en los que es fundamental conocer la fase circadiana del sujeto, como en la cronoterapia del cáncer y en la luminoterapia.

Abstract

It is important to develop a system able to detect the endogenous circadian phase easily, since current techniques imply quantification of hormones or monitorization of central temperature by rectal probes. In this work, a new ambulatory circadian monitoring system was validated. The variables were recorded for 10 days in 13 healthy subjects, and they were: peripheral temperature, by means of a sensor located on the ventral side of the wrist; motor activity and position, by an actimeter on the arm; and light exposure, using a pendant sensor. DLMO was also obtained in saliva to evaluate the accuracy of the rest of variables to assess the circadian phase. Besides, they completed a sleep log to obtain the sleep probability and Horne-Östberg morningness-eveningness, Pittsburgh Sleep Quality Index and Epworth Sleepiness Scale questionnaires to evaluate diurnal preference and its influence in sleep quality.

The evening increase in peripheral temperature anticipated the evening increase in melatonin; while the decrease in motor activity, position and TAP, and the increase in sleep probability took place after the increase in melatonin levels. The score of morningness-eveningness and sleep quality questionnaires showed high correlations with DLMO, confirming that late DLMO indicate higher eveningness and worse sleep quality.

This method allows accurately detecting the circadian phase without modifying subjects life style. The proposed new phase markers based on wrist temperature rhythm (WTON and WTiO) would be appropriate in Clinics when it is important to know the subject circadian phase, like in cancer chronotherapy or light therapy.

Palabras clave: temperatura periférica, actimetría, posición corporal, preferencia diurna, test Horne-Östberg, *dim light melatonin onset*

Introducción

El sistema circadiano es una estructura jerárquicamente organizada responsable de generar los ritmos circadianos. En mamíferos está dirigido por un marcapasos circadiano localizado en el núcleo supraquiasmático (NSQ). Éste permite a los organismos adaptar su fisiología anticipándose a los cambios ambientales diarios en lugar de respondiendo a ellos.

En humanos, los ritmos circadianos se observan en variedad de procesos moleculares, fisiológicos y psicológicos, como la expresión de genes, la temperatura corporal, ritmo cardíaco, producción de melatonina; así como en el sueño, el estado de ánimo y las funciones cognitivas (para una revisión, consultar Schmidt et al. 2007).

Bajo condiciones naturales, los ritmos circadianos están sincronizados al ciclo luz-oscuridad (Roenneberg et al. 2003). Éste ha aportado una buena señal temporal durante millones de años, hasta que la reciente “sociedad 24 horas” ha fomentado la exposición a ambientes artificialmente iluminados durante día y noche (trabajo a turnos, desplazamiento del tiempo de ocio hacia la noche...).

Ello produce continuos desplazamientos de fase y favorece el desajuste entre el orden temporal interno y las señales ambientales. La interrupción repetida del sistema circadiano o cronodisrupción (CD) (Reiter et al. 2007; Erren et al. 2010) se ha asociado a problemas de salud como el síndrome metabólico (Reiter et al. 2011; Garaulet and Madrid 2010), enfermedades cardiovasculares (Knutsson & Boggild 2000), deterioro cognitivo (Cho et al. 2000), y mayor incidencia de cáncer de mama (Schernhammer et al. 2001; Davis et al. 2001), colorrectal (Schernhammer et al. 2003) y de próstata (Kubo et al. 2006; Conlon et al. 2007), entre otras enfermedades.

La posibilidad de detectar la fase circadiana en un individuo permitiría evaluar la gravedad de su CD y diagnosticar problemas de sueño relacionados con el sistema circadiano (Pandi-Perumal et al. 2007) aplicando medidas para contrarrestar el desajuste entre la hora interna y externa; por ejemplo, adaptando el horario de los trabajadores a turnos a su cronotipo, personalizando la cronoterapia en pacientes de cáncer (Lévi & Okyar 2011), u optimizando el tratamiento con luminoterapia (Sharkey et al. 2011; Dewan et al. 2011; Zeitzer et al. 2012).

Se han desarrollado cuestionarios para estimar el cronotipo (Munich ChronoType Questionnaire) (Roenneberg et al. 2003) o la preferencia diurna (Horne-Östberg morningness-eveningness Questionnaire (Horne & Östberg 1976)). Sin embargo, su precisión depende de la capacidad de autoexamen, de la buena memoria, y de la capacidad del sujeto para completarlos correcta y honestamente (siendo menos útiles en el caso de personas con deterioro cognitivo). Además de estos procedimientos subjetivos, también se ha utilizado la medida de ciertas variables como marcadores circadianos para caracterizar la fase circadiana del sujeto. Por ejemplo, el ritmo de temperatura central (TC), el ritmo de actividad-reposo, o el de secreción de cortisol y melatonina, siendo este último el estándar para detectar la fase circadiana (Benloucif et al. 2008; Arendt 2003).

El parámetro más usado es el DLMO (*Dim Light Melatonin Onset*) (Lewy & Sack 1989; Lewy et al. 1999) que, aunque puede determinarse mediante un protocolo en el domicilio, requiere la participación activa del sujeto y la modificación de su rutina (requiere condiciones de iluminación tenue y control de la postura). Además, cuantificar hormonas es relativamente caro y requiere un laboratorio especializado. La monitorización de la TC tiene el inconveniente de que es más sensible a efectos enmascarantes y además requiere el uso de sondas rectales o ingeridas (Teunissen et al. 2012).

El ritmo de actividad-reposo se ha usado para evaluar el ritmo sueño-vigilia, pero también presenta sus propios artefactos, como la retirada temporal del sensor, movimientos del compañero de cama, movimientos durante un viaje en coche, etc. (Sadeh & Acebo 2002; Acebo & Lebourgeois 2002).

Recientemente nuestro grupo propuso la temperatura de la piel a nivel de la muñeca (del inglés, *wrist temperature*, WT) como un posible método para evaluar la fase circadiana en condiciones de vida libre, ya que la WT aumenta durante periodos de descanso asociado al sueño, y disminuye durante periodos de actividad (Sarabia et al. 2008). Este ritmo de temperatura es, en parte, el resultado de un balance alternado entre activación parasimpática (vasodilatación) y

simpática (vasoconstricción) sobre los vasos sanguíneos de la piel periférica, dirigidos por el reloj situado en el NSQ (Kräuchi 2007; Lack et al. 2008; Morris et al. 2009). Sin embargo, cuando se emplea aislada, su precisión disminuye por factores enmascarantes como la temperatura ambiental y la postura.

Ya que todas las variables aisladas pueden estar enmascaradas en mayor o menor grado y presentar distintos artefactos, se han desarrollado nuevas aproximaciones para evitarlo en lo posible, como las técnicas de monitorización circadiana multicanal (Kolodyazhniy et al. 2011) y los algoritmos integrados, como el TAP (combinación de WT, actividad motora y postura) (Ortiz-Tudela et al. 2010). Sin embargo, todavía no se ha encontrado un sistema preciso, simple y asequible para detectar la fase circadiana en humanos en condiciones de vida libre para su uso en la práctica clínica.

Así, el objetivo del presente trabajo fue optimizar un procedimiento para estimar la fase circadiana en humanos en condiciones de vida libre, mediante cuestionarios y la monitorización ambulatoria de la exposición a luz, temperatura de la piel a nivel de la muñeca, actividad motora, posición corporal, comparando, por primera vez, con el marcador circadiano estándar DLMO.

Material y métodos

Sujetos

Los sujetos de estudio fueron 13 voluntarios no fumadores (7 hombres, 6 mujeres) entre 19 y 35 años ($27,2 \pm 1,5$ años). Mostraron patrones normales de sueño, no tenían problemas médicos ni eran daltónicos, y no estaban tomando ninguna medicación que pudiera afectar a los ritmos circadianos. Ninguno era trabajador a turnos, ni había cruzado más de dos zonas horarias en los meses previos al estudio.

Los voluntarios recibieron la información apropiada acerca del protocolo, firmaron una hoja de consentimiento informado, y fueron compensados por su participación. Este proyecto cumplió con los principios establecidos en la Declaración de Helsinki.

Dispositivos de monitorización ambulatoria

A los voluntarios se les indicó que mantuvieran sus hábitos de vida durante 10 días. Llevaron un sistema no invasivo de monitorización circadiana ambulatoria (MCA), que registró las siguientes variables: temperatura de la piel a nivel de la muñeca (WT), actividad motora (A), posición corporal (P) y exposición a la luz (L). Las medidas comenzaron un viernes, entre las 12:00 horas y las 18:00 horas. Además, los participantes fueron completando un diario de sueño.

El ritmo de WT se registró de manera continua durante 10 días, mediante un sensor de temperatura que almacenó los datos internamente (Thermochron iButtonDS1921H, Dallas, Maxim), con una sensibilidad de $0,125$ °C y programado para tomar un dato cada 10 minutos. Se adhirió a una muñequera de algodón, con la superficie del sensor en contacto con la parte ventral de la muñeca, a la altura de la arteria radial de la mano no dominante (Sarabia et al. 2008).

Los ritmos de A y P se obtuvieron mediante un actímetro (HOBO, Pendant G Acceleration Data Logger UA-004-64, Massachusetts, USA) situado en el brazo no dominante por medio de un brazalete deportivo, con su eje X paralelo al húmero (Ortiz-Tudela et al. 2010). El dispositivo fue programado para tomar un dato cada 30 segundos. La información almacenada se transfirió a través de una base compatible con USB (MAN-BASE-U-4, HOBO, Massachusetts, USA) a un ordenador, utilizando el software HOBOWare 2.2.

La A se expresó como la tasa de cambio en grados por minuto; y la P fue calculada como el ángulo entre el eje X del actímetro y el plano horizontal. Así, P osciló entre 0° en el caso de máxima horizontalidad, y 90° para la máxima verticalidad (Ortiz-Tudela et al. 2010).

Además, todos los sujetos llevaron un sensor de luz, que almacenó los datos (HOBO Pendant Temperature/Light Data Logger UA-002 64, Onset Computer, Bourne, HOBO, Massachusetts, USA), en un cordón anudado al cuello, sobre la ropa durante las horas de vigilia, y dejándolo en la mesilla de noche mientras dormían (Martínez-Nicolás et al. 2011).

Test DLMO y cuantificación de melatonina

Una de las tardes del estudio (miércoles), se le pidió a los voluntarios que se quedaran en su casa sentados en condiciones de luz tenue (por ejemplo, una lamparita en la esquina opuesta de la habitación), empezando a las 18:30 h. A partir de las 19:00, y cada media hora, fueron tomando una muestra de saliva hasta una hora después de su hora habitual de irse a dormir (modificado de Pullman et al. 2012); revisión, ver Pandi-Perumal et al. (2007).

Fueron guardando las muestras en el congelador hasta que las trajeron al laboratorio en bolsas térmicas con hielo. La concentración de melatonina en la saliva de los sujetos se cuantificó mediante radioinmunoensayo (Stockgrand Ltd., University of Surrey, Guildford, UK), con un límite de detección de 0,44 pg/ml. Los coeficientes de variación intraensayo fueron 6,1, 0,3 y 6,9 % para el rango bajo ($10,4 \pm 0,6$ pg/ml), medio ($34,7 \pm 0,1$ pg/ml) y alto ($66,7 \pm 4,6$ pg/ml) respectivamente. Las muestras tomadas por cada voluntario se midieron por duplicado en un único ensayo.

Cuestionarios

Con objeto de comparar la estimación de la fase obtenida de los registros ambulatorios y del DLMO con la preferencia diurna obtenida a partir de cuestionarios utilizados en la bibliografía, los sujetos rellenaron el cuestionario de matutinidad-vespertinidad de Horne-Östberg (HO) (Horne & Östberg 1976). Además rellenaron también el cuestionario de Pittsburgh de calidad del sueño (Pittsburgh Quality Sleep Index (PQSI) (Buysse et al. 1988)) y el de somnolencia diurna de Epworth (Epworth Sleepiness Scale (EES) (Johns et al. 1991)). Ello permitió comparar la estimación de la fase circadiana con otros aspectos relacionados con el ciclo sueño-vigilia, ya que se ha propuesto que la fase circadiana y la preferencia diurna están relacionadas con la calidad del sueño y con la somnolencia diurna (Lázár et al. 2012; Reid et al. 2012; Tzischinsky & Shochat 2011).

Monitorización circadiana ambulatoria (MCA)

Primero se filtraron los datos de la MCA para eliminar artefactos, como los producidos por la retirada temporal de los sensores.

El algoritmo TAP se calculó como se describe en Ortiz-Tudela et al. (2010). Una puntuación de 0 corresponde a completo descanso y sueño (alta temperatura distal, baja actividad y posición horizontal), mientras que una puntuación de 1 corresponde a periodos de máxima vigilia y movimiento.

Los datos del diario de sueño se convirtieron en un código binario en el cual 1 correspondió a sueño declarado y 0 a periodo de actividad. La probabilidad de sueño indica el porcentaje de días en los que el sujeto estuvo dormido en un momento determinado individuos. En el caso de las curvas de grupo, la probabilidad de sueño indica el porcentaje de dormidos en un momento dado (Sarabia et al. 2008). Los patrones medios de temperatura de la muñeca, actividad motora, posición, TAP, sueño y exposición a la luz se calcularon por individuo y para el grupo entero. Todos los datos se expresaron como media \pm error estándar de la media (SEM).

Cuando se calcularon las ondas medias diarias, los datos obtenidos durante el periodo de la toma de muestras de saliva (desde las 19:00 h hasta las 03:00 h) se eliminaron del cálculo, ya que los sujetos fueron forzados a permanecer sentados en condiciones de luz tenue, y por tanto, no estuvieron en condiciones de vida libre.

Para minimizar las diferencias interindividuales en la producción de melatonina, las concentraciones se normalizaron como porcentaje del nivel máximo alcanzado por sujeto, y entonces, promediadas para el grupo completo.

Cálculo de los marcadores de fase

Se realizó un análisis no paramétrico (Van Someren et al. 1999) para calcular los siguientes marcadores de fase de actividad-reposo: la hora central de las diez, cinco o dos horas consecutivas con los mínimos valores de la variable (L10, L5 y L2, respectivamente), y la hora central de las diez, cinco o dos horas consecutivas con el valor más alto de la variable (M10, M5 y M2, respectivamente).

El criterio para el establecimiento del DLMO fue descrito por Voultsios et al. (1997), determinando un umbral a partir de la media más dos desviaciones estándar de tres de las

muestras de la línea base. Un procedimiento similar se siguió con el resto de las variables registradas con el fin de obtener un marcador de fase de cálculo similar al del DLMO. Estos marcadores de fase se denominaron *WTON*, *SleepOn* (*WT onset*, *Sleep Onset*) y *Activity offset* (*AcOff*), *Position offset* (*POff*) y *TAP offset* (*TAPOff*).

Además, se calcularon varios índices compuestos: $WT_{On}P_{Off}$ promediando el valor de *WTON* y *POff*; $WT_{On}Ac_{Off}$ promediando el valor de *WTON* and *AcOff*; AP_{Off} promediando el valor de *AcOff* y *POff*; y finalmente, $SleepWT_{On}$ promediando el valor de *SleepOn* y *WTON*.

Se propone además otro marcador de fase: *WTiO*, sumando a L2 el porcentaje medio de aumento de la temperatura periférica entre L2 y el DLMO, con respecto del incremento total entre L2 y M5. Este porcentaje, en promedio, fue del 35 %, que se añadió de manera individual al valor de L2. La hora correspondiente a la que se alcanzó esa temperatura, se denominó *WTiO*.

Análisis de los datos

Se calcularon correlaciones cruzadas individuales entre los niveles de melatonina y el resto de variables, obteniendo así relaciones de fase entre el aumento de melatonina vespertino y el aumento (o disminución) vespertino de las demás variables. Se obtuvo un valor *R* (correlación de Pearson) para cada diferencia de fase y sujeto, y éstos se promediaron para el grupo. La máxima *R* promediada corresponde a una diferencia de fase concreta para cada variable. Además, también se obtuvieron diferencias de fase individuales (posteriormente promediadas) a partir de *R* máximas individuales.

También se calcularon las correlaciones lineales entre los distintos marcadores de fase y el DLMO.

Se realizó un análisis del tamaño del efecto (*d* de Cohen) sólo entre aquellos marcadores de fase que coincidieron temporalmente con el DLMO. La fórmula utilizada para la *d* de Cohen fue:

$$d = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}}$$

La precisión de la fase del DLMO predicha, obtenida de las fórmulas de regresión lineal anteriormente mencionadas, se estimó para cada marcador de fase y sujeto, calculando el error de predicción así:

$$\text{Error} = \text{valor absoluto (Hora DLMO - Fase predicha)}$$

Los errores de predicción individuales se promediaron para cada marcador de fase en valor absoluto, y el rango de error se calculó y expresó en valores reales (no absolutos). Todos los resultados están expresados como media \pm error estándar de la media.

Resultados

En la Figura 1 se presenta un promedio de los 10 días de registro. Como se esperaba, la *WT* (Fig. 1A) aumentó al principio de la noche permaneciendo elevada durante el sueño, descendiendo inmediatamente después del despertar. El día del muestreo de saliva (área gris), los sujetos se fueron a dormir más tarde de lo habitual y la *WT* empezó a aumentar como se observó en otras noches, pero los valores máximos nocturnos se alcanzaron al final de la noche. La actividad motora (A), generalmente alta durante el día (Fig. 1B), también descendió durante la tarde en la que tuvo lugar el muestreo de saliva, confirmando que los sujetos tuvieron una baja actividad motora durante ese periodo. Esto también se observa en el registro de posición corporal (Fig. 1C), que mostró posiciones más verticales durante este periodo que en otras noches normales en las que los sujetos se tumbaban; pero sin alcanzar los niveles de verticalidad normalmente presentes en horas de actividad. Para la variable compuesta *TAP* se obtuvieron resultados similares (Fig.1D), mostrando un patrón diario robusto, con altos valores durante el día y bajos durante la noche. La interferencia producida por el muestreo de saliva también se observó en este caso.

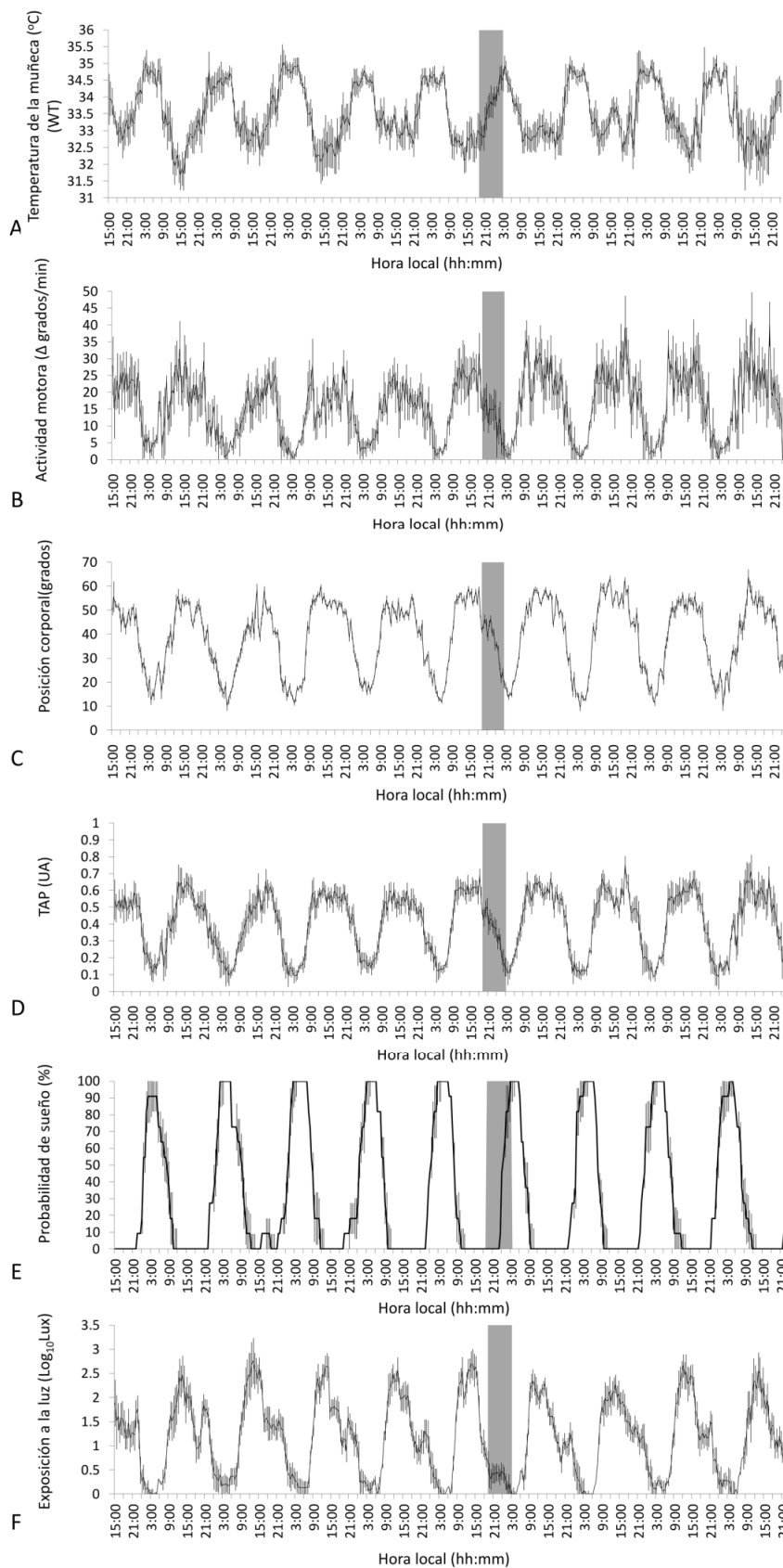


Figura 1. Registro de diez días de WT (A), A (B), P(C), TAP (D), probabilidad de sueño (E) y L (F), promedio de 13 sujetos. Las áreas grises indican el periodo en el que tuvo lugar el muestreo de saliva para el DLMO. Los datos se expresan como media \pm SEM.

Fase circadiana mediante monitorización ambulatoria: correlación con el DLMO

La Fig. 1F representa el patrón de exposición a la luz de los sujetos. Los valores más altos (>200 lux) se registraron durante el día, descendiendo suavemente en el ocaso, y con un periodo de intensidad intermedia (<100 lux) hasta la hora de dormir, momento en el que la intensidad descendió a casi 0 lux. La tarde del muestreo de saliva, la intensidad de la luz recibida fue menor de 5 lux, claramente menor que en otros días a esa misma hora, lo cual confirmó que los sujetos permanecieron en condiciones de luz tenue.

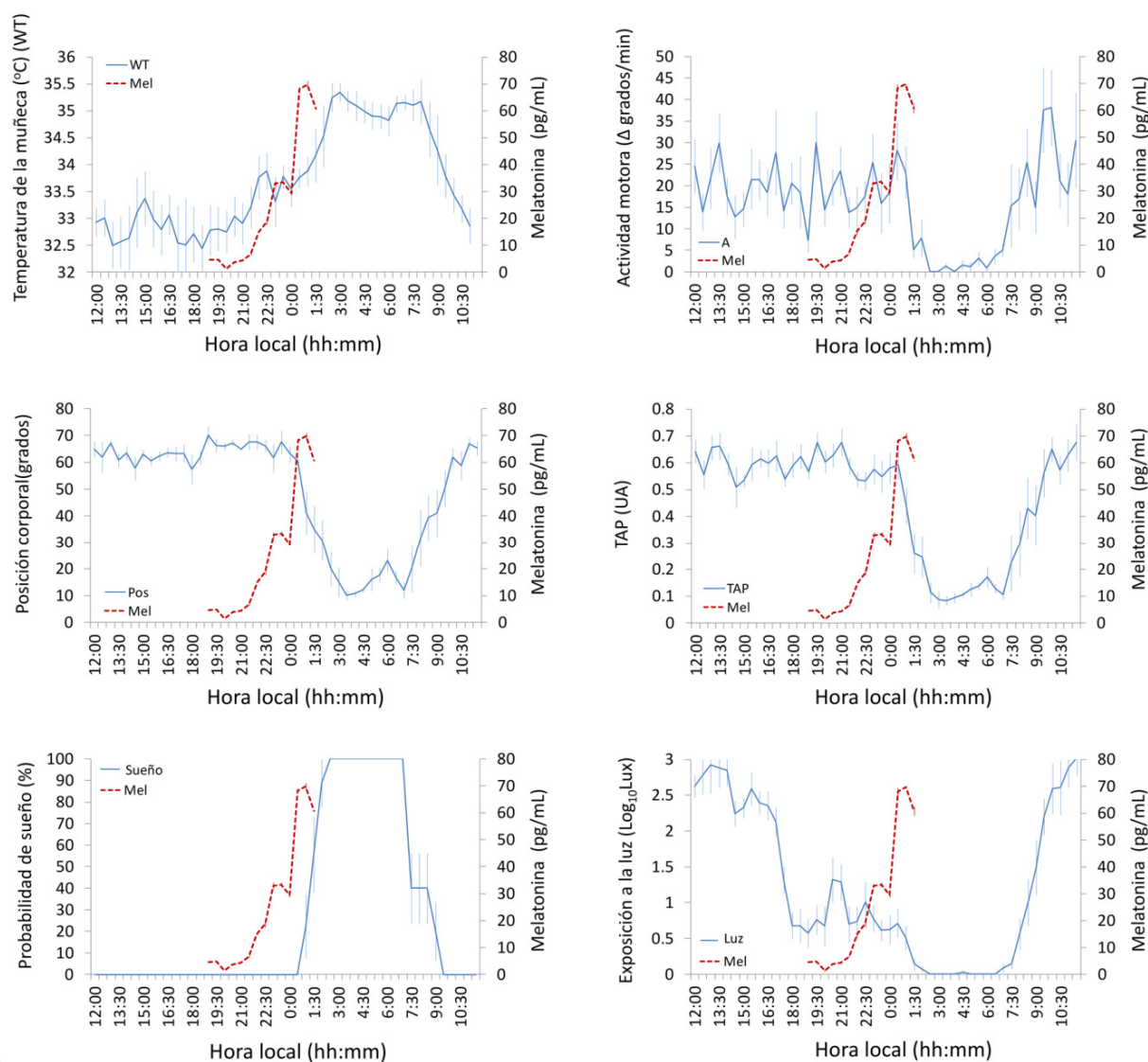
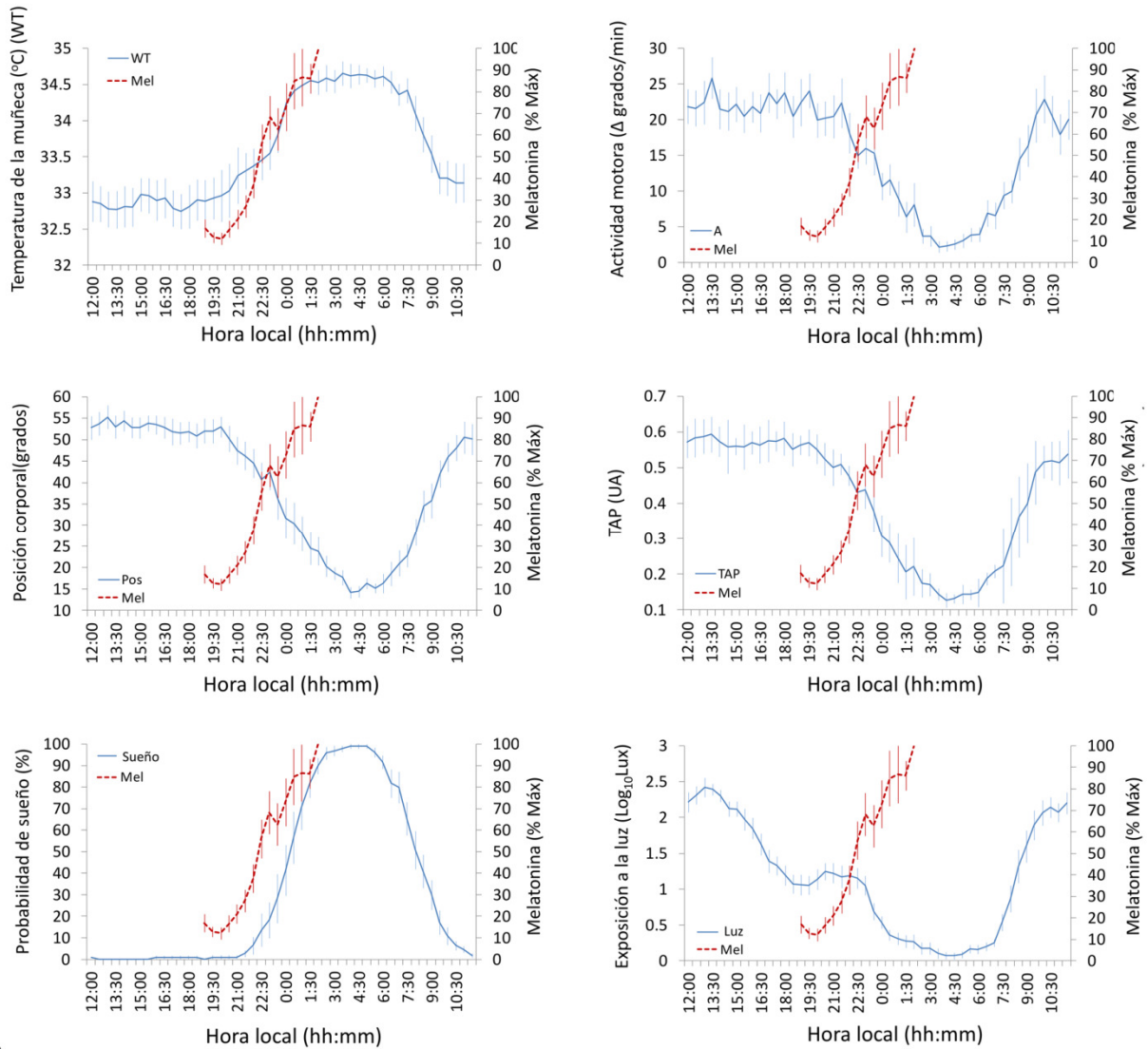


Figura 2. Onda media de un sujeto representativo (2A) y onda media promediada para todos los sujetos ($n=13$) (2B) para temperatura de la muñeca, actividad motora, posición corporal, TAP, probabilidad de sueño y exposición a la luz. Los datos se expresan como media \pm SEM. Para poder comparar, los datos de melatonina se representan en unidades de concentración (pg/mL) para valores individuales y como porcentaje del máximo de cada sujeto para valores promediados.

En la Fig. 2 se representan las ondas medias (promedio de 9 días) de todas las variables monitorizadas y el sueño (del diario de sueño) de un sujeto representativo (Fig. 2A) y de la media de todos los sujetos (Fig. 2B). La WT empezó a aumentar poco antes que la melatonina. La actividad motora, la posición corporal y el TAP, sin embargo, comenzaron a descender después del aumento de melatonina. En el caso de la probabilidad de sueño, sólo una vez que la melatonina

hubo alcanzado aproximadamente su máximo valor, el 100 % de los sujetos estaban durmiendo. La exposición a la luz mostró un patrón bimodal, con dos descensos que probablemente correspondieron al cambio de luz interior influida por luz exterior a una luz artificial más tenue. Finalmente descendió a cero, coincidiendo con el comienzo del periodo de sueño en oscuridad. La melatonina empezó a aumentar una vez que los sujetos se expusieron a condiciones de luz artificial más tenue.



B

Figura 2 continuación. Onda media de un sujeto representativo (2A) y onda media promediada para todos los sujetos ($n=13$) (2B) para temperatura de la muñeca, actividad motora, posición corporal, TAP, probabilidad de sueño y exposición a la luz. Los datos se expresan como media \pm SEM. Para poder comparar, los datos de melatonina se representan en unidades de concentración (pg/mL) para valores individuales y como porcentaje del máximo de cada sujeto para valores promediados.

Para evaluar la relación de fase entre la producción vespertina de melatonina y las variables monitorizadas, se hicieron correlaciones cruzadas. En la Figura 3 se han representado los valores medios del coeficiente R de correlación. Además, los valores máximos de R se seleccionaron para cada sujeto, y la correspondiente diferencia de fase individual fue promediada para el grupo. La WT

estuvo ligeramente avanzada con respecto al incremento vespertino de melatonina ($-0,69 \pm 0,59$ h) (Fig. 3A), mientras que la A (Fig. 3B), la P (Fig. 3C) y el sueño (Fig. 3E) se retrasaron alrededor de dos horas con respecto al incremento vespertino de melatonina (A, $2,04 \pm 0,36$ h; P, $2,42 \pm 0,48$ h; sueño, $1,36 \pm 0,25$ h, respectivamente). La variable compuesta TAP mostró un retraso respecto a la melatonina de alrededor de una hora ($0,88 \pm 0,45$ h, Fig. 3D).

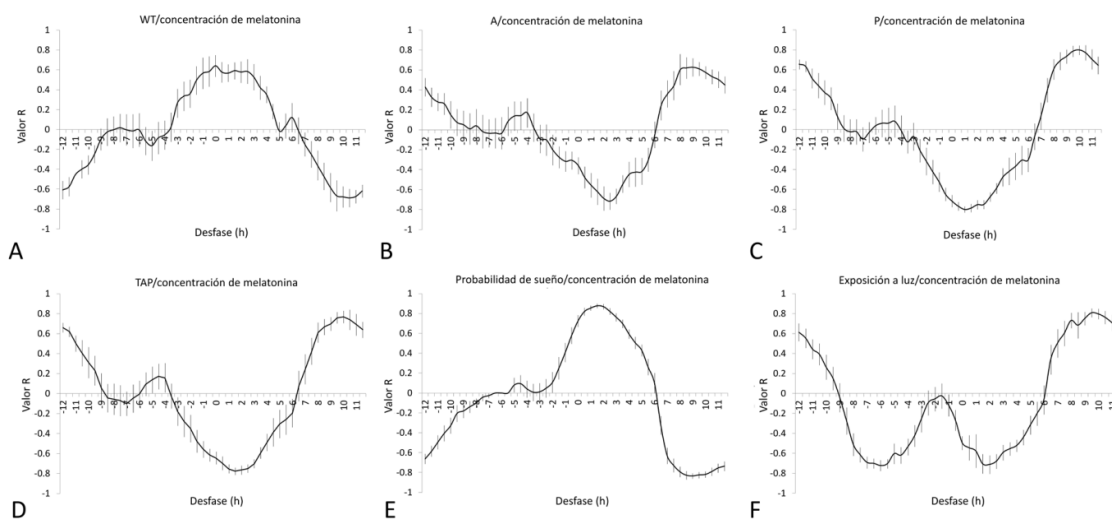


Figura 3. Correlaciones cruzadas entre concentración de melatonina y WT (A), actividad motora (B), posición corporal (C), TAP (D), probabilidad de sueño (E) y exposición a la luz (F). Los datos se expresan como R medias \pm SEM. (n=13).

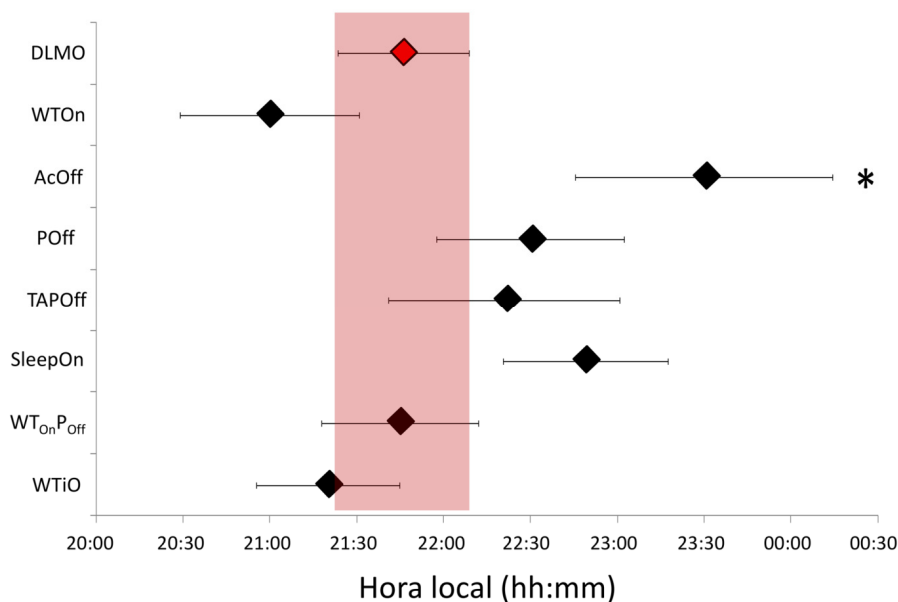


Figura 4. Hora media del DLMO, WTON, AcOff, POff, TAPOff, SleepOn, WTOnPOff y WTiO (ver Métodos). Las barras horizontales indican el SEM para cada parámetro. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ANOVA).

Tabla 1. Correlaciones lineales entre el DLMO y los marcadores de fase no paramétricos, expresados como la media \pm SEM para WT, A, P, TAP y probabilidad de sueño (*Sleep*) y los índices compuestos. Ver Métodos para más detalle. El coeficiente R de correlación, su probabilidad, y los coeficientes de la ecuación lineal se incluyen también. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Variable	Marcador de fase	Hora (hh:mm)	Coeficiente R	Valor p	Ecuación	
					a	b
Mel	DLMO	21:46 \pm 00:23				
WT	L10	15:39 \pm 00:29	0,637*	0,019	0,496	14,00
	L5	16:00 \pm 00:50	0,756**	0,003	0,344	16,26
	M5	03:31 \pm 00:36	0,122	0,691	0,077	19,64
	L2	15:58 \pm 00:57	0,601*	0,03	0,239	17,94
	M2	03:14 \pm 00:53	0,042	0,891	0,018	21,27
	WTOn	21:00 \pm 00:28	0,477	0,100	0,349	14,43
A	WTiO	21:30 \pm 00:25	0,753*	0,005	0,716	6,58
	M10	16:19 \pm 00:39	0,406	0,169	0,238	17,88
	L5	04:14 \pm 00:23	0,674*	0,012	0,666	2,96
	M5	15:51 \pm 01:03	0,345	0,248	0,125	19,78
	L2	04:25 \pm 00:19	0,269	0,374	0,207	15,86
	M2	16:19 \pm 01:16	0,438	0,134	0,13	19,64
P	AcOff	23:30 \pm 00:45	0,607*	0,028	0,309	14,48
	M10	16:21 \pm 00:35	0,485	0,093	0,312	16,65
	L5	04:11 \pm 00:29	0,493	0,087	0,392	10,71
	M5	16:00 \pm 01:01	0,576*	0,039	0,213	18,35
	L2	04:11 \pm 00:32	0,284	0,347	0,198	16,17
	M2	16:02 \pm 01:12	0,542	0,055	0,171	19,02
TAP	Poff	22:30 \pm 00:32	0,471	0,104	0,329	14,35
	M10	16:05 \pm 01:45	0,661*	0,014	0,514	13,5
	L5	04:09 \pm 01:36	0,543	0,055	0,463	8,73
	M5	15:09 \pm 03:21	0,720**	0,006	0,293	17,33
	L2	04:11 \pm 02:07	0,254	0,403	0,162	17,18
	M2	15:44 \pm 04:10	0,432	0,140	0,141	19,54
Sleep	TAPOff	22:21 \pm 00:40	0,478	0,098	0,271	15,7
	L10	16:20 \pm 00:20	0,515	0,105	0,679	10,75
	L5	16:35 \pm 00:30	-0,189	0,577	-0,163	24,58
	M5	03:59 \pm 00:19	0,811**	0,002	1,118	17,41
	L2	18:27 \pm 00:28	-0,517	0,104	-0,478	30,69
	M2	04:01 \pm 00:19	0,605*	0,049	0,843	18,46
Índices compuestos	SleepOn	22:49 \pm 01:34	0,177	0,603	0,161	18,18
	WT _{On} P _{Off}	21:45 \pm 00:27	0,554*	0,049	0,464	11,66
	WT _{On} Ac _{Off}	22:15 \pm 00:32	0,652*	0,016	0,463	11,46
	AP _{Off}	23:00 \pm 00:36	0,588*	0,034	0,372	13,20
	SleepWT _{On}	22:10 \pm 00:19	0,759**	0,003	0,884	02,17

En la Tabla 1 se muestran las correlaciones entre los diferentes marcadores de fase y el DLMO. Cada variable individual presentó al menos un marcador de fase significativamente correlacionado con el DLMO. En el caso de la WT, la mayor correlación se correspondió con L5 y WTiO. L5 también fue el marcador mejor correlacionado para P, TAP y sueño. En cuanto a índices compuestos, SleepWT_{On} mostró la más alta correlación con el DLMO.

Para evaluar la coincidencia temporal entre los distintos marcadores de fase y el DLMO, se realizó un análisis del tamaño del efecto (d de Cohen). Todos los marcadores de fase mostrados en la Figura 4 se asociaron con el DLMO a niveles estadísticamente significativos, excepto AcOff ($p < 0,05$). La mayor asociación temporal se observó en el caso de WT_{On}P_{Off} ($d = 0,02$), SleepWT_{On} ($d = 0,36$) and WTiO ($d = 0,37$). Así, los marcadores de fase que cumplen con ambos criterios (una fuerte correlación y una gran asociación temporal con el DLMO) fueron el WTiO como índice individual, y SleepWT_{On} and WT_{On}P_{Off}, como índices compuestos.

Fase circadiana mediante monitorización ambulatoria: correlación con el DLMO

En la Tabla 2 se muestra la comparación de la precisión de los diferentes métodos para predecir la fase circadiana (MCA vs. DLMO). Cuatro parámetros tuvieron un rango de error menor de 200 min: WTiO (154 min), Sleep M5 (157 min), WT L5 (188 min) and TAP M5 (195 min).

Tabla 2. Precisión de los diferentes métodos utilizados para predecir la fase circadiana vs. la fase determinada por DLMO. Los valores son expresados como la diferencia de fase en minutos (en valor absoluto) entre el DLMO y la fase predicha por el resto de parámetros para cada sujeto (Ver métodos).

Suj. N°	DLMO (hh:mm)	Error en la predicción (min)			
		(Error = valor absoluto (Hora DLMO - Fase predicha))			
		WTiO	SleepM5	WTL5	TAPM5
1	22:00	20	26	37	45
2	20:30	-	16	17	3
3	21:00	37	86	25	43
4	20:30	45	-	14	47
5	22:00	20	-	14	8
6	20:30	45	16	17	21
7	22:30	96	4	85	64
8	20:30	40	34	66	12
9	01:00	74	53	91	82
10	21:30	7	56	16	31
11	23:30	70	64	42	27
12	22:30	33	71	7	108
13	21:00	58	19	97	87
Media ± ES		46±7.4	41±8.1	41±9.1	45±9.1
Rango de error		154 (-58 a 96)	157 (-86 a 71)	188 (-97 a 91)	195 (-87 a 108)

La frecuencia de preferencia diurna fue: 54% de indefinidos, 38% de matutinos moderados y 8% de vespertinos moderados. A pesar de su subjetividad, las puntuaciones en el test de matutinidad-vespertinidad de Horne-Östberg (HO) se correlacionaron bien con el DLMO. Aunque la puntuación del *Pittsburgh Sleep Quality Index* (PSQI) no predice la fase circadiana, su puntuación estuvo también bien correlacionada con el DLMO, indicando que DLMO más tardíos se corresponden con peor calidad del sueño (mayores puntuaciones de PSQI). Sin embargo, la *Epworth Sleepiness Scale* (ESS), que aporta información sobre somnolencia diurna, no se correlacionó con el DLMO (Tabla 3).

Discusión

Nuestros resultados indican que la fase circadiana en humanos se puede estimar de manera fiable mediante un sistema de MCA, mientras los sujetos mantienen sus hábitos de vida con la mínima incomodidad y, al contrario que en otros estudios (Kolodyazhniy et al. 2011), sin verse obligados a llevar muchos sensores. Aunque todas las variables individuales registradas en la MCA pueden utilizarse para predecir el DLMO, los marcadores de fase para sueño, WT y TAP mostraron la mayor correlación con el DLMO. Además, los marcadores de fase de WT (SleepWT_{On}, WTiO y WT_{On}P_{Off}) mostraron una alta asociación temporal con el estándar DLMO.

La MCA propuesta aporta un registro de 10 días que permite evaluar los hábitos del sujeto mientras continúa con su vida normal. Además, es suficientemente sensible para discriminar días no representativos, como cuando se realiza un protocolo (p. ej. el muestreo de saliva que interrumpe el patrón circadiano normal). Aunque el protocolo de muestreo de saliva requirió la alteración de la vida normal, sólo modificó ese día, mientras que los días siguientes mostraron un alto grado de estabilidad y fueron similares a los anteriores al muestreo.

Tabla 3. Correlaciones lineales entre el DLMO y las puntuaciones obtenidas de los cuestionarios. HO: cuestionario de matutinidad-vespertinidad de Horne-Östberg; PSQI: cuestionario de calidad del sueño (Pittsburgh Quality Sleep Index); EES: cuestionario de somnolencia diurna (Epworth Sleepiness Scale). Se incluyen también el coeficiente R, su probabilidad, y los coeficientes de la ecuación (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Test	Puntuación	Coeficiente R	Valor p	Ecuación	
				a	b
HO	53,62 \pm 2,06	-0,711**	0,006	-0,13	28,77
PSQI	04,62 \pm 0,92	0,695*	0,008	0,284	20,45
ESS	04,77 \pm 1,06	0,133	0,664	0,047	21,54

Además, el muestreo de saliva dentro del estudio representa una ventaja sobre otros estudios en los cuales la toma de muestras de saliva tuvo lugar fuera del periodo de registro (Kolodyazhniy et al. 2011); primero, porque puede evaluarse el grado de cumplimiento del protocolo; y segundo y más importante, porque el DLMO y los demás marcadores de fase se obtuvieron durante el mismo periodo, eliminando así la posibilidad de algún cambio de fase. Aunque en nuestro protocolo los sujetos no estuvieron estrictamente controlados en laboratorio, los datos de la MCA revelaron que las condiciones de luz, actividad y posición fueron las estipuladas (Deacon & Arendt 1994). Previamente, se ha validado la determinación del DLMO bajo condiciones similares (intensidad de luz < 20 lux vs. < 10 lux en nuestro trabajo). Además, el hecho de que los sujetos estuvieran en su casa evitó los factores de estrés propios del laboratorio.

Para ser considerado ritmo marcador, una variable tiene que predecir de manera precisa la fase circadiana, como es el caso de la melatonina. Sin embargo, para alcanzar relevancia clínica, esas variables deberían poderse medir de manera ambulatoria, sencilla, y no invasiva. Además, el cálculo de la fase circadiana no debería requerir elevados cálculos matemáticos.

Dado que el objetivo principal de este estudio fue evaluar la utilidad de un sistema de MCA para establecer la fase circadiana, utilizamos diferentes métodos para determinar la relación entre las variables obtenidas y el DLMO.

- 1) Correlaciones cruzadas
- 2) Evaluación de los marcadores de fase
- 3) Propuesta de un marcador de fase equivalente para cada variable, basado en el cálculo del DLMO.

De todas las variables ambulatorias, sólo el incremento vespertino de WT mostró anticipación con respecto al aumento vespertino de melatonina, mientras que la caída en la A, en la P y en la exposición a L estuvo retrasada con respecto al DLMO. La alta correlación entre la fase de estas variables registradas, los diarios de sueño y la melatonina es coherente con estudios previos (Dijk & Czeisler 1995; Duffy et al. 1997; Wyatt et al. 1999). Sin embargo, no hay trabajos que hayan estudiado la relación de fase existente entre WT, P y la variable TAP con el DLMO.

Además, es especialmente interesante que la temperatura de la piel fuera la única variable que antecedió al aumento en la melatonina. Esto podría contradecir los resultados obtenidos por Kräuchi et al. (2000), en los que el incremento de temperatura tuvo lugar poco después del DLMO. Esta discrepancia puede explicarse por la distinta localización de los sensores en ambos estudios (centro del dorso de las dos manos en su caso; la parte ventral de la muñeca en el nuestro). El descenso del resto de variables (A, P, TAP y luz) y el incremento en la probabilidad de sueño estaban retrasados con respecto al incremento vespertino de melatonina. De acuerdo con nuestros resultados, esto podría indicar que, aunque influida por factores enmascarantes, la temperatura de la piel de la muñeca es predictiva y no sólo reactiva a la melatonina.

Al correlacionar el DLMO y los marcadores no paramétricos, la mejor correlación fue la obtenida entre el M5 del sueño declarado y el DLMO. Esto coincide con los resultados obtenidos por Martin and Eastman (2002). Kolodyazhniy et al. (2011) también encontraron una alta correlación entre el punto medio del sueño, equivalente a nuestro L5 de actividad motora, y el

DLMO. Sin embargo, el sueño declarado, se obtiene mediante un diario de sueño, que debe ser completado correctamente. Así, en algunos casos (especialmente en Clínica), se requiere un método objetivo que no dependa de la participación activa del sujeto.

En cuanto al resto de las variables (WT, P y TAP), el DLMO estuvo mejor correlacionado con los marcadores de fase del periodo de vigilia. Una posible explicación es que la WT comienza a aumentar inmediatamente después de su mínimo valor (L5 o L2), durante el día. En estudios previos (Wyatt et al. 1999) se ha descrito una relación estable de fase entre el inicio de melatonina y el descenso inicial de TC. Además, es la primera vez que se correlaciona con el DLMO un marcador de fase obtenido de la variable compuesta TAP (M5).

Estimamos un marcador de fase equivalente al DLMO en su cálculo para el resto de las variables. Sin embargo, a pesar de la alta asociación temporal entre el DLMO y estos marcadores, solo AcOff se correlacionó significativamente con el DLMO. Esto coincide con estudios previos, en los cuales la fase del inicio del sueño estimada mediante actigrafía coincidió con la fase medida mediante 6-sulphatometoxymelatonin (Middleton et al. 1996; Middleton et al. 1997) y por DLMO (Carskadon et al. 1997). Los índices compuestos se correlacionaron significativamente con el DLMO. Sólo aquellos derivados de la WT precedieron al DLMO, lo cual concuerda con lo concluido de las correlaciones cruzadas.

El índice WTiO se propuso para eliminar la influencia de la variación inter-individual en la pendiente del incremento vespertino de WT. El cálculo se basó en estimar la hora a la que se produce el 35 % del incremento entre L2 y M5. Este índice se correlacionó y mostró la mejor predicción para el DLMO, mostrando además una alta coincidencia temporal. Aunque el marcador M5 del TAP también mostró una alta precisión (<200 min), el WTiO se eligió debido a que la WT es la única variable adelantada con respecto al DLMO. Sin embargo, serían necesarios más estudios con sujetos de todos los cronotipos y edades para validar este índice.

Previamente se ha estudiado la relación entre la puntuación del cuestionario de matutinidad-vespertinidad de Horne-Östberg (Horne & Östberg 1976) y marcadores de fase como el DLMO (Martin & Eastman 2002; Mongrain et al. 2004; Goulet et al. 2007). Como cabe esperar, nuestros resultados mostraron fuerte correlación inversa entre la puntuación de HO y la hora del DLMO: cuanto más vespertino se es, más tarde tiene lugar el DLMO, al igual que en estudios en los que la preferencia diurna fue un criterio de inclusión (Duffy et al. 1999; Griefahn 2002; Mongrain et al. 2004; Goulet et al. 2007). Encontramos también una correlación positiva entre la puntuación del PSQI y el DLMO, indicando que los sujetos con un DLMO más tardío tienen peor calidad del sueño que aquellos con un DLMO más temprano, al igual que en otros estudios (Olbrich & Dittmar 2011). También se ha descrito previamente que la vespertinidad está relacionada con corta duración de sueño (Tzischinsky & Shochat 2011), menor eficiencia de sueño (Lehnkering & Siegmund 2007), altos niveles de somnolencia diurna (Chung & Cheung 2008; Tzischinsky & Shochat 2011), y mayores niveles de fatiga (Taylor et al. 2011).

Así, se confirma la utilidad de los diarios de sueño y el cuestionario de Horne-Östberg para estimar la fase circadiana y preferencia diurna. Sin embargo, a pesar de su calidad, su precisión depende de la capacidad del sujeto para completarlos correctamente. En este y otros estudios, los voluntarios fueron compensados por su participación, por lo que estaban motivados para contestar correctamente a los cuestionarios. Sin embargo, en Clínica, el hecho de rellenarlos podría ser un problema para pacientes, por ejemplo, con sus capacidades cognitivas deterioradas. Además, los cuestionarios no aportan información acerca del grado de seguimiento en un tratamiento circadiano, mientras que un sistema ambulatorio que permita monitorizar al sujeto durante largos periodos de tiempo sí lo hace. Así, proponemos que estos cuestionarios sean complementarios a medidas más objetivas.

En conclusión, el método de medida no invasivo propuesto y sus índices de fase detectan de forma precisa la fase del sistema circadiano en condiciones de vida libre. Además, recomendamos el uso del WTiO, debido a su fuerte correlación, capacidad predictiva y coincidencia temporal con el DLMO, así como por la facilidad de su cálculo. Ahora son necesarios más estudios con otros grupos de sujetos y con patologías específicas para demostrar su validez. Este método sería muy útil en medicina del sueño o en otras condiciones clínicas en las que el conocimiento de la fase circadiana endógena del sujeto es importante, como en la luminoterapia o en la cronoterapia del cáncer.

Agradecimientos

Agradecemos a M. Martínez su ayuda al revisar el manuscrito. Los autores agradecen al Instituto de Salud Carlos III, el Ministerio de Ciencia e Innovación y el Ministerio de Economía and Competitividad por su apoyo económico en este estudio a través de la Red de Investigación Cooperativa en Envejecimiento y Fragilidad, RETICEF (RD12/0043/0011), BFU 2010-21945-CO1, y IPT-2011-0833-900000, estos dos últimos, incluyendo la cofinanciación con Fondos FEDER a J. A. Madrid. Además, los autores agradecen al Ministerio de Educación y Ciencia por la beca de investigación concedida a MA Bonmatí (FPU2009-1051).

Referencias

- Acebo C & Lebourgeois MK. 2006. Actigraphy. *Respiratory Care Clinics of North America* 12: 23–30.
- Arendt J. 2003. Importance and relevance of melatonin to human biological rhythms. *Neuroendocrinology* 154: 427-31.
- Benloucif S, Burgess HJ, Klerman EB, Lewy AJ, Middleton B, Murphy PJ, Parry BL & Revell VL. 2008. Measuring melatonin in humans. *Journal of Clinical Sleep Medicine* 4: 66–69.
- Buysse DJ, Reynolds III CF, Monk TH, Berman SR & Kupfer DJ. 1988. The Pittsburgh Sleep Quality Index: A New Instrument for Psychiatric Practice and Research. *Psychiatry Research* 28: 193–213.
- Carskadon MA, Acebo C, Richardson GS, Tate BA & Seifer R. 1997. An approach to studying circadian rhythms of adolescent humans. *Journal of Biological Rhythms* 12: 278–289.
- Cho K, Ennaceur A, Cole JC & Suh CK. 2000. Chronic jet lag produces cognitive deficits. *Journal of Neuroscience* 20: RC66 1-5.
- Chung KF & Cheung MM. 2008. Sleep-wake patterns and sleep disturbance among Hong Kong Chinese adolescents. *Sleep* 31: 185–194.
- Conlon M, Lightfoot N & Kreiger N. 2007. Rotating shift work and risk of prostate cancer. *Epidemiology* 18: 182–183.
- Davis S, Mirick DK & Stevens, RG. 2001. Night shift work, light at night, and risk of breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 93: 1557–1562.
- Deacon S & Arendt J. 1994. Posture influences melatonin concentrations in plasma and saliva in humans. *Neuroscience Letters* 167: 191–194.
- Dewan K, Benloucif S, Reid K, Wolfe LF & Zee PC. 2011. Light-induced changes of the circadian clock of humans: increasing duration is more effective than increasing light intensity. *Sleep* 34: 593–599.
- Dijk DJ & Czeisler CA. 1995. Contribution of the circadian pacemaker and the sleep homeostat to sleep propensity, sleep structure, electroencephalographic slow waves, and sleep spindle activity in humans. *Journal of Neuroscience* 15: 3526–3538.
- Duffy JF, Dijk DJ & Hall EF. 1999. Relationship of endogenous circadian melatonin and temperature rhythms to self-reported preference for morning or evening activity in young and older people. *Journal of Investigative Medicine* 47: 141–150.
- Duffy JF, Ronda JM & Czeisler C. 1997. Variation of electroencephalographic activity during non-rapid eye movement and rapid eye movement sleep with phase of circadian melatonin rhythm in humans. *Journal of Physiology* 505: 851–858.
- Erren TC, Falaturi P & Reiter RJ. 2010. Research into the chronodisruption-cancer theory: the imperative for causal clarification and the danger of causal reductionism. *Neuroendocrinology Letters* 31: 1–3.
- Garaulet M & Madrid JA. 2010. Chronobiological aspects of nutrition, metabolic syndrome and obesity. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62: 967–978.
- Goulet G, Mongrain V & Desrosiers C. 2007. Daily light exposure in morning-type and evening-type individuals. *Journal of Biological Rhythms* 22: 151–158.
- Griefahn B. 2002. The validity of the temporal parameters of the daily rhythm of melatonin levels as an indicator of morningness. *Chronobiology International* 19: 561–577.
- Horne JA & Östberg O. 1976. A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. *International Journal Chronobiology* 4: 97–110.
- Johns MW. 1991. A New Method for Measuring Daytime Sleepiness: The Epworth Sleepiness Scale. *Sleep* 14: 510–545.
- Knutsson A, Bøggild H. 2000. Shiftwork and cardiovascular disease: review of disease mechanisms. *Reviews on Environmental Health* 15:359–72.
- Kolodyazhniy V, Späti J, Frey S, Götz T, Wirz-Justice A, Kräuchi K, Cajochen C & Wilhelm FH. 2011. . Estimation of human circadian phase via a multi-channel ambulatory monitoring system and a multiple regression model. *Journal of Biological Rhythms* 26: 55–67.
- Kräuchi K, Cajochen C, Werth E & Wirz-Justice A. 2000. Functional link between distal vasodilation and sleep-onset latency? *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 278: 741–748.

- Kräuchi K & Wirz-Justice A. 1994. Circadian rhythm of heat production, heart rate, and skin and core temperature under unmasking conditions in men. *American Journal of Physiology* 267: 819–829.
- Kräuchi K & Wirz-justice A. 2001. Circadian clues to sleep onset mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 25: 92–96.
- Kräuchi K. 2007. The thermophysiological cascade leading to sleep initiation in relation to phase of entrainment. *Sleep Medicine Reviews* 11: 439–451.
- Kubo T, Ozasa K, Mikami K, Wakai K, Fujino Y, Watanabe Y, Miki T, Nakao M, Hayashi K, Suzuki K, Mori M, Washio M, Sakauchi F, Ito Y, Yoshimura T & Tamakoshi A. 2006. Prospective cohort study of the risk of prostate cancer among rotating-shift workers: findings from the Japan collaborative cohort study. *American Journal of Epidemiology* 164: 549–555.
- Lack LC, Gradisar M, Van Someren EJW, Wright HR & Lushington K. 2008. The relationship between insomnia and body temperatures. *Sleep Medicine Reviews* 12: 307–317.
- Lázár AS, Slak A, Lo JC, Santhi N, von Schantz M, Archer SN, Groeger JA & Dijk DJ. 2012. Sleep, diurnal preference, health, and psychological well-being: a prospective single-allelic-variation study. *Chronobiology International* 29: 131–146.
- Lehnkering H & Siegmund R. 2007. Influence of chronotype, season, and sex of subject on sleep behavior of young adults. *Chronobiology International* 24: 875–888.
- Lévi F & Okyar A. 2011. Circadian clocks and drug delivery systems: impact and opportunities in chronotherapeutics. *Expert Opinion on Drug Delivery* 8: 1535–1541.
- Lewy AJ, Cutler NL & Sack RL. 1999. The endogenous melatonin Profile as a Marker for Circadian Phase Position. *Journal of Biological Rhythms* 14: 227–236.
- Lewy AJ & Sack RL. 1989. The dim light melatonin onset as a marker for circadian phase position. *Chronobiology International* 6: 93–102.
- Martin SK & Eastman CI. 2002. Sleep logs of young adults with self-selected sleep times predict the dim light melatonin onset. *Chronobiology International* 19: 695–707.
- Martínez-Nicolás A, Ortiz-Tudela E, Madrid JA & Rol MA. 2011. Crosstalk between environmental light and internal time in humans. *Chronobiology International* 28: 617–629.
- Middleton B, Arendt J & Stone BM. 1996. Human circadian rhythms in constant dim light 8 lux with knowledge of clock time. *Journal of Sleep Research* 5: 69–76.
- Middleton B, Arendt J & Stone BM. 1997. Complex effects of melatonin on human circadian rhythms in constant dim light. *Journal of Biological Rhythms* 12: 467–477.
- Mongrain V, Lavoie S & Selmaoui B. 2004. Phase relationships between sleep-wake cycle and underlying circadian rhythms in Morningness-Eveningness. *Journal of Biological Rhythms* 19: 248–257.
- Morris C, Atkinson G, Drust B, Marrin K & Gregson W. 2009. Human core temperature responses during exercise and subsequent recovery: an important interaction between diurnal variation and measurement site. *Chronobiology International* 26: 560–575.
- Olbrich D & Dittmar M. 2011. Older poor-sleeping women display a smaller evening increase in melatonin secretion and lower values of melatonin and core body temperature than good sleepers. *Chronobiology International* 28: 681–689.
- Ortiz-tudela E, Martinez-Nicolas A, Campos M, Rol MA & Madrid JA. 2010. A new integrated variable based on thermometry, actimetry and body position TAP to evaluate circadian system status in humans. *PLoS Computational Biology* 6: 1-11.
- Pandi-Perumal SR, Smits M, Spence W, Srinivasan V, Cardinali DP, Lowe AD & 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 & Biological Psychiatry* 31: 1–11.
- Pullman RE, Roepke SE & Duffy JF. 2012. Laboratory validation of an in-home method for assessing circadian phase using dim light melatonin onset DLMO. *Sleep Medicine* 13: 703–706.
- Reid KJ, Jaksaa AA, Eisengart JB, Baron KG, Lu B, Kane P, Kang J & Zee PC. 2012. Systematic evaluation of Axis-I DSM diagnoses in delayed sleep phase disorder and evening-type circadian preference. *Sleep Medicine* 13: 1171–7.
- Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A, Erren TC, Piekarski C, Tamura H & Manchester LC. 2007. Light at night, chronodisruption, melatonin suppression, and cancer risk: a review. *Critical Reviews in Oncogenesis* 13: 303–328.
- Reiter RJ, Tan D-X, Korkmaz A & Ma, S. 2011. Obesity and metabolic syndrome: Association with chronodisruption, sleep deprivation, and melatonin suppression. *Annals of Medicine* 44: 1–14.
- Roenneberg T, Daan S & Mrosovsky M. 2003. The art of entrainment. *Journal of Biological Rhythms* 18: 183–94.
- Roenneberg T, Wirz-justice A & Mrosovsky M. 2003. Life between Clocks: Daily Temporal Patterns of Human Chronotypes. *Journal of Biological Rhythms* 18: 80–90.
- Sadeh A & Acebo C. 2002. The role of actigraphy in sleep medicine. *Sleep Medicine Reviews* 6: 113–24.

- Sarabia JA, Rol MA, Mendiola P & Madrid JA. 2008. Circadian rhythm of wrist temperature in normal-living subjects: A candidate of new index of the circadian system. *Physiology and Behavior* 95: 570–580.
- Schernhammer ES, Laden F, Speizer FE, Willett WC, Hunter DJ, Kawachi I & Colditz GA. 2001. Rotating night shifts and risk of breast cancer in women participating in the nurses' health study. *Journal of the National Cancer Institute* 93: 1563–1568.
- Schernhammer ES, Laden F, Speizer FE, Willett WC, Hunter DJ, Kawachi I, Fuchs CS & Colditz GA. 2003. Night-Shift Work and Risk of Colorectal Cancer in the Nurses' Health Study. *Journal of the National Cancer Institute* 95: 825–828.
- Schmidt C, Collette F, Cajochen C & Peigneux P. 2007. A time to think: circadian rhythms in human cognition. *Cognitive Neuropsychology* 24: 755–789.
- Sharkey KM, Carskadon MA, Figueiro MG, Zhu Y & Rea MS. 2011. Effects of an advanced sleep schedule and morning short wavelength light exposure on circadian phase in young adults with late sleep schedules. *Sleep Medicine* 12: 685–692.
- Taylor DJ, Clay KC, Bramoweth AD, Sethi K & Roane BM. 2011. Circadian phase preference in college students: relationships with psychological functioning and academics. *Chronobiology International* 28: 541–547.
- Teunissen LP, de Haan A, de Koning JJ & Daanen HA. 2012. Telemetry pill versus rectal and esophageal temperature during extreme rates of exercise-induced core temperature change. *Physiological Measurement* 33: 915.
- Tzischinsky O & Shochat T. 2011. Eveningness, sleep patterns, daytime functioning, and quality of life in Israeli adolescents. *Chronobiology International* 28: 338–343.
- Van Someren EJ, Swaab DF, Colenda CC, Cohen W, McCall WV & Rosenquist PB. 1999. Bright Light Therapy: improved sensitivity to its effects on rest-activity rhythms in Alzheimer patients by application of nonparametric methods. *Chronobiology International* 16: 505–518.
- Voultsios A, Kennaway DJ & Dawson D. 1997. Salivary melatonin as a circadian phase marker: validation and comparison to plasma melatonin. *Journal of Biological Rhythms* 12: 457–466.
- Wyatt JK, Ritz-De Cecco A, Czeisler CA & Dijk DJ. 1999. Circadian temperature and melatonin rhythms, sleep, and neurobehavioral function in humans living on a 20-h day. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 277: 1152–1163.
- Zeitzer JM, Friedman L & Yesavage JA. 2012. Effectiveness of evening phototherapy for insomnia is reduced by bright daytime light exposure. *Sleep Medicine* 12: 805–807.