



Revisión

El papel de los ritmos biológicos en la interpretación de los resultados en el laboratorio clínico. Conceptos básicos

Role of biological rhythms in the interpretation of clinical laboratory results. Basic concepts

María Carmen Lorenzo Lozano^{1,2}, Alfonso Luis Blázquez Manzanera^{1,3}, María Elena Redín Sarasola^{1,4}, Enrique Prada de Medio^{1,5}, Raquel Blázquez Sánchez^{1,6}, Laura Criado Gómez^{1,6}, Félix Gascón Luna^{1,7}, Daniel Pineda Tenor^{1,8}, Ana Cosmen Sánchez^{1,9} y Santiago Prieto Menchero^{1,10}

¹Comité de Calidad, Gestión, Seguridad y Evidencia. Asociación Española de Biopatología Médica-Medicina de Laboratorio (AEBM-ML). Madrid. ²Complejo Hospitalario Universitario de Toledo. Toledo. ³Hospital General Universitario Rafael Méndez. Lorca, Murcia. ⁴Hospital Universitario de Donostia. Donostia, Gipuzkoa. ⁵Hospital Virgen de la Luz. 16002 Cuenca. ⁶Hospital Universitario de Móstoles. Móstoles, Madrid. ⁷Hospital Valle de los Pedroches. Pozoblanco, Córdoba. ⁸Hospital de Antequera (Área de Gestión Sanitaria Norte de Málaga). Antequera, Málaga. ⁹Hospital Santa Bárbara. Puertollano, Ciudad Real. ¹⁰Hospital Universitario de Fuenlabrada. Fuenlabrada, Madrid

Recibido: 05/04/2020
Aceptado: 30/07/2020

Correspondencia: María Carmen Lorenzo Lozano. Complejo Hospitalario Universitario de Toledo. Avenida Barber, 30. 45071 Toledo.
e-mail: mainlo@hotmail.com

Palabras clave:

Cronobiología. Ritmo biológico. Innovación en laboratorio clínico.

RESUMEN

La Cronobiología es la rama de la biología que estudia la organización temporal de los procesos fisiológicos. Aunque sus aplicaciones son ampliamente estudiadas en otras áreas de la medicina, en el laboratorio clínico existen nuevas oportunidades de investigación con la incorporación de la inteligencia artificial. Estamos familiarizados a asociar resultados de algunas hormonas a sus horas de extracción (cortisol o melatonina). Sin embargo, son pocos los estudios que analizan la presencia de variabilidad circadiana de otros parámetros analizados en el laboratorio clínico. Una correcta recogida de la hora de extracción de muestras por parte de los sistemas informáticos del laboratorio podría aportar información relevante para llevar a cabo estudios de investigación e interpretación en esta disciplina. Queremos presentar unas nociones básicas sobre Cronobiología e invitar al desarrollo de líneas de investigación en este campo.

Contribución de los autores: María Carmen Lorenzo Lozano y Alfonso Luis Blázquez Manzanera han contribuido por igual como primeros autores. Todos los autores han contribuido intelectualmente en el trabajo y reúnen las condiciones de autoría, aprobando la versión final del mismo.

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

DOI: 10.20960/revmedlab.00022

Lorenzo Lozano MC, Blázquez Manzanera AL, Redín Sarasola ME, Prada de Medio E, Blázquez Sánchez R, Criado Gómez L, Gascón Luna F, Pineda Tenor D, Cosmen Sánchez A, Prieto Menchero S. El papel de los ritmos biológicos en la interpretación de los resultados en el laboratorio clínico. Conceptos básicos. Rev Med Lab 2020;1(2):69-75

Keywords: Chronobiology. Biological rhythm. Clinical laboratory innovation.

ABSTRACT

Chronobiology is the branch of biology concerned with the periodicity occurring in physiological processes. While its applications have been widely studied in multiple medical areas, in the clinical laboratory there are new research opportunities with the incorporation of artificial intelligence. We are familiar to associate some hormone levels with their extraction time (cortisol or melatonin). However, there are very few studies evaluating the presence of circadian variation in other parameters tested in the clinical laboratory. Correctly recording the timing of the specimen collection in the laboratory information systems could provide relevant information for research and interpretation studies in this discipline. We want to introduce some basic concepts of chronobiology and to promote research in this field.

ANTECEDENTES: ORÍGENES DE LOS RELOJES BIOLÓGICOS Y DE LA CRONOBIOLOGÍA

Desde sus orígenes, la Tierra ha estado girando alrededor de su propio eje y alrededor del Sol, generando la alternancia día-noche y la oscilación estacional respectivamente. Existen otros ciclos ambientales con influencia sobre la fisiología humana, como el ciclo lunar, que presenta una oscilación cada 28 días aproximadamente. Estas oscilaciones ambientales han provocado la aparición de los relojes biológicos, que han permitido que los seres vivos sincronicen su comportamiento y fisiología con el ambiente. Además, estos relojes biológicos suponen una ventaja adaptativa, ya que permiten anticipar los cambios cíclicos previendo (y no reaccionando) ante estas oscilaciones ambientales.

La observación de las variaciones periódicas en parámetros de salud data de los médicos del Antiguo Egipto y, posteriormente, médicos y filósofos griegos ahondaron en esta cuestión. Ya en el siglo IV a. C., Andróstenes describió los ritmos de apertura y cierre de las hojas del tamarindo. Sin embargo, en todas estas observaciones se consideró que estos ritmos sucedían como una respuesta pasiva a los cambios astronómicos. En el año 1729, Jean Jacques d'Ortois de Mairan describió los movimientos foliares de *Mimosa pudica* aislándola de los ciclos astronómicos. Para ello, la mantuvo en condiciones de oscuridad constante y observó que los movimientos foliares se mantenían en ausencia de la señal astronómica y, por tanto, eran endógenos (1). El primer ritmo biológico descrito en humanos se atribuye a Sanctorius, quien a principios del siglo XVII registró durante meses su propio peso y turbidez de la orina; mientras que el primer ritmo circadiano (del latín *circa diem*, que significa aproximadamente un día) fue descrito por Briton J. Davy en 1845. Davy descubrió que la temperatura central del cuerpo presentaba un ritmo con un valor máximo alrededor de las 18:30 y un mínimo alrededor de las 04:00 (2). Debido al concepto de homeostasis, introducido por Claude Bernard en 1865 y definido por Walter Bradford Cannon en 1926 (3), que tenía demasiado peso en la medicina, eran muy

pocas las líneas de investigación en el campo de la Cronobiología. En 1960 con el Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology (4), simposio liderado por los considerados padres de la Cronobiología (Colin Pittendrigh, Jürgen Aschoff y Franz Halberg) describieron el encarrilamiento, los sincronizadores, la independencia relativa de la temperatura ambiental, la curva de respuesta de fase y la heredabilidad del periodo de los ritmos biológicos (5-10). Actualmente, el número de publicaciones en este ámbito crece exponencialmente en campos tan distintos como la cronoterapia del cáncer (11), la desorganización temporal debida al trabajo a turnos (12) o los mecanismos moleculares del reloj biológico, cuyos autores fueron galardonados con el premio Nobel de Medicina en 2017 (13).

ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL SISTEMA CIRCADIANO

El sistema circadiano es el responsable de la organización temporal de todos los procesos que ocurren en el organismo. Como consecuencia de ello, estos procesos van a presentar una oscilación circadiana y estarán sincronizados con el medio ambiente. El sistema circadiano se estructura en:

1. Entradas, que reciben la información temporal (14).
2. Marcapasos central, que recibe y procesa la señal de las entradas y la transmite al resto del organismo (15).
3. Salidas, que conforman la multitud de ritmos manifiestos dependientes del sistema circadiano (16). Existen, además, osciladores periféricos en el cerebro y otros tejidos, tales como hígado, tejido adiposo, riñón o corazón (17).

Entradas

El sincronizador o *zeitgeber* (palabra alemana que significa dador de tiempo) más importante del sistema

circadiano humano es el ciclo luz-oscuridad. La información lumínica se recibe por medio de una población de células ganglionares de la retina intrínsecamente fotosensibles, las cuales integran también la información que reciben de conos y bastones (18,19). El pigmento presente en estas células se denomina melanopsina y pertenece a la familia de las opsinas fotosensibles, con un máximo de sensibilidad *in vivo* a 481 nanómetros (20). Existen otros sincronizadores menos importantes como el ejercicio físico, la temperatura ambiental, el ciclo sueño-vigilia o la alimentación (21).

Marcapasos central

El marcapasos principal se sitúa en los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo (NSQ). La información lumínica de la retina viaja a través del tracto retinohipotalámico hasta la región ventrolateral del NSQ, la cual la procesa y transmite a la región dorsomedial de los NSQ; estos conforman el marcapasos propiamente dicho (15). Cada neurona del marcapasos principal es un oscilador independiente, que se sincroniza con el resto de neuronas osciladoras para transmitir una periodicidad común al resto del organismo (22). Cada oscilador neuronal muestra ritmos circadianos en la expresión de ARN mensajero y en la síntesis de proteínas del reloj molecular. Así, los factores de transcripción BMAL1 y CLOCK (NPAS en los NSQ) constituyen un heterodímero que promueve la expresión de los factores de transcripción PER y CRY, los cuales dimerizan para inhibir su propia expresión y la del dímero CLOCK:BMAL1 (23). Todas las células del organismo presentan este reloj molecular. Sin embargo, los relojes periféricos no son capaces de generar autónomamente la oscilación circadiana y necesitan ser sincronizados por el marcapasos central (17).

Salidas

El marcapasos principal controla la organización temporal del organismo por medio de mediadores nerviosos y humorales, que van a regular la secreción de hormonas como el cortisol, la melatonina o la gonadotropina; o el control de ritmos manifiestos como la alimentación o el ciclo sueño-vigilia (16). Algunos de los ritmos manifiestos más importantes se denominan ritmos marcadores, ya que permiten inferir el funcionamiento del marcapasos principal. De entre estos, el ritmo de melatonina plasmática se considera el *gold standard*, ya que su síntesis y liberación es dependiente del marcapasos principal. La melatonina se secreta durante la noche del individuo y en ausencia de luz, alcanzando su máximo durante la misma (16,24). Los ritmos de temperatura corporal central y periférica distal son también ritmos marcadores que se encuentran en antifase (tienen un patrón inverso) y guardan una relación de fase estable con la secreción de melatoni-

na (16). Existen otros ritmos marcadores como el de actividad física, que, aunque es menos fiable, ha demostrado ser una herramienta útil en la evaluación del sistema circadiano en problemas de sueño (25).

Cronodisrupción y cronopotenciación

La alteración del orden temporal de un individuo por la exposición inadecuada a la luz, el *jetlag* crónico (debido a vuelos transmeridianos o compromisos sociales) y/o el trabajo a turnos se conoce como disrupción circadiana o cronodisrupción. Es tal la importancia de este trastorno que recientemente se incluyó en el grupo 2A de la Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) como probablemente carcinogénica en humanos (12). La alteración circadiana puede ser detectada por una pérdida de ritmicidad, por avances, retrasos o inestabilidad de fase, por la desincronización interna del individuo o por la desincronización del individuo con respecto a su ambiente (26). Sin embargo, recientemente se ha propuesto que la cronodisrupción puede ser definida como la rotura del nexo fisiológico entre el tiempo interno y el externo (27).

Afortunadamente, existen estrategias para paliar o revertir los efectos de la cronodisrupción, las cuales están basadas en potenciar los sincronizadores del sistema circadiano y se engloban en el concepto de cronopotenciación (14). De este modo, para potenciar el sistema circadiano se puede aumentar el contraste lumínico y térmico entre el día y la noche, suministrar melatonina, realizar ejercicio regular, mantener contactos sociales regulares y favorecer los horarios de alimentación y de sueño regulares (16).

¿Cómo se evalúa el sistema circadiano?

Propiedades fundamentales

La propiedad más importante de un ritmo biológico es su carácter endógeno, por la cual el ritmo permanece en ausencia de las señales sincronizadoras ambientales. Sin embargo, el periodo de oscilación endógeno (τ) difiere ligeramente del periodo del *zeitgeber* (T) (5). Además, un ritmo biológico debe poder ser encarilado por un *zeitgeber*, lo que lo lleva a presentar el periodo del *zeitgeber* con una cierta relación de fase (ψ), que permanece estable (28) (Fig. 1). Por último, el reloj biológico es capaz de compensar las variaciones térmicas, lo que se traduce en un periodo estable a pesar de los cambios de temperatura ambiental (29).

Clasificación según su periodo

Los ritmos biológicos pueden clasificarse según la duración de una oscilación completa, es decir, de su periodo, apareciendo tres categorías (28):

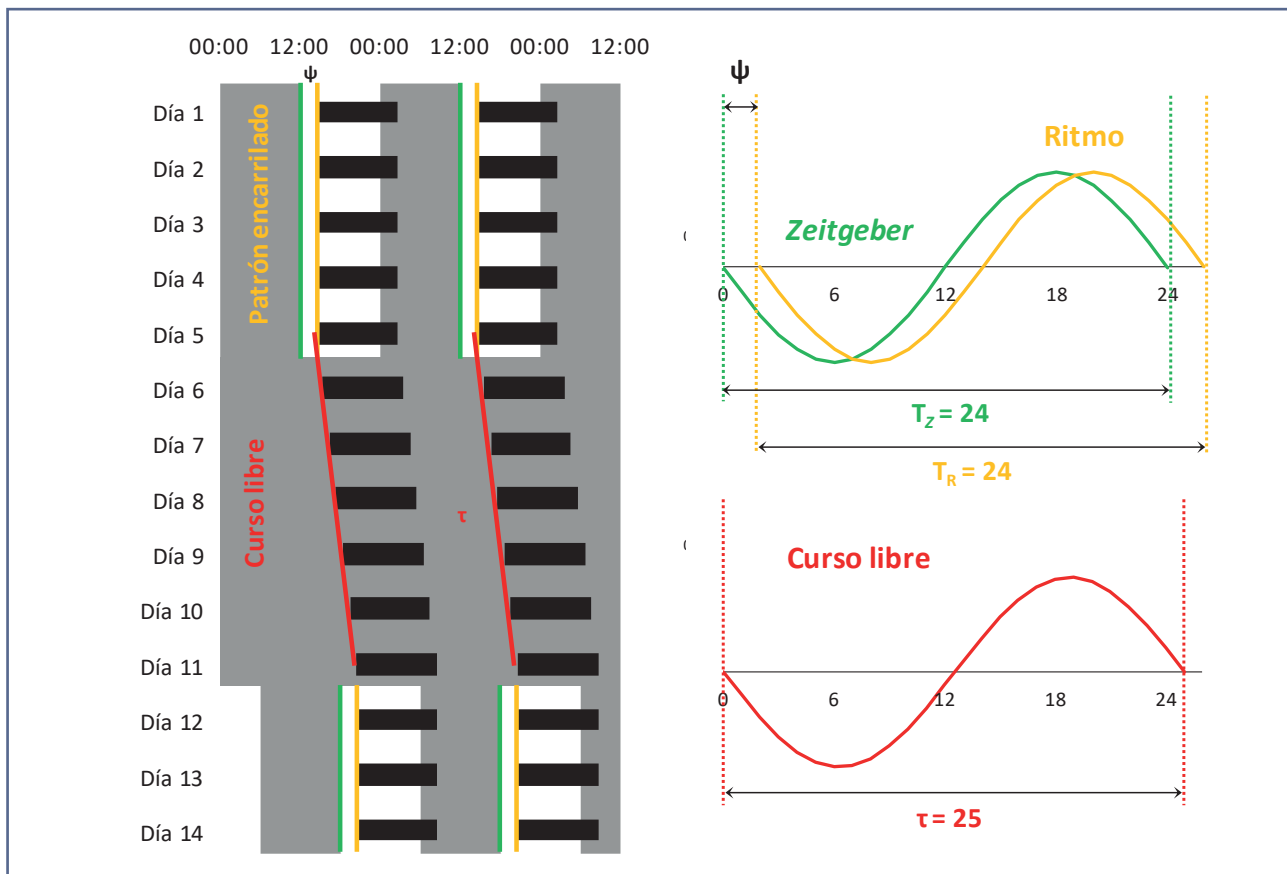


Figura 1 – Encarrilamiento. En el medio ambiente, un ritmo biológico exhibe un periodo de 24 horas (T_R), ya que está encarrilado por un zeitgeber con ese periodo (T_z) (representado por el ciclo luz oscuridad en el ejemplo) con una relación de fase determinada (ψ) entre ambos. Sin embargo, la ausencia del zeitgeber provoca que el ritmo biológico entre en curso libre (τ) con un periodo cercano a las 24 horas ($\tau = 25$ horas en el ejemplo). Tomada de cita 28.

1. **Ritmos infradianos:** oscilaciones periódicas endógenas con menos de una oscilación al día (periodo endógeno o tau mayor de 28 horas). En esta categoría se incluyen los ritmos circalunares y circanuales.
2. **Ritmos circadianos:** oscilaciones biológicas con periodo endógeno de aproximadamente un día (entre 20 y 28 horas). La mayor parte de los ritmos biológicos están comprendidos en esta categoría, tales como los ritmos de secreción de melatonina y cortisol, el ciclo sueño/vigilia o los ritmos de temperatura corporal.
3. **Ritmos ultradianos:** oscilaciones periódicas con más de una oscilación al día (periodo endógeno inferior a 20 horas). A esta categoría pertenecen los patrones de secreción de diversas hormonas.

A pesar de esta clasificación, existen variables que presentan ritmos incluidos en más de una categoría, como las hormonas sexuales, que presentan oscilaciones ultra- circa- e infradianas o el patrón de secreción de melatonina, que muestra oscilaciones circa- e infradianas (30).

Análisis de los ritmos biológicos

El análisis más sencillo (y también el más utilizado) para caracterizar un ritmo biológico es el método de Cossinor, por el cual se ajustan los datos obtenidos a una función coseno. Los parámetros que se obtienen de este método paramétrico son el mesor (línea media de la función coseno a la que se ajustan los datos), amplitud (diferencia entre el máximo, o el mínimo, de dicha función coseno y el mesor), acrofase (momento en el que ocurre el máximo en la función coseno ajustada) y porcentaje de varianza explicado por el modelo (31) (Fig. 2).

Sin embargo, si los datos no se ajustan a una función coseno se puede realizar un análisis no paramétrico, que caracteriza el ritmo biológico mediante: *estabilidad interdiaria* (IS), que representa lo parecidos que son los días entre sí; *variabilidad intradiaria* (IV), que mide la fragmentación del ritmo; *valores* máximos y mínimos (promedio de un número de horas consecutivas de valores más altos y más bajos, respectivamente), que permiten medir el rango de oscilación junto al momento en que ocurre, y *amplitud relativa* (RA), que es la diferencia de los valores máximos menos los valores mínimos, dividida por la suma de ambos (32-34).

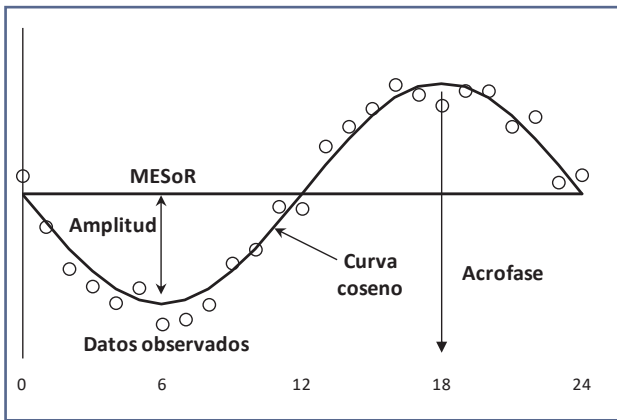


Figura 2 – Análisis de Cosinor. La figura representa el mejor ajuste de los datos utilizando la función coseno junto a la representación gráfica de mesor, amplitud y acrofase.

LOS RITMOS BIOLÓGICOS EN EL LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO CLÍNICO

La práctica diaria en el laboratorio clínico incluye el análisis de diferentes analitos en circunstancias muy variadas, tales como la edad, el sexo o el estado de salud del paciente. Sin embargo, la fase del ritmo biológico se tiene en consideración solamente para ritmos de secreción hormonal, como es el caso de las hormonas sexuales en el ciclo ovárico o la melatonina y el cortisol a lo largo del día.

En este sentido, la hora del día es clave para la correcta interpretación del resultado analítico. Por ejemplo, en el eje hipotálamo-hipófisis aparecen ritmos asociados al ciclo sueño-vigilia:

- **ACTH (hormona adrenocorticotropa) y cortisol:** presentan un máximo alrededor del momento del despertar y va disminuyendo a lo largo del día, apareciendo el mínimo en la primera mitad del sueño. La ACTH puede triplicar sus valores entre el máximo y el mínimo, mientras que el cortisol llega a multiplicar su valor por ocho (35).
- **TSH (hormona estimulante de la tiroides):** esta hormona presenta un claro patrón circadiano con valores más bajos durante la fase de actividad y que llegan a duplicarse durante la fase del sueño (36).
- **GH (hormona de crecimiento):** presenta una secreción claramente pulsátil, oscilando entre valores cercanos a cero y 10 ng/ml en el máximo situado en la primera mitad de la noche (37).
- **Prolactina:** hormona con un claro ritmo circadiano, en el que los valores de la noche llegan a quintuplicar los valores del día (38).
- **Testosterona:** presenta un ritmo de escasa amplitud, con valores más altos por la noche y un pico en torno al momento del despertar (35).
- En el caso de los leucocitos están descritos ritmos para todas sus poblaciones con máximos en la tarde o la noche, cuyos valores son entre un 50 y un

100 % superiores a los que se encuentran durante el día (39).

- Existen otras variables con claros ritmos circadianos, como es el caso de la serie roja (40), la hemostasia (39,40), la función renal (41) o el metabolismo (42).

RITMOS POBLACIONALES: ¿UNA APROXIMACIÓN SENCILLA AL ESTUDIO DE LOS RITMOS CIRCADIANOS?

La mayor dificultad para el estudio de los ritmos circadianos en parámetros de laboratorio clínico es que sería necesaria la monitorización e ingreso de un sujeto durante 24 horas, extrayendo muestras cada cierto tiempo. Sin embargo, la gran cantidad de sujetos que se analizan en un laboratorio de análisis clínicos a lo largo del día nos puede permitir abordar una perspectiva de futuro tratando de evaluar una primera aproximación a las características de los ritmos. Hay trabajos previos que demuestran la existencia de un ritmo circadiano de datos poblacionales tomados de distintos laboratorios de urgencias (43,44). Este enfoque no es novedoso en la práctica clínica, ya que los datos poblacionales se utilizan habitualmente como valores de referencia en los laboratorios clínicos.

Esta aproximación circadiana a los parámetros analizados en el laboratorio clínico requiere de una compleja labor de cribado y procesamiento con el fin de separar a los sujetos según su patología, grupo de edad o sexo, valores críticos, etc. De esta forma, se podría obtener un perfil circadiano de la población independiente de la variabilidad biológica intra- e interindividual. Posteriormente, habría que analizar si este perfil circadiano es extrapolable al individuo mediante el análisis de ritmos individuales en muestras más pequeñas y, por tanto, manejables.

Sin embargo, el papel del laboratorio clínico debe ir más allá del mero estudio observacional y descriptivo, y aspirar a un desempeño apoyado en herramientas que permitan una adecuada interpretación de los datos en los informes diagnósticos. Para ello, existen programas informáticos y de inteligencia artificial que pueden determinar si diferentes alteraciones de un patrón circadiano pueden ser síntoma de alguna patología o, incluso, predictores de la misma. Debemos profundizar nuestro conocimiento en este tema. En este sentido, el análisis de grandes cantidades de datos (*big data* en inglés) va a permitir contrastar, asociar, predecir e incluso prevenir los eventos médicos adversos de manera personalizada para cada individuo.

El futuro está en el análisis de macrodatos y la inteligencia artificial como posibles áreas futuras de conocimiento para el laboratorio. Es necesario generar registros estructurados que tengan el máximo detalle para que sean de utilidad. Nuestra recomendación es recoger dentro de los sistemas de información del laboratorio un dato más, la fecha y hora de la toma de muestra.

BIBLIOGRAFÍA

1. De Mairan JD. Observation botanique. Histoire de l'Académie Royale des Sciences. Paris; 1729.
2. Landois L. d. *Physiol. d. M.* 1900. *Realencycl. Bd*, 163; 1885.
3. Canon WB. The wisdom of the body; 1932. DOI: 10.1097/00000441-193212000-00028
4. Aschoff J. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1960;25:11-28. DOI: 10.1101/SQB.1960.025.01.004
5. Aschoff J. Circadian Rhythms: Influences of Internal and External Factors on the Period Measured in Constant Conditions 1. *Zeitschrift für Tierpsychologie* 1979;49(3):225-49. DOI: 10.1111/j.1439-0310.1979.tb00290.x
6. Aschoff J, Daan S, Figala J, Müller K. Precision of entrained circadian activity rhythms under natural photoperiodic conditions. *Naturwissenschaften* 1972;59(6): 276-7. DOI: 10.1007/BF00610214
7. Bunning E. Zur Kenntnis der erblichen Tagesperiodizität bei den Primarblättern von *Phaseolus multiflorus*. *Jahrb Wiss Botan* 1935;81:411-8.
8. Bunning E. Über die tagesperiodischen Bewegungen der Primarblätter von *Phaseolus multiflorus*. II. Die Bewegungen beim Thermokonstanz. *Ber Deut Bot Ges* 1930;48:227-52.
9. Pittendrigh CS, Daan S. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. *Journal of Comparative Physiology* 1976;106(3):223-52. DOI: 10.1007/BF01417856
10. Pittendrigh CS. On temperature independence in the clock system controlling emergence time in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1954;40(10):1018-29. DOI: 10.1073/pnas.40.10.1018
11. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Gaddameedhi S, Selby CP, Ye R, Chiou YY, et al. Circadian clock, cancer and chemotherapy. *Biochemistry* 2014;54(2):110-23.
12. Erren TC, Reiter RJ. Defining chronodisruption. *Journal of Pineal Research* 2009;46(3):245-47. DOI: 10.1111/j.1600-079X.2009.00665.x
13. Young MW. Time Travels: A 40-Year Journey from *Drosophila's* Clock Mutants to Human Circadian Disorders (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition* 2018;57(36):11532-9. DOI: 10.1002/anie.201803337
14. Martínez-Nicolas A, Madrid JA, Rol MA. Day-night contrast as source of health for the human circadian system. *Chronobiology International* 2014;31(3):382-93. DOI: 10.3109/07420528.2013.861845
15. Moore RY, Speh JC, Leak RK. Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell and Tissue Research* 2002;309(1):89-98. DOI: 10.1007/s00441-002-0575-2
16. Terzibasi-Tozzini E, Martínez-Nicolas A, Lucas-Sánchez A. The clock is ticking. Ageing of the circadian system: From physiology to cell cycle. In *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2017;70:164-76. Academic Press. DOI: 10.1016/j.semcdb.2017.06.011
17. Ko CH, Yamada YR, Welsh DK, Buhr ED, Liu AC, Zhang EE, et al. Emergence of noise-induced oscillations in the central circadian pacemaker. *PLoS Biology* 2010;8(10): e1000513. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000513
18. Ruby NF, Brennan TJ, Xie X, Cao V, Franken P, Heller HC, et al. Role of melanopsin in circadian responses to light. *Science* 2002;298(5601):2211-3.
19. Hattar S, Lucas RJ, Mrosovsky N, Thompson S, Douglas RH, Hankins MW, et al. Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. *Nature* 2003;424(6944):75. DOI: 10.1038/nature01761
20. Peirson SN, Foster RG. Nonimage Forming Photoreceptors. In *The Circadian Clock*. New York: Springer; 2010. pp. 105-13. DOI: 10.1007/978-1-4419-1262-6_4
21. Roenneberg T, Mrosovsky M. Molecular circadian oscillators: an alternative hypothesis. *Journal of Biological Rhythms* 1998;13(2):167-79. DOI: 10.1177/07487309812900011
22. Webb AB, Angelo N, Huettner JE, Herzog ED. Intrinsic, non-deterministic circadian rhythm generation in identified mammalian neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009;106(38):16493-8. DOI: 10.1073/pnas.0902768106
23. Vanselow JT, Kramer A. Posttranslational regulation of circadian clocks. In: Albrecht U, editor. *Protein Reviews*. Volume 12. *The Circadian Clock*. New York: Springer Science; 2010. pp. 79-104.
24. Van Someren EJ, Nagtegaal E. Improving melatonin circadian phase estimates. *Sleep Medicine* 2007;8(6):590-601. DOI: 10.1016/j.sleep.2007.03.012
25. Morgenthaler TI, Lee-Chiong T, Alessi C, Friedman L, Aurora RN, Boehlecke B, et al. Practice parameters for the clinical evaluation and treatment of circadian rhythm sleep disorders. *Sleep* 2007;30(11):1445-59. DOI: 10.1093/sleep/30.11.1445
26. Bonmati-Carrion MA, Arguelles-Prieto R, Martínez-Madrid MJ, Reiter R, Hardeland R, Rol MA, et al. Protecting the melatonin rhythm through circadian healthy light exposure. *International Journal of Molecular Sciences* 2014;15(12):23448-500. DOI: 10.3390/ijms151223448
27. Erren TC, Reiter RJ. Revisiting chronodisruption: when the physiological nexus between internal and external times splits in humans. *Naturwissenschaften* 2013;100(4):291-8. DOI: 10.1007/s00114-013-1026-5
28. Martínez Nicolás A. Interrelación entre los sincronizadores y el sistema circadiano humano (Crosstalk between synchronizers and the human circadian system). Proyecto de investigación. Tesis doctoral. Pittendrigh, C. S. (1981). *Circadian systems: entrainment*. In: *Biological rhythms*. Boston, MA: Springer; 2014. pp. 95-124.
29. Pittendrigh, C. S. (1960, January). Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 25, pp. 159-184). Cold Spring Harbor Laboratory Press. DOI: 10.1101/SQB.1960.025.01.015
30. Simonneaux V, Garidou ML, Ribelayga C, Pévet P. Mechanisms Underlying Seasonal Regulation of Melatonin Synthesis in Rodents. *Melatonin: Biological Basis of Its*, 1. 2006.
31. Refinetti R, Cornelissen G, Halberg F. Procedures for numerical analysis of circadian rhythms. *Biological Rhythm Research* 2007;38(4):275-325. DOI: 10.1080/09291010600903692
32. Witting W, Kwa IH, Eikelenboom P, Mirmiran M, Swaab DF. Alterations in the circadian rest-activity rhythm in aging and Alzheimer's disease. *Biological Psychiatry* 1990;27(6):563-72. DOI: 10.1016/0006-3223(90)90523-5
33. Van Someren EJ, Swaab DF, Colenda CC, Cohen W, McCall WV, Rosenquist PB. Bright light therapy: improved sensitivity to its effects on rest-activity rhythms in Alzheimer patients by application of nonparametric methods. *Chronobiology International* 1999;16(4):505-18. DOI: 10.3109/07420529908998724
34. Martínez-Nicolas A, Ortiz-Tudela E, Madrid JA, Rol MA. Crosstalk between environmental light and internal time in humans. *Chronobiology International* 2011;28(7):617-29. DOI: 10.3109/07420528.2011.593278
35. Lejeune-Lenain C, Van Cauter E, Désir D, Beyloos M, Franckson JRM. Control of circadian and episodic variations of adrenal androgens secretion in man. *Journal of Endocrinological Investigation* 1987;10(3):267-76. DOI: 10.1007/BF03348129
36. Van Coevorden A, Laurent E, Decoster C, Kerkhofs M, Neve P, Van Cauter E, et al. Decreased basal and stimulated thyrotropin secretion in healthy elderly men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1989;69(1):177-85. DOI: 10.1210/jcem-69-1-177
37. Van Cauter E, Plat L. Physiology of growth hormone secretion during sleep. *The Journal of Pediatrics* 1996;128(5):S32-S37. DOI: 10.1016/S0022-3476(96)70008-2
38. Van Cauter E, L'Hermite M, Copinschi G, Refetoff S, Desir D, Robyn C. Quantitative analysis of spontaneous variations of plasma

- prolactin in normal man. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 1981;241(5):E355-E363. DOI: 10.1152/ajpendo.1981.241.5.E355
39. Haus E, Smolensky MH. Biologic rhythms in the immune system. *Chronobiology International* 1999;16(5):581-622. DOI: 10.3109/07420529908998730
40. Pritchett D, Reddy AB. Circadian clocks in the hematologic system. *Journal of Biological Rhythms* 2015;30(5):374-88. DOI: 10.1177/0748730415592729
41. Gumz ML. Taking into account circadian rhythm when conducting experiments on animals. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2016;310(6):F454. DOI: 10.1152/ajprenal.00549.2015
42. Panda S. Circadian physiology of metabolism. *Science* 2016;354(6315):1008-15.
43. Blázquez AL, Lorenzo MC, Martos AL, González EDR, Perea MP, Bullejos PF, et al. Circadian rhythm of glomerular filtration: A population-based descriptive study in two hospitals. *Clinica Chimica Acta* 2019;493:S480.
44. Lorenzo MC, Blázquez AL, Melguizo DM, González DR, Bullejos PF, Perea MP, et al. Correlation between population values of glomerular filtration and hematocrit circadian pattern of a regional hospital. *Clinica Chimica Acta* 2019;493:S487-S488.