



*TESIS DOCTORAL*

*“Efecto de la ingesta de cereales enriquecidos con triptófano sobre el sueño, melatonina, serotonina, cortisol y estado antioxidante en personas mayores.”*

*Sergio Matito Celaya*

*Departamento de Fisiología*

*Conformidad del/los Director/res:*

*Fdo: Dra. CARMEN BARRIGA IBARS Fdo: Dra. ANA B. RODRÍGUEZ MORATINOS*

*2015*





Facultad de Ciencias.  
Universidad de Extremadura  
Avenida de Elvas s/n.  
06006 Badajoz (España)

Dra. CARMEN BARRIGA IBARS, Catedrática de Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura y Dra. ANA BEATRIZ RODRÍGUEZ MORATINOS, Profesora Titular del Departamento de Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura.

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral, presentada por D. Sergio Matito Celaya con el título “efecto de la ingesta de cereales enriquecidos con triptófano sobre el sueño, niveles de melatonina, serotonina, cortisol y estado antioxidante en personas mayores” ha sido realizada bajo nuestra dirección, en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Extremadura, y entendiendo que reúne todos los requisitos establecidos, autorizamos su presentación para ser juzgado por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Badajoz, a 13 de Noviembre del 2014.

Fdo. Dra. Carmen Barriga Ibars

Fdo. Dra. Ana Beatriz Rodríguez Moratinos



La realización del presente Trabajo de Grado se ha llevado a cabo gracias al apoyo económico de los Laboratorios Ordesa, S.L. a través del Proyecto “Valoración de la ingesta de cereales enriquecidos en Triptófano sobre la actividad diurna y el sueño nocturno en personas mayores y a aquellos que desinteresadamente participaron en el estudio.



**ORDESA FOOD SOLUTIONS**

A la hora de dar las gracias pienso en el camino recorrido hasta aquí, el trabajo final de toda una carrera de estudio y sacrificio personal y el principio del mundo de la investigación. Desde que empecé mi camino en esta parte de mi profesión, he visto como otros compañeros estudiaban, como labraban sus trabajos en el laboratorio, lo bien que se llevaban y se llevan aun a pesar de ser claros competidores, en el departamento donde, gracias al Dr. Campillo, llegué después de exponerle mis ideas. Es por eso que obligadamente debo agradecer al Dr. Campillo su tiempo en aquella ocasión y por ponerme en contacto con mis ahora tutoras.

Una vez en el departamento de Fisiología Animal de la Universidad de Extremadura me entreviste con una de las madres de la investigación en este departamento, la Dra. Carmen Barriga Ibars, la cual me dio la oportunidad de conocer la investigación desde dentro, con todo lo que ello conlleva y a la cual le estaré eternamente agradecido por esa oportunidad. No solo me alegro de haberte conocido como profesional, porque si eres buena como tutora mejor lo eres como persona.

Pero me encontré también con otra de las madres del departamento, la Dra. Ana Beatriz Rodríguez Moratinos, la cual empuja, lucha y da fuerzas a los doctorandos como nadie sabe hacerlo. Como se puede tener tanto empaque y a la vez tanta dulzura en una misma persona.

Es de merecer en esta tesis, dar mi más sincera gratitud a D. Rafael Bravo Santos, de la cual ha sido parte importante y en el que vi un joven estudiante cuando empezamos y un gran investigador cuando acabamos.

Durante mi trayecto hasta llegar a este punto debo de dar las gracias a todos los doctorandos que me ayudaron desde el DEA (diploma de estudios avanzados) hasta ahora, la finalización de mi tesis. No puedo dejar de acordarme de la mente inquieta de

los ahora doctores D. David Narciso Repilado, de la gran persona y bajo mi humilde opinión, gran investigador D. Sergio Damián Paredes Rollano, del Dr. Javier Cubero Juárez, del amigable Dr. Iñaqui Bejarano, de la amabilidad de la Dra. María Garrido Álvarez.

En estas líneas también quiero expresar mi agradecimiento al Dr. José Antonio Pariente el cual te contesta cualquier pregunta sin dudar un momento y a nuestra paciente e incansable Elena de la cual siempre, y digo siempre, vas a esperar una sonrisa por mucha migraña que tenga.

Es verdad cuando comento aquí, que por cada renglón de estos agradecimientos, por cada palabra escrita aquí, pasan mis padres. Soy lo que soy gracias a ellos, a su trabajo, a su perseverancia, a su sacrificio, a su fuerza. Gracias a ti Nandy por haberme enseñado a no desesperanzar, por haberme enseñado a luchar por un sueño ahora realizado. Gracias a ti D. José Manuel por estar ahí siempre, apoyándome en todo, por estar a mi lado en la escalada de cada peldaño.

Finalmente quiero agradecer a todas las personas que desde mi D.E.A. (Diploma de Estudios Avanzados) hasta ahora, mi tesis, se han prestado a ingerir tal concentración de cereales en pro de mis estudios de investigación. En especial a mis tías Emilia y Petra que han sido siempre las primeras en hacer los que sea con tal de ayudarme. A mis hermanos y a sus congéneres por aguantar mis monólogos sobre la Melatonina, a todos mis amigos y compañeros de trabajo y a mi tutor de residencia por interesarse, en esas eternas guardias, por tal hormona y como no, a mis pacientes por creer en mí.

*A mi mujer Isabel y a mi hija Aitana.*

- **(5-PRT)** 5-hidroxitriptófano.
- **(5-HTL)** 5-hidroxitriptofol.
- **(A)** Adrenalina.
- **(AADD)** Acido L-aminoácido descarboxilasa.
- **(5-HIAA)** Acido 5-hidroxiindol acético.
- **(5-MIAA)** Acido 5-metoxiindol acético.
- **(ARNm)** Acido Ribonucleico Mensajero.
- **(FIRDA)** Actividad delta frontal rítmica intermitente.
- **(FAONU)** Agricultura y Alimentación de la Organización de Naciones Unidas.
- **(-NH<sub>2</sub>)** Amino.
- **(AA-NAT)** Arilalquilamina N-acetiltransferasa.
- **(-COOH)** Carboxilo.
- **Células NK** (del inglés, natural killer).
- **(ipRGC)** Células ganglionares fotorreceptoras o intrínsecamente fotosensibles.
- **(CIE-10)** Clasificación estadística internacional de enfermedades y problemas relacionados con la salud, Organización Mundial de la Salud, 1993.
- **(CBG)** Cortisol binding globulin.
- **(DeAc)** Deacetilasa.
- **(AAAD)** Descarboxilasa de aminoácidos aromáticos.
- **(BDI-II)** Depresión de Beck-II.
- **(EEG)** Electroencefalograma.
- **(EOG)** Electrooculograma.
- **(EMG)** Electromiograma.

- **(ECG)** Electrocardiograma.
- **(PGO)** Espigas ponto-genículo-occipitales.
- **(BDNF siglas en inglés)** Factor de crecimiento neurotrófico derivado del cerebro.
- **(GCS)** Ganglio Cervical Superior.
- **(HIOMT)** Hidroxindol-O-metiltransferasa.
- **(HHA)** Hipotálamo hipófisis adrenales.
- **(HPA)** Hipotalámico-pituitario-adrenocortical.
- **(ACTH)** Hormona adrenocorticotropa.
- **(CRH)** Hormona liberadora de corticotropina.
- **(HDL)** High density lipoproteína.
- **(IIMEL)** Instituto Internacional de la Melatonina.
- **(LDL)** Low density lipoprotein.
- **(LNAA)** Large Neutral Amino Acid.
- **(DSM-IV)** Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales, cuarta edición, American Psychiatric Association, 1994.
- **(MEL)** Melatonina, o N-acetil-5-metoxitriptamina.
- **(MAO)** Monoamino oxidasa.
- **(MOR)** Movimientos Oculares Rápidos.
- **(NAT)** N-acetiltransferasa.
- **(NAS)** N-acetylserotonin.
- **(NA)** Noradrenalina.
- **(NREM)** No Rápido Movimiento de Ojos/ **(REM)** Rápido Movimiento de Ojos.
- **(NPV)** Nucleo paraventricular.

- **(NSQ)** Nucleo supraquiasmático.
- **(TRH)** Nucleo retinohipotalámico.
- **P-450scc** (del inglés P-450 *side-change cleavage*)
- **(FIRDA)** Patrón de actividad delta frontal rítmica intermitente.
- **(Puntas PGO)** Puntas Ponto-Genículo-Occipitales.
- **(RDA)** Recomendaciones diarias concretas.
- **(5-HT)** Serotonina o 5-hidroxitriptamina.
- **(SNC)** Sistema Nervioso Central.
- **(StAR)** Steroidogenesis Acute Regulator.
- **(SWS)** *Slow Wave Sleep*.
- **(TRH)** Tracto retinohipotalámico.
- **(TOPH)** Triptófano hidrolasa Indoles.
- **(TPH)** Triptófano hidroxilasa.

# ***INDICE***

---

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>1.1. SUEÑO.</b>	<b>3</b>
1.1.1. DEFINICION DE SUEÑO	3
1.1.2. BASES ANATOMOFISIOLOGICAS DEL SUEÑO.	4
1.1.3. EL SUEÑO POLIGRAFICO.	5
1.1.4. FASES DE SUEÑO.	7
1.1.4.1. Vigilia.	8
1.1.4.2. Sueño de onda lenta. NREM.	9
1.1.4.3. Sueño REM (sueño paradójico).	11
1.1.5. RITMO CIRCADIANO. CRONOBIOLOGIA Y CRONONUTRICION.	14
1.1.6. ENVEJECIMIENTO Y SUEÑO.	20
1.1.7. ENVEJECIMIENTO Y RITMO CIRCADIANO.	24
<b>1.2. FUNCIONALIDAD DE SUSTANCIAS INVOLUCRADAS EN EL SUEÑO Y LA VIGILIA.</b>	<b>26</b>
1.2.1. TRIPTÓFANO.	26
1.1.1. Metabolismo y Función del Triptófano.	27
1.2.2. SEROTONINA.	29
1.2.2.1. Metabolismo y función de la Serotonina.	33
1.2.2.2. Serotonina y sueño.	35
1.2.2.3. Serotonina y vejez.	37
1.2.3. MELATONINA.	38
1.2.3.1. Metabolismo y síntesis de la melatonina.	41
1.2.3.2. Capacidad Funcional de la Melatonina.	47
<b>1.3. CORTISOL, MELATONINA Y ESTRÉS.</b>	<b>53</b>
1.3.1. CORTISOL.	54
1.3.1.1 Síntesis y Metabolismo de cortisol.	55
1.3.1.3 Regulación de la secreción de cortisol.	58
1.3.1.4 Mecanismo de Acción del cortisol.	60
1.3.2. ESTRÉS.	63
1.3.3. REACCION CORTISOL-HORMONA ADRENOCORTICOTROPA Y MELATONINA.	67
1.3.4. CORTISOL Y ENVEJECIMIENTO.	71

---

<b>2. Justificación y Objetivos.</b>	<b>73</b>
<b>3. Materiales y Métodos.</b>	<b>79</b>
3.1. MUESTRA DE ESTUDIO.	81
3.1.2 HISTORIA CLINICA DE CADA PACIENTE.	81
3.2. DIETA Y CEREALES DE ESTUDIO.	82
3.3. OBSERVACION DEL SUEÑO.	83
3.3.1. AGENDAS DE SUEÑO.	83
3.3.2. ACTIWATCH® (ACCELERÓMETRO), READER (LECTOR CONECTADO A UN PC) Y EL SOFTWARE: CAMBRIDGE NEUROTECHNOLOGY LTD (V 5.42).	84
3.4. MUESTRAS DE ORINA.	89
3.5. DETERMINACIÓN DE SEROTONINA Y MELATONINA, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CORTISOL.	86
3.6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.	88
3.7. VALORACION DE LA ANSIEDAD.	88
3.7.1. TEST STAI DE ANSIEDAD (State-Trait Anxiety Inventory).	89
3.7.2. TEST DE DEPRESIÓN DE BECK.	92
<b>4. Resultados.</b>	<b>99</b>
4.1. CUANTIFICACION ACTIVIDAD/ INACTIVIDAD COMO VALORACION DEL SUEÑO/VIGILIA.	101
4.1.1. TIEMPO EN LA CAMA.	101
4.1.2. SUEÑO ASUMIDO.	102
4.1.3. SUEÑO REAL.	103
4.1.4. LATENCIA DE SUEÑO.	104
4.1.5. EFICIENCIA DE SUEÑO.	105

---

4.1.6. TIEMPO DE INMOVILIDAD.	106
4.1.7. DESPERTARES.	107
4.1.8. ACTIVIDAD TOTAL.	108
4.1.9. ÍNDICE DE FRAGMENTACIÓN DE SUEÑO.	109
4.2. NIVELES DE MELATONINA A TRAVÉS DE SU METABOLITO DE EXCRECIÓN URINARIA 6-SULFATOXIMNEMELATONINA.	111
4.3. NIVELES DE SEROTONINA A TRAVÉS DE SU METABOLITO DE EXCRECIÓN URINARIO ÁCIDO 5 HIDROXINDOLACÉTICO (5-HIAA).	113
4.4. ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL EN LAS MUESTRAS DE ORINA.	114
4.5. NIVELES DE CORTISOL EN ORINA.	116
4.6. ANÁLISIS DEL ESTADO PSICOLÓGICO DE LOS VOLUNTARIOS DURANTE LA REALIZACIÓN DEL ESTUDIO.	118
6.1. VALORACIÓN DE LA ANSIEDAD DE LOS SUJETOS.	119
6.2. VALORACIÓN DEL ESTADO DEPRESIVO DE LOS SUJETOS.	121
5. <i>Discusión.</i>	123
6. <i>Conclusiones.</i>	133
7. <i>Bibliografía.</i>	137
8. <i>Anexos.</i>	169
9. <i>Congresos y Publicaciones.</i>	181

*“El sueño es el alivio de las miserias de quien las tiene despiertas”*

*Miguel de Cervantes Saavedra.*

# **1. INTRODUCCION**

## **1.1.- SUEÑO.**

### **1.1.1. DEFINICION DE SUEÑO.**

La palabra sueño proviene del latín *sonnus*

La Real Academia Española lo define como acto de dormir, siendo definido éste, como aquel reposo que consiste en la inacción o suspensión de los sentidos y de todo movimiento voluntario. Sin embargo, este concepto, como veremos más adelante y desde el punto de vista fisiológico no es acertado.

Podríamos definir el sueño como un estado recurrente de inconsciencia del cual el sujeto puede ser despertado mediante estímulos internos o externos adecuados. Con esta definición podríamos, además, diferenciar el sueño de otros estados patológicos de inconsciencia como el coma o la narcolepsia (Kryger, 1994). Esta definición, aunque válida, podría ser catalogada de simplista, por cuanto el sueño además se ve rodeado de una serie de circunstancias ambientales, actitud, postura, tono muscular y movimientos oculares que convierten a la definición antes propuesta como claramente insuficiente.

Se sabe que el sueño reinstala o restaura las condiciones del cerebro que se tenían en el comienzo de la vigilia precedente. Está demostrado, por otra parte, que el objetivo final de este, no es el de proveer un período de reposo al sistema muscular, órganos viscerales, sistema nervioso autónomo, médula espinal, etc. (Moruzzi, 1966), sino que es un estado dinámico donde grupos de neuronas siguen activas desempeñando un papel diferente al de la vigilia y es, además, necesario para la salud del organismo, por sus propiedades de consolidar las distintas formas de memoria (Erturul, 2004.), regular la temperatura y la función de ciertos neurotransmisores, así como de almacenar energía y mantener la inmunocompetencia (Silber, 2004).

### **1.1.2. BASES ANATOMOFISIOLÓGICAS DEL SUEÑO.**

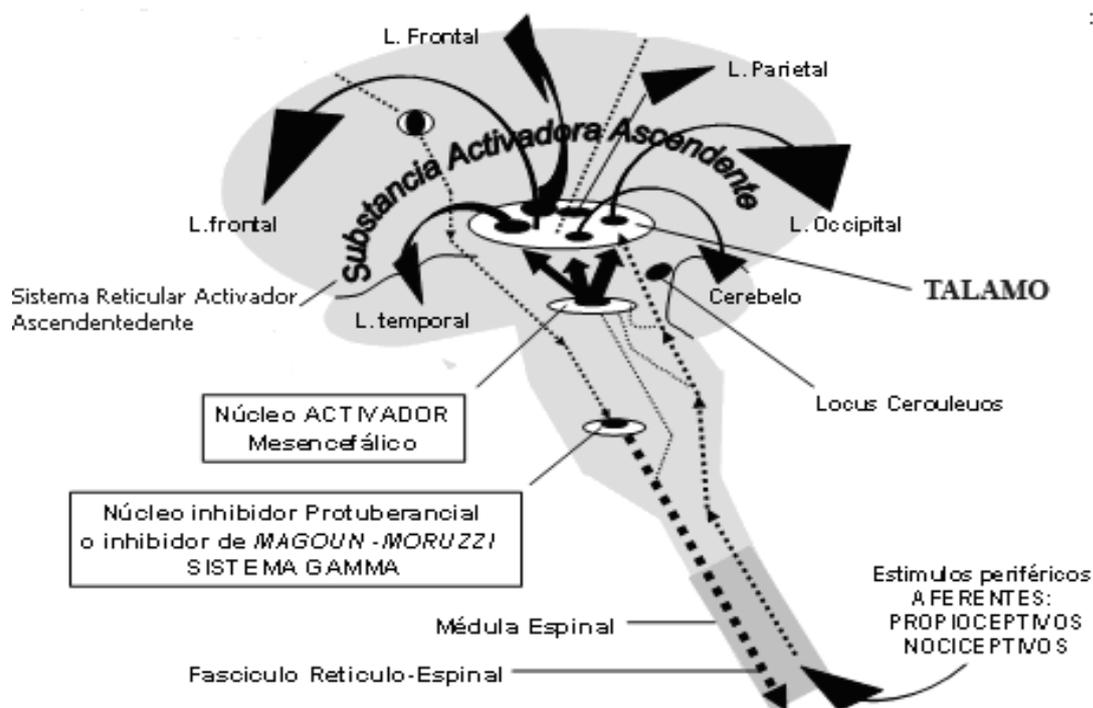
El ritmo sueño/vigilia está regulado por una serie de factores entre los que destacan el sistema circadiano endógeno o reloj biológico y diversos sistemas de homeostasis y factores conductuales (Bjorvatn y Pallesen, 2009) Mientras que los segundos son de tipo causal, el primero desempeña un importante papel en la calidad del sueño.

El sueño se compone de varios estados fisiológicos altamente sincronizados que se alternan a intervalos regulares. El control del sueño y de los ciclos sueño-vigilia depende de un sistema muy complejo. Se acepta que participa todo el encéfalo y se diferencian cuatro regiones fundamentales.

1) El estado de vigilia y alerta: depende de la actividad del sistema activador reticular ascendente, que está ubicado en la sustancia reticular del bulbo, en el tegmentum protuberancial del mesencéfalo y en la porción posterior del hipotálamo. Este sistema recibe colaterales aferentes y eferentes de la corteza cerebral (Figura 1).

2) Inicio del sueño se precisa: a) un descenso en la actividad de las neuronas del sistema activador reticular ascendente diencefálico; b) aumento de actividad en el área preóptica del cerebro anterior c) posiblemente la actividad del núcleo talámico anterior y d) quizá la influencia cortical asociada a una conducta favorecedora del sueño.

3) El sueño NoREM (no movimiento rápido de ojos): depende de la sincronización del neocórtex consecuencia de la actividad del núcleo del rafe situado en la línea media, y del tálamo por las proyecciones tálamo-corticales difusa. Los núcleos del tálamo generan los husos del sueño.



**Figura 1:** Representación de la distribución de los estímulos aferentes vía Substancia Reticular Activadora Ascendente (Sistema Activador de Magoun-Moruzzi). (Nemethy, 2002).

4) El sueño REM (Rápido movimiento de ojos) es generado por el núcleo del cuerpo cerúleo. Las características propias de este estadio ocurren por las interconexiones con la zona tegmental gigantocelular, con parte del núcleo dorsal del rafe, cerebelo, núcleo vestibular y corteza.

### ***1.1.3. EL SUEÑO POLIGRAFICO.***

Con un registró grafico del sueño se pueden reconocer los cambios que sufre el organismo cuando se duerme. Reciben el nombre general de poligrafía, aunque cuando se aplica de forma específica al sueño recibe el nombre del polisomnografía.

El registro polisomnográfico suele tener como objetivo la detección de alguna perturbación del sueño. Pero muchas veces, las perturbaciones en el sueño sólo se aprecian en un resumen completo de todo el periodo de sueño analizado. Esto se consigue elaborando el hipnograma de una noche completa.

Para elaborar el hipnograma se deben obedecer los criterios de estandarización que fueron expuestos por Rechtschaffen y Kales en 1968. Posteriormente, Rechtschaffen y Kales publicaron el manual para el registro y clasificación de las fases de sueño y la vigilia en humanos; tras dos modificaciones, la primera efectuada por los mismos autores (1973) y una segunda propuesta por la academia americana de medicina del sueño a cargo de Iber y colaboradores en 2007. El manual continúa vigente hasta la fecha.

Se parte del concepto de página como unidad de asignación de etapa, concepto que procede de la etapa en que las polisomnografías se registraban en papel a una velocidad que generalmente era de 30 segundos por página, aunque es factible utilizar intervalos diferentes. Para el análisis, cada página se atribuye a uno solo (el más abundante) de los seis estados posibles: vigilia, NREM (fases I-IV) y REM.

Para realizar una polisomnografía es preciso, como mínimo, registrar el electroencefalograma (EEG), que, en resumidas cuentas, permite observar la función del cerebro; el electrooculograma (EOG), que indica el estado de los ojos y el electromiograma (EMG), que indica la actividad muscular, fundamentalmente de aquellos músculos que soportan el cuerpo en contra de la gravedad. Es también habitual registrar variables adicionales, como la actividad cardíaca con el electrocardiograma (ECG), el flujo respiratorio nasal y bucal, los movimientos respiratorios del tórax y del abdomen, los ruidos emitidos al respirar, la saturación arterial de oxígeno, la

temperatura corporal, los cambios en la conductividad eléctrica de la piel, la posición corporal y la actividad motora general o particular de alguna región corporal específica.

De los registros poligráficos se deduce como cambia la función de los principales sistemas y órganos en la transición desde la vigilia al sueño y, dentro de este, como se producen cambios en su profundidad y también en su calidad.

En la siguiente tabla (Tabla 1) se muestra un resumen de los criterios que se utilizan para realizar la diferenciación entre estados.

	Vigilia	NREM (Fase I)	NREM Fase II	NREM Fases III-IV	REM
EEG	$\beta$ con ojos abiertos, $\alpha$ y reacción de alerta cortical ( $\alpha$ ) con ojos cerrados.	Desaparece el $\alpha$ . El EEG muestra frecuencias mixtas.	Complejos K y husos $\sigma$	Ondas $\delta$ abundantes.	Ondas $\beta$ y $\theta$ . Brote de ondas en diente de sierra.
ECG y respiración	Irregulares, dependen de la actividad.	Regulares.	Regulares.	Regulares.	Irregulares.
EOG	Frecuentes movimientos, dependen de la actividad.	Escasos y lentos (pendulares).	no hay.	no hay.	Frecuentes movimientos oculares conjugados.
EMG	Tónico y variable, depende de la actividad.	Pérdida progresiva del tono en los ms antigravitatorios (ms mentonianos).	Evolución de fase I.	Evolución de Fase II.	Atonía muscular máxima.

**Tabla 1:** Criterios para diferenciación de sueño.

#### 1.1.4. FASES DEL SUEÑO.

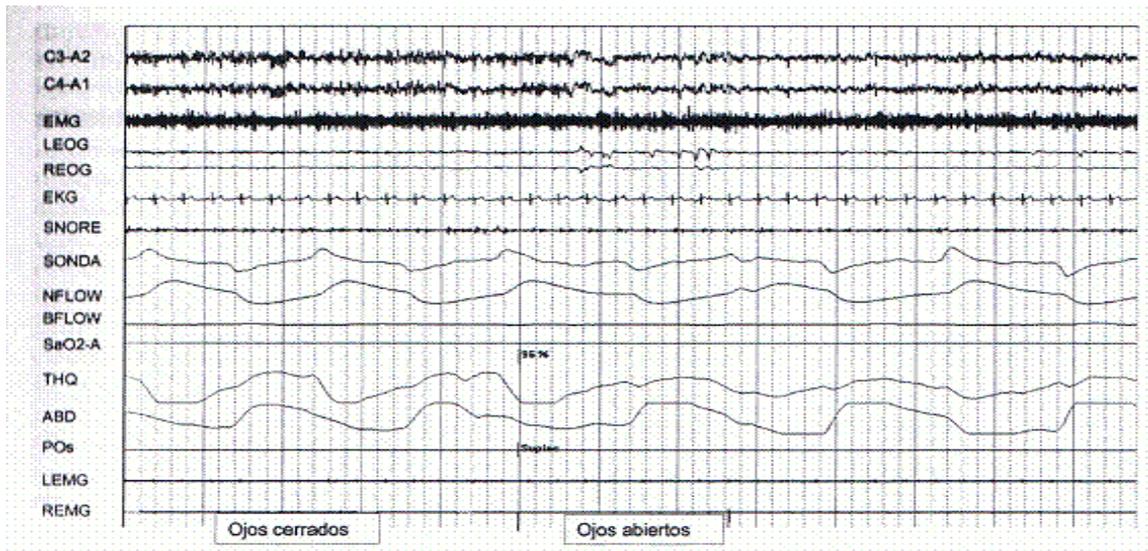
Para describir todos los sucesos que ocurren en un individuo dormido es preciso compararlos en primer lugar con los mismos cuando se observan durante la vigilia.

### **1.1.4.1. VIGILIA.**

En el EEG de la vigilia usualmente se muestran dos aspectos principales: a) en el individuo atento y con los ojos abiertos se muestra una amplitud pequeña y frecuencias mixtas, desde las muy bajas (0,5 Hz) hasta las muy altas (30 Hz en un EEG convencional, aunque en los últimos tiempos, el margen de frecuencias se extiende hasta los 60 Hz), b) En el individuo despierto también se observan ondas rítmicas de 8-11 Hz de amplitud relativamente altas que crecen y decrecen de forma regular (Pace-Schott y Hobson, 2002). Es el ritmo alfa ( $\alpha$ ) que se aprecia de forma especial en un individuo relajado cuando cierra los ojos, pero desaparece en cuanto el sujeto los abre o realiza alguna operación mental (Figura 2). La desaparición del ritmo alfa y su sustitución por una señal rápida de pequeña amplitud y frecuencias altas, ritmo beta ( $\beta$ ), constituye la llamada “reacción de alerta”, una respuesta típica de la vigilia tras la presentación de un estímulo sensorial o la producción de cualquier tipo de tarea mental que exija concentración.

Por su parte, el EOG muestra movimientos variables que se corresponden con las variaciones en la fijación visual y son dependientes de la tarea que esté realizando el sujeto. El EMG correspondiente a los músculos que mantienen la posición corporal, se aprecia actividad constante (tónica) que muestra que el organismo se mantiene erguido y soportando el peso del cuerpo.

El sueño se caracteriza por dos hechos fisiológicos: a) en primer lugar el ritmo alfa del EEG se ve sustituido por patrones de bajo voltaje y b) en segundo lugar por la aparición del sueño REM en el electrooculograma.



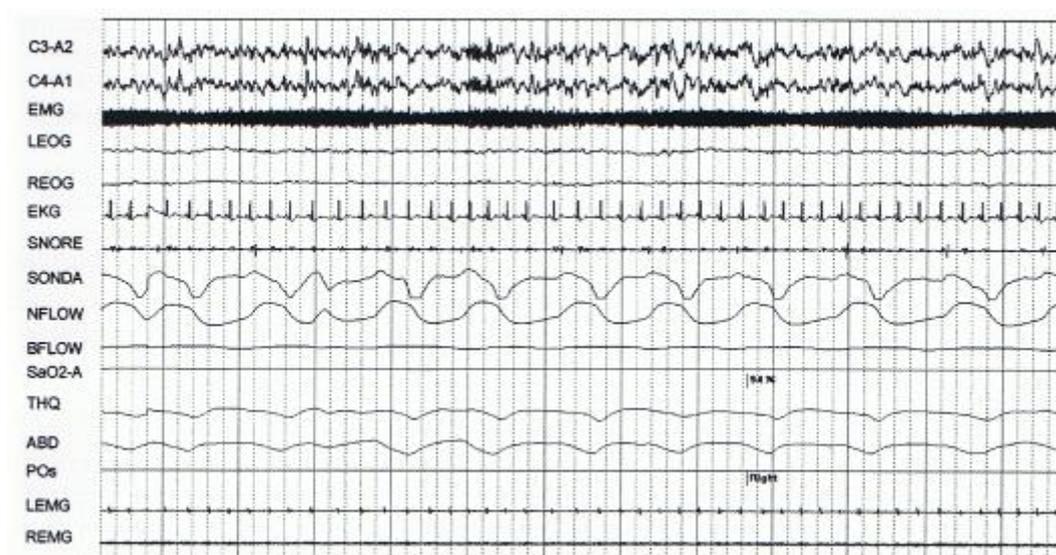
**Figura 2. Registro polisomnográfico correspondiente a la vigilia.** En la primera mitad, el individuo tiene los ojos cerrados y el ritmo  $\alpha$  domina en el EEG. Cuando se abren los ojos, aparece la reacción de alerta: la amplitud disminuye y también desaparecen las ondas  $\alpha$ . C3-A2 y C4-A1: registro del electroencefalograma; EMG= electromiograma; LEOG y REOG= electro-oculogramas del ojo izquierdo y derecho, respectivamente; EKG= electrocardiograma; SNORE= ronquido; NFlow= flujo de aire de la epifaringe; SaO2-A= saturación de oxígeno; Pos= posición del sujeto. LEMG y REMG = electromiograma de las piernas izquierda y derecha (tomada de Rial 2006).

#### 1.1.4.2. SUEÑO DE ONDA LENTA (NREM).

Cuando el individuo empieza a dormirse cierra los ojos, lo que, como se ha dicho, debería determinar la aparición en el EEG de ondas tipo  $\alpha$ . Sin embargo, si realmente se inicia el sueño, esta fase de adormecimiento (Fase 1) no dura mucho.

Con esto, en los primeros momentos del sueño, el EEG disminuye de amplitud pero, si el individuo no despierta, pronto empiezan a aparecer varios signos particulares. De forma irregular al principio y con una frecuencia de 0,25 Hz (cada 4s), aparece la Fase 2 (Figura 3), con episodios de EEG sincronizado en las proximidades de los 14 HZ, lo que recibe el nombre de margen sigma ( $\sigma$ ). Se les denomina también husos de sueño porque su amplitud comienza siendo pequeña, crece y finalmente disminuye nuevamente hasta desaparecer (Pace-Schott y Hobson, 2002).

El segundo signo del sueño en los primeros momentos es el llamado complejo K. Consiste en la combinación de un potencial agudo de gran amplitud al que se superpone una onda lenta de menor amplitud. A veces se registran simultáneamente los husos y los complejos K. Tanto unos como otros aparecen espontáneamente, pero también pueden ser evocados por estímulos sensoriales.



**Figura 3. Registro polisomnográfico de la fase 2 del sueño NREM.** La amplitud del EMG se ha reducido en relación a la vigilia y en el EEG se observan husos de 14 Hz y también puntas de gran amplitud (complejos K). LEMG Véase la figura 2 para interpretación de símbolos (tomada de Rial 2006).

A medida que el sueño progresa (Fase 3) comienzan a observarse, cada vez con mayor frecuencia, ondas lentas de amplitud muy elevada (de 0,5 a 4 Hz), con más de 75 Mv. de amplitud, aunque son corrientes los valores de hasta 300  $\mu$ V. y en los momentos de mayor profundidad del sueño (Fase 4), se registran estas ondas durante más del 70% del tiempo (Figura 4). El margen mencionado, de 0,5 a 4 Hz recibe el nombre de margen gamma ( $\delta$ ). Considerando el tono muscular, su amplitud disminuye en el momento en el que el individuo entra en somnolencia, disminución que progresa a medida que la profundidad del sueño crece. Si el individuo está sentado, su cabeza cae,

lo que en un registro poligráfico se observa como una reducción general en la amplitud del EMG.



**Figura 4. Registro polisomnográfico de la fase 4 del sueño NREM.** El rasgo más sobresaliente es la presencia de ondas de gran amplitud y baja frecuencia ( $\delta$ ) en el EEG. El tono muscular se ha reducido notablemente y no hay movimientos oculares. Véase la figura 2 para la interpretación de los símbolos (tomada de Rial 2006).

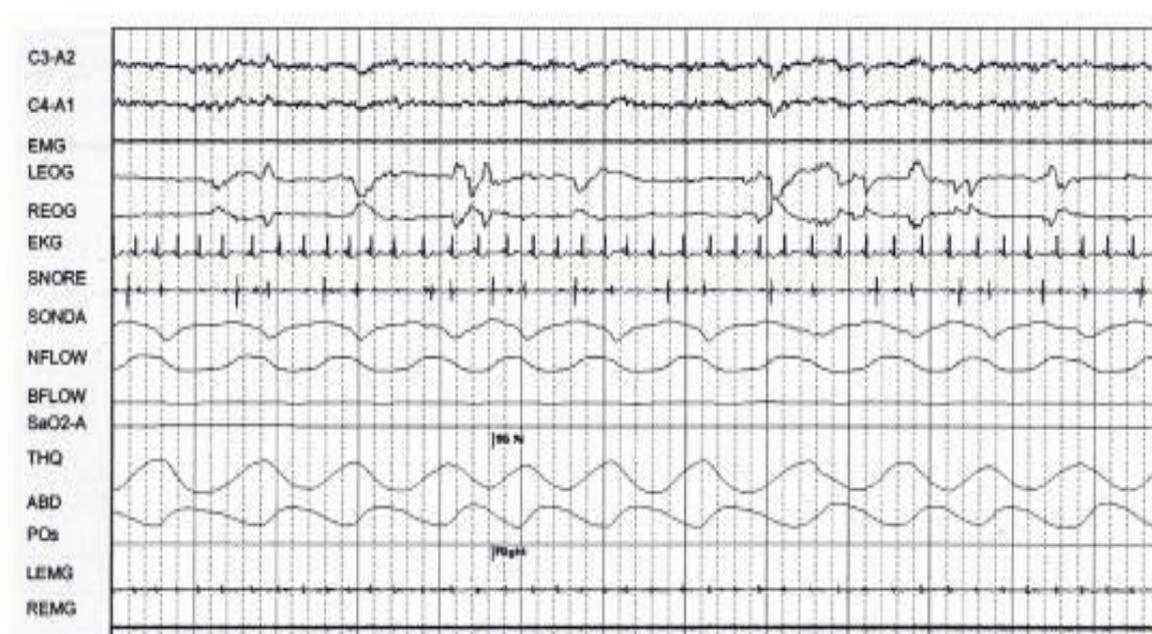
Observando la actividad ocular, cuando se inicia el sueño desaparece la movilidad típica de la vigilia y los ojos quedan cerrados en sus orbitas. Solamente en los primeros momentos suelen registrarse algunos movimientos de rotación lenta de los globos oculares.

#### **1.1.4.3. SUEÑO REM (SUEÑO PARADÓJICO).**

Lo descrito hasta aquí solamente es una parte de lo que puede observarse durante un episodio de sueño. Si el registro comienza al apagarse las luces en una noche normal, unos 90 minutos más tarde se aprecia una dramática serie de cambios que aparecen después de haberse alcanzado la máxima profundidad de sueño (lo que se pondría de

manifiesto si se registrasen los umbrales sensoriales necesarios para producir un despertar).

En cierto momento el EEG cambia súbitamente, desaparecen las ondas lentas y aparece en su lugar una señal de baja amplitud y frecuencias mixtas idénticas a las de la vigilia. A la vez, el EOG presenta una serie de rápidos movimientos oculares conjugados (Figura 5). Coincidiendo con los movimientos oculares, en animales con electrodos implantados intracerebralmente, se observan salvas de puntas de gran amplitud que son especialmente visibles en las regiones pontinas, en los cuerpos geniculados del tálamo y en la corteza occipital, por lo que han recibido el nombre de puntas PGO (Ponto-Genículo-Occipitales).



**Figura 5. Registro polisomnográfico correspondiente al sueño REM.** El EEG muestra un aspecto muy similar al de vigilia con los ojos abiertos. Además, se observan movimientos oculares rápidos, pero el EMG muestra una relajación completa, más profunda aún que durante la fase 4 del sueño NREM. Véase la figura 2 para interpretación de los símbolos (tomada de Rial 2006).

En los animales, y más difícilmente en el hombre, también se observan ondas rítmicas de unos 7 Hz, lo que recibe el nombre de ritmo theta ( $\theta$ ), que es particularmente

importante en el hipocampo, si bien esta actividad también se observa, de forma consistente durante la vigilia.

Si se comprueban los umbrales para despertar, se observa que ante estímulos sin significado, siguen tan altos como cuando el EEG mostraba la mayor cantidad y amplitud de ondas lentas (Pace-Schott y Hobson, 2002). Sin embargo, cuando los estímulos son significativos, como el nombre del durmiente o el llanto de un niño, provocan un despertar inmediato. Estas características han dado nombre a esta fase: sueño REM (por «*rapid eye movement*») o MOR (por «movimientos oculares rápidos») o también, sueño paradójico, porque muestra una combinación de signos de vigilia junto con una gran profundidad y relajación.

Así, en la especie humana se reconocen dos fases principales de sueño: el NREM y el REM. En otros animales la nomenclatura es algo diferente y se suele hablar de SWS (por *Slow Wave Sleep*, sueño de ondas lentas). La diferencia reside en que en estos últimos no se suelen reconocer las fases 1 y 2, en las cuales, como se recordará, no hay ondas lentas.

Como se ha visto, en la especie humana se distinguen cuatro fases de NREM, siendo la primera el simple adormecimiento, la segunda el inicio del sueño verdadero, con husos y complejos K, aún con pocas ondas lentas, y la tercera y la cuarta con proporciones crecientes de ondas ó. Estas dos últimas son las equivalentes al SWS de los animales. Las dos fases así descritas se suceden unas cuatro o cinco veces, de forma cíclica, a lo largo de una noche de sueño. Se considera que un ciclo de sueño se inicia con una fase de sueño NREM y finaliza cuando acaba una fase de sueño REM, lo que en la especie humana ocurre aproximadamente cada 90 minutos y esto se manifiesta en un histograma. Es interesante señalar que la mayoría de los despertares espontáneos

ocurren al final de una fase REM y que en estos casos se alcanza una plena vigilia rápidamente, mientras que un despertar desde un NREM existe lo que se ha llamado una inercia de sueño que perdura un tiempo variable.

### ***1.5. RITMO CIRCADIANO, CRONOBIOLOGIA Y CRONONUTRICION.***

*La cronobiología* es la ciencia que estudia la organización temporal de los procesos que ocurren en los seres vivos, los mecanismos que la originan y la regulan y sus alteraciones, entendiéndose como “organización temporal”, la capacidad de los seres vivos de expresar sus comportamientos y controlar su fisiología de forma recurrente y periódica. A esa recurrencia periódica se le da el nombre de “ritmo biológico”, por lo que también se puede definir Cronobiología como la rama de la Biología que estudia los ritmos biológicos (Cardinali y cols., 1994). Es una ciencia joven a la que cada día se le encuentra nuevas aplicaciones y extensiones en forma de cronopatología, cronoterapia, fototerapia, cronofarmacología o crononutrición, formas de actuación terapéutica todas ellas que reducen las intervenciones invasivas y por tanto, de indudable interés.

Con carácter general, un *ritmo* es toda aquella secuencia de eventos que se repiten de manera regular a lo largo del tiempo, es decir, un suceso que se da constantemente con la misma frecuencia. Así, un biorritmo será toda oscilación, regular en el tiempo, de una función biológica a cualquier nivel de organización considerado (celular, tisular, sistema, etc.).

Es importante diferenciar entre Ritmo Biológico y Ritmo Circadiano, de tal manera que los Ritmos Biológicos no constituyen un fenómeno casual ni un seguimiento pasivo de las condiciones ambientales, si no que forman parte de una adaptación al entorno que es fundamental para la supervivencia de las especies.

Hay algunos términos que tenemos que tener en cuenta al hablar de ritmo circadiano:

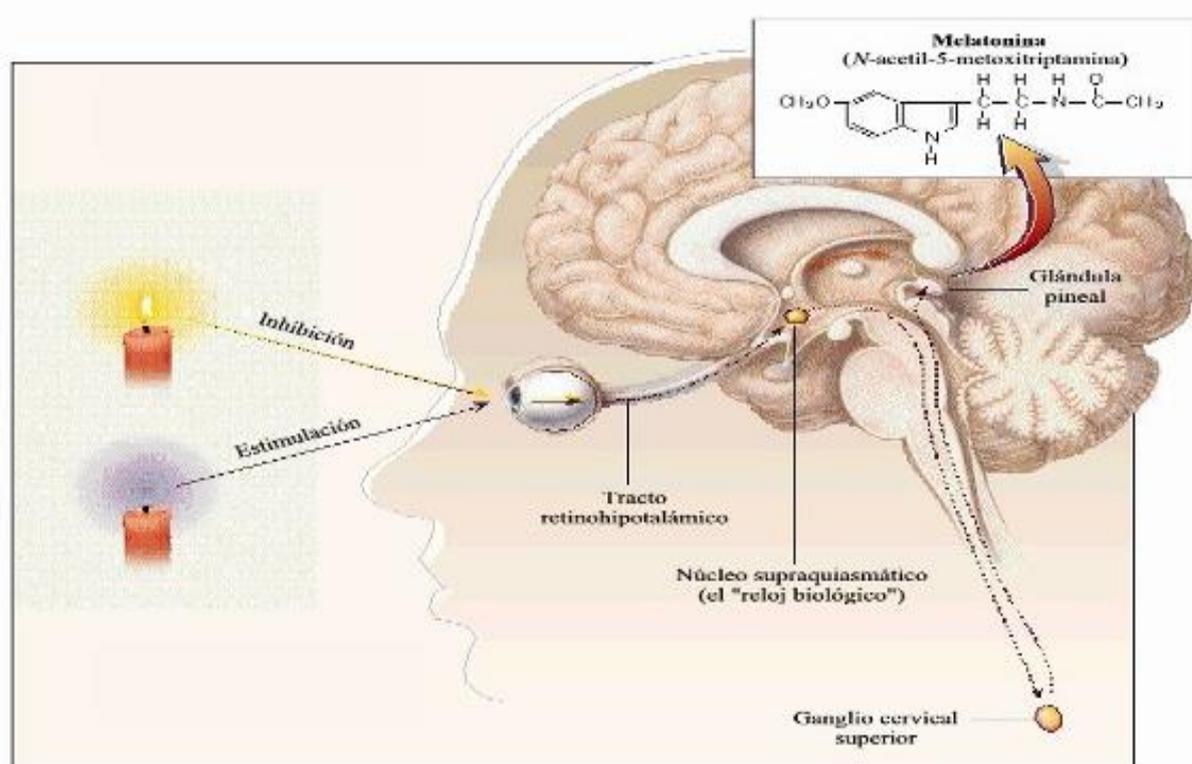
- Ritmo: repetición de una variable biológica con un periodo constante.
- Frecuencia: número de repeticiones por unidad de tiempo.
- Periodo: tiempo que tarda en repetirse un ciclo.

El sistema circadiano (circa = día) se encarga de adecuar el funcionamiento de nuestro organismo a las circunstancias ambientales, procurando así la mayor supervivencia posible. Los humanos somos animales diurnos, es decir, presentamos actividad durante las horas de luz y las disminuimos para regularnos y recuperarnos durante la noche. La alternancia día y noche de las diferentes funciones del organismo, supone un aprovechamiento óptimo de nuestra energía. Así, mientras estamos en vigilia nuestro cuerpo trabaja para llevar a cabo procesos como los digestivos, la actividad locomotora o la atención y por la noche, mientras dormimos, la energía es utilizada para otras actividades como el dormir o la activación del sistema inmune (Madrid, 2006).

Para que todos estos fenómenos se lleven a cabo de una forma rítmica y en perfecta concordancia con el ambiente exterior, el organismo debe disponer de un reloj biológico interno que este permanentemente informado de lo que ocurre fuera del cuerpo para ello disponemos de un sistema circadiano, el cual se basa en un conjunto de estructuras cuya misión consiste en organizar los ritmos de determinados procesos fisiológicos para que presenten una alternancia día/noche. La base de este sistema lo forman dos núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo que recibe información ambiental a través de la luz que incide en la retina. Una vez procesada esta señal, a través de fibras simpáticas envían información a la glándula pineal, responsable de la síntesis y

liberación durante el periodo de oscuridad de la hormona Melatonina. Esta hormona alcanza su máxima concentración a las 02:00 h, es responsable de sincronizar los ritmos circadianos, como es el caso del sistema inmune o el del sueño/vigilia (Madrid, 2006).

Se acepta que el centro regulador de todos los ritmos circadianos, nuestro reloj endógeno, se sitúa a nivel del núcleo supraquiasmático del hipotálamo (Figura 6). El sistema vigilia-sueño es el primer ritmo biológico que se establece y el más importante. Por tanto, la glándula pineal, como mensajera del NSQ, tiene un papel primordial en la regulación de los biorritmos circadianos dando información temporal al organismo y jugando un rol central en procesos tales como el ritmo sueño/vigilia (Garrido y cols., 2010).



**Figura 6.** Diagrama representativo de las conexiones neurales entre los ojos y la glándula pineal (Tomada de Brzezinski, 1997).

Los ritmos circadianos son por tanto ritmos biológicos con una frecuencia aproximada a la diaria, es decir cercana a las 24 horas. También existen ritmos

ultradianos, los cuales tienen una frecuencia superior a la diaria, es decir, de menos de 24 horas , en el caso de la nutrición suelen durar entre 100 y 180 minutos y ritmos infradianos con una frecuencia inferior a la diaria siendo periodos de más de 24 horas.

A pesar del carácter endógeno de los ritmos, determinados factores periódicos del ambiente, como los ciclos luz-oscuridad y el horario de las comidas, pueden actuar como sincronizadores (*zeitbegers*) de los ritmos circadianos. Sin embargo, no todas las variables sujetas a control rítmico se sincronizan por igual a ambos *zeitbegers*. Ello justifica, por ejemplo, que un mismo alimento sea metabolizado y aprovechado de modo diferente cuando es ingerido en diferentes momentos del día o de la noche

La existencia de un concepto innovador que los autores han denominado *crononutrición* establece que los regímenes nutricionales científicamente periodizados pueden desempeñar un importante papel en la mejora de una adaptación del individuo con el entorno.

La crononutrición establece que no es solo el contenido de la comida, sino también el momento de su ingestión junto con los efectos interactivos de los componentes nutricionales, los que determinan la efectividad de cualquier régimen alimentario. De hecho hoy día se sabe que ciertas drogas tienen unos efectos más potentes cuando son administradas en un cierto momento del día y unos efectos muy diferentes cuando se prescriben con otras drogas; aun así, este hecho no se ha extendido formalmente al terreno de la nutrición.

Todas las funciones fisiológicas se encuentran bajo control circadiano, pero entre ellas se pueden señalar como especialmente importantes el ritmo de sueño-vigilia y el del sistema inmune. La hormona melatonina, sintetizada principalmente en la

glándula pineal a partir del aminoácido triptófano vía serotonina, es uno de los factores clave en estas funciones.

La edad modifica profundamente la secreción de melatonina y serotonina, disminuyendo la cantidad y calidad del sueño (problemas de insomnio) y la eficacia del sistema inmune (inmunosenescencia) lo que se encuentran directamente asociado a los cambios que acontecen en la secreción de melatonina (Kripke y cols., 2005; Paredes y cols., 2006). Por tanto, todos los organismos presentan ritmos circadianos en la mayor parte de sus funciones fisiológicas, y entre ellas, sobresalen el sueño, la función inmune, la secreción de melatonina y la producción y liberación de numerosos neurotransmisores, entre los que cabe señalar la serotonina por su relación con los factores anteriores (Duffy y Czeisler, 2002; Barriga y cols., 2004).

Los ritmos circadianos manifiestan importantes cambios con la edad, como son acortamiento del período del oscilador, pérdida del ritmo circadiano (disminución de su amplitud), aparición de un patrón ultradiano e incapacidad de mantener el orden interno (desincronización interna), provocando los trastornos que aparecen en la vejez (Copinschi y cols., 1999). Así, aparecen desajustes en el mantenimiento del sueño nocturno y de la vigilancia diurna, el sueño se torna frágil y aparecen dificultades en mantener su continuidad. Además aparecen muchos otros trastornos entre ellos en la función inmune (envejecimiento del sistema inmune o inmunosenescencia).

La melatonina es un potente antioxidante endógeno secuestrador de radicales libres, protegiendo a las células del estrés oxidativo que acompaña por ejemplo a la función inmune innata (1ª línea de defensa frente a las infecciones). Así en la vejez la deficiencia de melatonina está relacionada con la supresión de la función inmune (Karasek y Reiter, 2002; Terrón y cols., 2005; Paredes 2007b).

Centrándonos en la crononutrición, el momento del día en el que se ingiere el alimento es importante a la hora de establecer sus efectos. Por tanto, la crononutrición nos indica que la elección de los alimentos que se ingieren de día o de noche puede contribuir de forma natural al correcto funcionamiento del sistema circadiano, como es el caso del sueño y la vigilia.

Las perturbaciones del sueño están recibiendo una atención creciente por parte de los profesionales de la salud, dada la importancia que presenta en relación con el estado general de la salud y sobre todo por las repercusiones que el buen o mal dormir determina en la vigilia subsiguiente. De hecho, es conocido que cerca de un 50% de la población presenta algún trastorno del sueño que en la mayoría de los casos determina somnolencia diurna, con el incremento en los riesgos de accidentes de tráfico o laboral y, en general, con una reducción en el rendimiento laboral. El problema se agrava a medida que aumenta la edad. Así, uno de los colectivos con mayores perturbaciones de sueño es el de las personas de edad avanzada. Los cambios que ocurren en el sueño durante la ontogenia son bien conocidos. El recién nacido duerme unas veinte horas; a partir de los 40 años en la especie humana, empiezan a desaparecer fases del sueño (Roffwarg y cols., 1966). Además, en nuestra especie, es sabido que la glándula pineal se calcifica con la edad (Hadley, 1997) y que la calcificación de la glándula pineal, que es una característica común en los humanos, podría ser la responsable de la disminución de la melatonina en los ancianos (Reiter y cols., 1980) y la posterior alteración del sueño.

Así mismo, es probable que a lo anterior se sume la degeneración neuronal en el núcleo supraquiasmático, marcapasos endógeno relacionado con la información luminosa y la producción de melatonina (Copinschi y cols., 1999). Todo esto puede explicar también con relativa facilidad los cambios que se manifiestan en el sueño del anciano.

### **1.1.6. ENVEJECIMIENTO Y SUEÑO.**

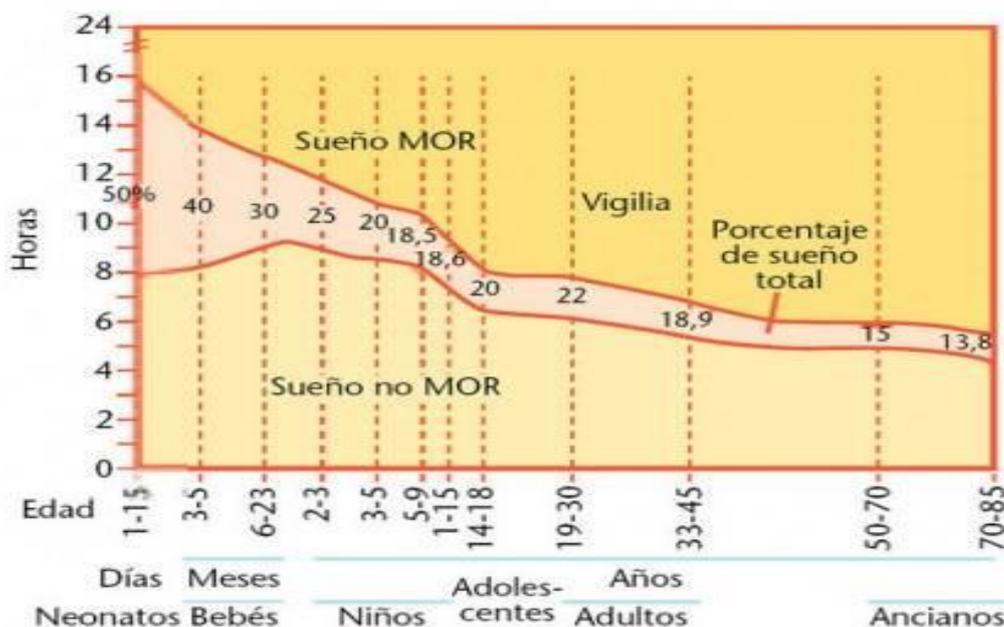
El envejecimiento es hoy día motivo de estudio prioritario de las investigaciones biosanitarias, fundamentalmente por el incremento de la población anciana en el mundo occidental que se debe, en gran medida, al aumento constante que la esperanza de vida ha tenido en nuestras sociedades a partir de principios del siglo XX. Es fácilmente reconocible la vejez pero su concepto sigue siendo hoy día difícilmente definible ya que se sigue trivializando en unos casos y/o siendo inconsistentes en otros.

Tras leer algunas definiciones sobre vejez, ya sean médicas, biológicas o sociales, bajo nuestro punto de vista, se define la vejez como un proceso evolutivo e individual donde la funciones y las capacidades de adaptarse al medio que antes poseía el individuo van disminuyendo, siendo por lo tanto más susceptible a padecer enfermedades. Es difícil por tanto determinar cuándo empieza la vejez, siendo en términos genéricos la edad de 65 años, aunque el proceso de envejecimiento es individual. El proceso de envejecimiento debe ser entendido en el marco de la edad cronológica (número de años de vida), la edad funcional (grado de funcionamiento del individuo) y la edad biológica (los cambios anatómicos y bioquímicos que ocurren en el organismo con la edad) todo ello influenciado por las enfermedades o carencias que pudiera padecer el individuo entendiéndolo como un ser biopsicosocial.

En cuanto al tema del que versa esta tesis doctoral, la inadecuada cobertura de la necesidad de sueño se puede considerar un problema de salud de especial repercusión en la población anciana. Los cambios biológicos propios del envejecimiento en el ser humano tienden, en general, a reducir la intensidad, duración y continuidad de sueño y los síntomas con que esto se manifiesta incluyen dificultad para conciliar el sueño, frecuentes despertares, escaso tiempo total de sueño, sueño no reparador y aumento de

la fatiga y somnolencia diurna. La frecuencia de las dificultades para dormir aumenta con la edad, más del 50% de las personas mayores de 65 años refieren tener problemas habituales con el sueño; incluso hay autores que afirman que el 100% de la población presenta insomnio cada noche a los 95 años de edad. Este aumento de la dificultad para dormir en los ancianos es especialmente significativa cuando éstos están institucionalizados (en asilos, hospitales...). Allí ven condicionada la hora de comer, la de levantarse, y la de acostarse por lo que permanecen en cama un número de horas excesivo para el número de horas que dicen dormir, lo que puede hacerles sentir que el sueño es poco eficaz (Bernetó, 2000).

Las funciones cerebrales, entre las que se encuentra el sueño, presentan variaciones a lo largo de la vida (Fig. 7). En el caso del sueño, los cambios más importantes se producen durante la infancia y con menor intensidad durante la adolescencia; luego permanecen, en líneas generales, con pocas variaciones durante la vida adulta, y vuelven a presentar otra vez modificaciones importantes durante el envejecimiento. Hasta los 5-6 años el cuadro característico del EEG no es evidente y se habla de sueño pasivo o de ondas lentas y sueño activo, similar al estado REM. El porcentaje de sueño REM es superior en los niños que en los adultos; así, en las dos primeras semanas de vida puede llegar a representar un 50% del sueño. En los ancianos, hay una gran variabilidad, pero, por lo general, es más difícil mantener el sueño.



**Figura 7.** Variaciones del sueño a lo largo de la vida. Sueño M.O.R (Movimientos Oculares Rápidos), No M.O.R. (Tomada de Rosenzweig y Leiman, 1992).

**Con respecto a la continuidad y eficiencia del sueño** que se producen a partir de los 65-70 años, quizá el más conocido sea la dificultad que presentan los ancianos para mantener la continuidad del sueño a lo largo de la noche. Los despertares nocturnos se hacen cada vez más frecuentes y más prolongados, disminuyendo la eficiencia del sueño y dando lugar, en el caso de despertares de corta duración, a un aligeramiento del mismo (Carskadon y cols., 1982).

**Sueño de ondas lentas (NREM).** Los acontecimientos fásicos electroencefalográficos del sueño de ondas lentas: En general se admite (Kubicki y cols., 1989) que el número de acontecimientos EEG fásicos (husos de sueño, complejos K o puntas vértex) del sueño de ondas lentas disminuye con la edad, hasta el punto de que en los ancianos sanos, al igual que en los demenciados, (Reynolds y cols., 1985) han intentado introducir el concepto de ‘sueño indeterminado’ para referirse a aquella parte del sueño que, teniendo la apariencia de estadio II, no muestra la presencia de husos beta ni complejos K y que se distingue del adormecimiento por la ausencia de

movimientos oculares lentos; pero la introducción de nuevos estadios de sueño no clarifica la existencia de los mismos, ni facilita estudios comparativos, siendo más práctico tener en cuenta, al efectuar los análisis del sueño, su mayor fragmentación debido al importante incremento del número de despertares y a la mayor frecuencia de aparición y duración de períodos de somnolencia propio de estas edades. En conjunto, la actividad EEG durante el sueño de ondas lentas muestra una tendencia progresiva a la desincronización, la disminución de la amplitud y la fragmentación.

*Sueño lento profundo:* El sueño lento profundo se afecta precozmente con el paso de los años. A partir de los 40 años disminuye progresivamente la proporción de estadio IV, que puede llegar a desaparecer totalmente a partir de los 70 años (Foret, 1980), mientras que el estadio III puede mantenerse durante mucho más tiempo. Considerando el papel fundamental de los estadios III y IV en la recuperación de las funciones biológicas, se comprende que su disminución en los ancianos constituya otra causa de la falta de efecto recuperador del sueño en la vejez, que se suma al efecto de la fragmentación del sueño.

*Sueño REM.* El sueño REM se modifica poco con la edad, y su proporción permanece estable en los sujetos sanos hasta edades muy avanzadas. Lo que se modifica es su distribución a lo largo de la noche. El primer REM aparece más precozmente que en sujetos más jóvenes, debido probablemente a la menor proporción de sueño lento profundo en el primer ciclo de sueño nocturno. Este cambio da lugar a que los distintos ciclos de sueño tengan una duración muy similar. Otra característica es que desaparece su incremento a lo largo de la noche y el primer sueño REM es más largo que en los adultos jóvenes, sin diferencias notables con los correspondientes a los ciclos posteriores; incluso en ocasiones se observa una disminución de su duración a medida

que transcurre el sueño. En los sujetos más jóvenes la duración del ciclo NREM/REM muestra un curso bifásico, separando el núcleo del sueño profundo de ondas lentas del sueño opcional REM/sueño superficial de ondas lentas opcional. En los ancianos el curso es monofásico (Wauquier, 1992), indicando una vulnerabilidad funcional.

### ***1.7. ENVEJECIMIENTO Y RITMO CIRCADIANO.***

Una consecuencia del envejecimiento es la pérdida del ritmo circadiano vigilia/sueño, con una disminución de la amplitud del ritmo y una tendencia hacia la desincronización interna de dicho ritmo. Esto parece estar en relación con la pérdida neuronal, que se acentúa con la edad al disminuir la secreción de melatonina, y se agrava por la degeneración del nervio óptico o la aparición de cataratas. Otros factores que pueden influir en los trastornos del ritmo circadiano son una iluminación deficitaria durante el día, que también disminuye la secreción de melatonina, y una reducción de la actividad motora durante la vigilia.

Otro tipo de alteración circadiana que presentan los ancianos frecuentemente es el avance de fase, que da lugar tanto a una somnolencia vespertina temprana y como al despertar precoz. Este avance de fase del ritmo circadiano sueño-vigilia se correlaciona directamente con el avance de fase del ritmo circadiano de la temperatura, así como con el avance de fase de la secreción de cortisol (De la Calzada, 2000).

Las ondas lentas delta que pueden presentarse en los sujetos mayores de 60 años tienen una frecuencia entre 1,5 y 2,5 Hz y se manifiestan en forma de brotes bilaterales de proyección a regiones anteriores. Estos brotes de ondas delta presentan una cierta ritmicidad, pero no tienen un carácter estrictamente monorrítmico. Predominan en las regiones frontales, pero pueden proyectarse a regiones centrales y temporales anteriores.

Su voltaje puede ser elevado y su duración varía entre los 2 y los 10 segundos. Este patrón fue denominado por Gibbs y Gibbs en 1964, 'bradiarritmia anterior' (Bliwise, 1989). Es importante conocer de este patrón que puede presentarse durante el registro EEG de un sujeto normal de edad avanzada, para distinguirlo del patrón de actividad delta frontal rítmica intermitente (FIRDA), más rítmico y consistente, de muy distinta significación e indicativo de patología.

No se conoce una significación patológica específica del patrón de bradiarritmia anterior y sus mecanismos subyacentes son todavía desconocidos. Se registra en ancianos sanos, pero no en todos ellos, considerándose que determinados estímulos que den lugar a reacciones de despertar incompletas pueden desencadenar estos trenes de ondas lentas. Algunos autores creen que pueden ser consecuencia de alteraciones transitorias de la salud de los ancianos, tales como infecciones, traumatismos, leves accidentes vasculares cerebrales, o bien de enfermedad vascular (Gibbs, 1964).

## **1.2.-FUNCIONALIDAD DE SUSTANCIAS INVOLUCRADAS EN EL SUEÑO Y LA VIGILIA.**

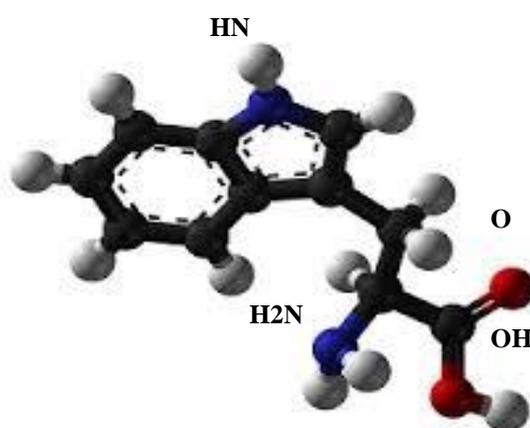
### **1.2.1. TRIPTOFANO.**

Los aminoácidos son sustancias compuestas por carbono, oxígeno, hidrógeno y nitrógeno, caracterizados por contener un grupo ácido débil, llamado carboxilo (-COOH) y un grupo básico débil llamado amino (-NH<sub>2</sub>). Dependiendo de la existencia de grupos ácidos o básicos, se les clasifica como: aminoácidos ácidos, cuando poseen más de un grupo carboxílico; aminoácidos básicos, cuando poseen más de un grupo amino; aminoácidos neutros, que poseen igual cantidad de grupos amino como ácido. Finalmente, también se les puede clasificar como aminoácidos aromáticos o de cadena lineal según presenten estructura cíclica o lineal (Gómez y Llorca, 2000b).

De todos los aminoácidos, 10 de ellos (treonina, lisina, metionina, arginina, valina, fenilalanina, leucina, triptófano, isoleucina e histidina) no pueden ser sintetizados por nuestro propio organismo y tienen que ser ingeridos en la dieta considerándose por ello “esenciales”. Si falta uno solo de los aminoácidos denominados esenciales no será posible sintetizar ninguna de las proteínas en las que sea requerido dicho aminoácido, dando lugar a diferentes tipos de desnutrición, según cual sea el aminoácido limitante (Wu, 2009).

El que ahora nos ocupa, Triptófano (ácido 2-amino-3-(3'-indolil)-propanoico) (Figura 8) es un aminoácido que además se engloba dentro de los aminoácidos LNAA (Large Neutral Amino Acid: Triptófano, Tirosina, Arginina, Leucina, Isoleucina, Valina, Metionina, Treonina). Es clasificado también como no polar, hidrófobo y aromático y es esencial en la síntesis de proteínas, participando como promedio en un

1,1% de la composición de las proteínas. Además, es el principal precursor de algunos metabolitos tales como melatonina, serotonina, quinurenina y niacina, sustancias que influyen sobre el comportamiento del organismo, percepción del dolor, estrés, periodo de sueño y estado de ánimo, así como en el consumo de comida, interviniendo también en la reducción del estrés oxidativo y producción de radicales libres (Firk y Markus, 2009; Myint y cols., 2012).



*Figura 8. Estructura molecular del aminoácido L-Triptófano.*

#### **1.2.1.1. METABOLISMO Y FUNCION DEL TRIPTOFANO.**

Una vez que el triptófano es ingerido en la dieta, éste es absorbido por las paredes del intestino pasando a través de las membranas celulares hacia la sangre, en la cual una pequeña cantidad del mismo se transporta en forma libre y el resto (80-90%) unido a la albúmina.

Los niveles circulantes de triptófano están influenciados por la dieta, en particular por macronutrientes como los carbohidratos y las proteínas. Los hidratos de carbono de la dieta presentan la capacidad de modificar las concentraciones plasmáticas de triptófano y aminoácidos neutros. Una dieta rica en hidratos de carbono produce un

incremento en la secreción de insulina que posteriormente activara el cotransportador de sodio para la absorción de glucosa, el cual también se utiliza para la absorción de aminoácidos y en consecuencia, una disminución en plasma de la concentración de aminoácidos neutros, mientras que la concentración de triptófano no se ve afectada de forma importante (Lyons y Truswell, 1988; Wurtman y cols., 2003). Por lo tanto, la bajada en la absorción del triptófano por competencia en su transporte con otros aminoácidos puede producirse por la ingestión de una dieta rica en proteínas que posteriormente dará lugar a estos aminoácidos libres (Schweiger y cols., 1986). Pero si ingerimos alimentos que sean más ricos en carbohidratos que en proteínas junto con alimentos ricos en triptófano o bien triptófano libre, disminuiría la competencia con otros aminoácidos y en consecuencia, se incrementa la relación de triptófano frente a otros aminoácidos en plasma, lo que facilita la entrada de este aminoácido en el cerebro (Schaechter y Wurtman, 1990), y por tanto se favorece la síntesis de serotonina y melatonina. (Honma y cols., 1992). Por tanto, si el triptófano se ingiere en la dieta junto a carbohidratos, su absorción se verá incrementada (Fernstrom y Wurtman, 1972).

La mayoría de las funciones que se atribuyen al triptófano son mediadas a través de su conversión en el neurotransmisor serotonina o en el producto final de esta vía metabólica, la hormona melatonina, la cual y como veremos más adelante posee efectos antioxidantes, antidepresivos, potenciador del sistema inmune y regulador de los ritmos sueño/vigilia (Cubero y cols., 2006a, b, c; Monti y Jantos, 2006a; Cubero 2007a; Paredes y cols., 2007a, b).

Las necesidades diarias de aminoácidos son máximas en lactantes para ir disminuyendo progresivamente hasta la edad adulta, donde se estabiliza dependiendo del peso corporal del sujeto, a la vez que de la composición y digestibilidad de los

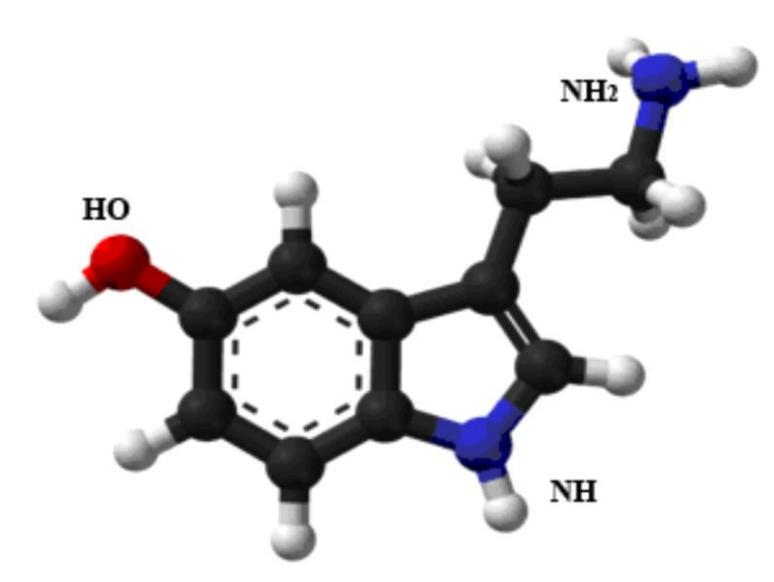
ingredientes que la componen (Jansman, 2000). En cuanto a las recomendaciones diarias concretas (RDA) de administración de triptófano según la “Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO 1985)” en lactantes, de tres a seis meses de vida la RDA es 17 mg/kg/día. En niños de dos a tres años de vida, la RDA es 12,5 mg/kg/día y en la etapa adulta de 3,2 mg/kg/día. Asimismo dietas con exceso de triptófano producen anormalidades en su metabolismo, asociadas con procesos de fibrosis e inflamación, síndrome carcinoide, y síndrome de esclerosis (Gross y cols., 1999). Cantidades superiores a las expuestas pueden resultar perjudiciales para el organismo, pudiendo producir peroxidación lipídica, (Duffi, 1992; Giles y cols., 2003) daños en algunos tejidos, disminución de proteínas antioxidantes y aumento de ácidos grasos poliinsaturados con la consiguiente acumulación de colesterol (Mokaki, 1990).

### ***1.2.2. SEROTONINA.***

La serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) (Figura 9), es una sustancia sintetizada en las neuronas serotoninérgicas del sistema nervioso central y las células enterocromafines (células de Kulchitsky) del tracto gastrointestinal de los animales y del ser humano. Este neurotransmisor perteneciente al grupo de las indolaminas también se encuentra en varias setas, plantas, frutas y diferentes vegetales.

Fue en 1953 cuando Twarog y Page observaron esta molécula en el cerebro y descubrieron que era allí donde se sintetizaba. La combinación del grupo hidroxilo en la posición 5 del núcleo indol y una amina nitrogenada primaria como aceptor de un protón, hacen de la serotonina una sustancia hidrofílica, lo que significa que no atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica. Aun así actúa como uno de los

neurotransmisores más importantes de nuestro sistema nervioso (Gómez y Llorca, 2000a).



*Figura 9: Estructura química de la serotonina*

La serotonina se encuentra abundantemente en el tracto gastrointestinal. Cerca del 90% (Arora y cols., 1984; Gaspar y cols., 2003). El principal almacén son las plaquetas en la circulación sanguínea. Entre las funciones fisiológicas de la serotonina destaca la inhibición de la secreción gástrica, la estimulación de la musculatura lisa y la secreción de hormonas por parte de la hipófisis. Investigaciones recientes sugieren que la serotonina juega un papel importante en la regeneración hepática (Jeyabalan y Geller, 2006; Gershon y Tack, 2007).

La serotonina tiene efecto inhibitorio de la conducta, además de poseer un efecto modulador cerebral, influyendo sobre la regulación del apetito, la percepción del dolor, la actividad motora, las funciones cognitivas, el sueño, la actividad sexual, la temperatura corporal, el estado de ánimo y afectivo (Heine, 1999) e incluso a las

migrañas, debido a que cuando los niveles de serotonina bajan, los vasos sanguíneos se dilatan.

Podemos decir que la serotonina es el principal mediador activador del núcleo hipotalámico ventromedial, también conocido como “centro de la saciedad” y que regula la ingesta y saciedad. Este efecto, es altamente específico para los hidratos de carbono, necesitando de cofactores centrales y periféricos para actuar sobre los otros nutrientes (proteínas y lípidos). La hiperserotoninergia produce anorexia y la hiposerotoninergia da manifiesta ganancia de peso (Boullosa y cols., 1992).

También cabría resaltar su influencia en el funcionamiento vascular así como sobre la frecuencia del latido cardiaco y la regulación de la regulación de diferentes funciones neuroendocrinas (Boullosa y cols., 1992) como la hormona del crecimiento. Cambios en el nivel de esta sustancia se asocian con desequilibrios mentales como la esquizofrenia, el autismo infantil o la epilepsia, así como el trastorno obsesivo compulsivo (Zucconi y cols., 2001; Baumer y cols., 2006; Boylan y cols., 2007; Kotagal, 2007). Los bajos niveles de serotonina en personas con fibromialgia explican en parte el porqué de los dolores y los problemas para dormir. Ya que otro papel importante de la serotonina es actuar como precursor de la hormona melatonina “el reloj interno de nuestro cuerpo”, lo que a su vez determina nuestros ciclos de sueño y vigilia. Nuestro reloj interno viene a ser entonces nuestro “coordinador fisiológico” compuesto por la temperatura corporal, la propia hormona melatonina combatiendo del estrés y los ciclos del sueño. Estos 3 elementos deben ser coordinados adecuadamente por el reloj interno para poder dormir profundamente y despertar descansados.

Cuando una persona tiene mucho estrés se suele producir una depresión hiposerotoninérgica la cual puede deberse a varias causas, encontrándose entre ellas el

elevado nivel de cortisol, originado por este estrés (Caspi y cols., 2003), se enfrentará a muchos problemas para poder dormir, despertará con frecuencia lo que tendrá efectos negativos durante su periodo de vigilia. Luego es lógico que sienta dolores de espalda, cabeza, cuello y hombros, así como malestar o dolor general. Y por si fuera poco aparece el famoso "fibrofog" o dificultades en concentración y memoria que se debe en gran parte a la serotonina, ya que éste es el principal neurotransmisor involucrado en la memoria humana. Por tanto, aumentando los niveles de serotonina, se mejorará la memoria.

Existen datos literarios que sustentan el papel de ciertos nutrientes involucrados en su producción. Entre estos nutrientes se incluyen a los ácidos grasos omega-3, el triptófano (el aminoácido precursor de la misma), el magnesio y el zinc. También existen pautas que podemos y debemos poner en funcionamiento y que influyen en la producción de serotonina de una forma natural. Así, algunos alimentos como los carbohidratos (pasta, arroz, bollería integral, harinas etc...) por su alto contenido en azúcares actúan sobre la secreción de serotonina. El triptófano, aminoácido capaz de traspasar rápidamente la barrera cerebral, favorece la síntesis de esta sustancia potenciando nuestro estado de bienestar. En el organismo, la síntesis y liberación de serotonina dependen de la relativa proporción de hidratos de carbono y proteínas consumidos con la dieta. Al ingerir una mayor proporción de hidratos de carbono cambia el patrón de los aminoácidos plasmáticos aumentando la utilización cerebral de triptófano y por lo tanto la síntesis y liberación de serotonina.

Teniendo en cuenta que los niveles de serotonina aumentan mediante la ingesta de triptófano (Garau y cols., 2006), una dieta rica en este aminoácido esencial, sin duda podría paliar y/o solucionar este tipo de trastorno nervioso. Así, y dentro de esta

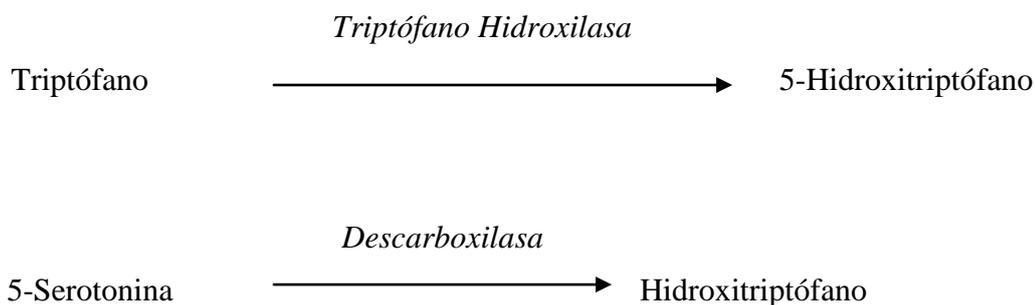
línea, nuestro grupo de investigación ha observado en niños con enfermedades neurodegenerativas, los cuales presentan una bajada de serotonina, una sustancial mejora de sus ritmos de actividad/reposo tras la ingesta de cereales enriquecidos con triptófano, proyecto que ha sido financiado por los Laboratorios Ordesa S.L.

Por tanto, contra la depresión y demás alteraciones orgánicas mencionadas se deben tomar alimentos ricos en triptófano. La producción cerebral de serotonina, uno de los mensajeros alegres, es muy sensible a la dieta. El aumento se debe a una buena absorción del aminoácido triptófano. En el organismo, la síntesis y liberación de serotonina dependen de la relativa proporción de hidratos de carbono y proteínas consumidos con la dieta. Al ingerir una mayor proporción de hidratos de carbono cambia el patrón de los aminoácidos plasmáticos aumentando la utilización cerebral de triptófano y por lo tanto la síntesis y liberación de serotonina.

#### ***1.2.2.1. METABOLISMO Y FUNCION DE LA SEROTONINA.***

La síntesis de serotonina comienza con la acción de la enzima triptófano hidroxilasa, que transforma el aminoácido triptófano mediante una hidroxilación en 5-hidroxitriptófano. Esta enzima cataliza la inserción de oxígeno molecular en la posición 5 del triptófano en tanto que el otro átomo de oxígeno es reducido a agua, requiriendo de un cofactor que es la tetrahidrobiopterina, siendo éste el paso limitante en la formación de la serotonina.

En condiciones normales la enzima triptófano hidroxilasa no está saturada, por lo que la administración de triptófano se acompaña de un aumento en la formación de 5-hidroxitriptófano, este último compuesto es descarboxilado dando la formación de 5-hidroxitriptamina o serotonina (Gómez y Llorca, 2000a).



Una vez sintetizada la serotonina es almacenada en el interior de vesículas y liberada posteriormente por exocitosis al espacio sináptico. Existe recaptación de serotonina no degradada por los procesos enzimáticos locales, incluyendo la acción de la enzima monoamino oxidasa (MAO).

Las plaquetas humanas poseen un sistema de transporte activo de la serotonina de gran afinidad unido a la enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, siendo por tanto capaces de almacenar y liberar serotonina a través de mecanismos similares utilizados por las neuronas serotoninérgicas.

La disponibilidad de triptófano para la síntesis de serotonina, es dependiente de la cantidad de aminoácidos libres o totales y del cociente triptófano/aminoácidos libres (Monti y Santos, 1998). Por tanto, la concentración de serotonina en el cerebro es directamente proporcional a la concentración de triptófano en el plasma, el cual viene dependiendo de la ingesta dietética de triptófano.

Se han determinado hasta la fecha al menos catorce subtipos de receptores para la serotonina, agrupados en tres clases (Cowen, 1991; Dubovsky y Thomas, 1995):

- **5HT<sub>1</sub> y otros** (5HT<sub>1A</sub>, 5HT<sub>1B</sub>, 5HT<sub>1D</sub>, 5HT<sub>1F</sub>, 5HT<sub>4</sub>, 5HT<sub>6</sub>, 5HT<sub>7</sub>), que utilizan señales de transducción mediadas por proteína G, y poseen alta afinidad por la serotonina.

- **5HT<sub>2</sub> y 5HT<sub>1C</sub>** (5HT<sub>2A</sub> y 5HT<sub>2C</sub>), que usan señales de transducción mediadas por fosfoinositol.

- **5HT<sub>2B</sub> y 5HT<sub>3</sub>**, los cuales interactúan con canales iónicos alterando la conductancia de los iones.

Cada uno de estos grupos de receptores se encuentra localizado en diferentes zonas del sistema nervioso, actuando así sobre diversas funciones según el lugar donde se hallen.

Los agonistas serotoninérgicos como la fenfluramina y dexfenfluramina, vía los receptores presinápticos 5HT<sub>1B</sub> y 5HT<sub>1C</sub> disminuyen el apetito (Neill y Cooper, 1989; Davis y Faulds, 1996). Los inhibidores selectivos de recaptación de serotonina tienen efectos anoréxicos presumiblemente debido a las acciones fisiológicas de intensificación de serotonina endógena (Nonogaki y cols., 2007). Por el contrario, las dosis pequeñas de agonistas selectivos de los receptores 5HT<sub>1A</sub>, aumenta la toma de comida en ratas (Hudson y cols., 2005; Jhanwar-Uniyal y cols., 1994; Sugimoto y cols., 1999).

#### ***1.2.2.2. SEROTONINA Y SUEÑO.***

La serotonina liberada en el diencéfalo y en el cerebro desempeña un papel inhibitorio fundamental para provocar el sueño normal (Guyton y Hall, 2006). La activación de receptores somatodendríticos 5HT<sub>1A</sub> podría esperarse que inhiba el

disparo neural serotoninérgico y la consiguiente liberación de serotonina (Gómez y Llorca, 2000a).

Muchos estudios apoyan la participación de la serotonina en el sueño, ya que la administración del L-triptófano induce al sueño, por lo que se le llama “hipnótico natural”. La síntesis y liberación de serotonina depende de la disponibilidad de aminoácidos precursores del L-triptófano reduciéndose así la latencia de sueño y los despertares nocturnos. Por el contrario, la deficiencia de L-triptófano se asocia a una reducción del sueño REM. La administración de triptófano en la dieta incrementa la disponibilidad de serotonina en el cerebro, así como la potencia delta en el electroencefalograma (EEG) y la cantidad de sueño no REM (NREM, sueño sin movimientos rápidos de los ojos) (Ouichou y Pevet, 1992). Hoy día, el uso de triptófano se está extendiendo en el tratamiento de la depresión y de las alteraciones del sueño (Riemmann y Vorderholzer, 1998)

Lesiones en el núcleo dorsal del rafe se acompañan de agotamiento de la serotonina e insomnio que dura días. La administración de p-clorofenilalanina inhibe la hidroxilasa de triptófano y también produce insomnio. Este insomnio puede revertirse con la administración de 5-hidroxitriptófano, otro precursor de la serotonina que evita el sitio de inhibición enzimática de la p-clorofenilalanina. La administración de p-clorofenilalanina inhibe a la hidroxilasa de triptófano y también produce insomnio en el gato durante varios días. Este insomnio puede revertirse con la administración de 5-hidroxitriptófano.

Los niveles de serotonina, así como la afinidad hacia sus receptores son variables a lo largo del día. Se objetivan niveles máximos durante el día para disminuir

por la noche. En cambio los receptores muestran una curva inversa pues son más abundantes y afines durante la noche (Franco y cols., 2012, Velayos y cols., 2007).

Por otro lado, la serotonina regula la aparición de espigas ponto-genículo-occipitales (PGO), las cuales aparecen segundos antes del inicio del sueño NREM y durante todo el tiempo que dura éste. En experimentos de privación de sueño se detectó aumento de los niveles de serotonina, pero los receptores no se modificaban.

### ***1.2.2.3. SEROTONINA Y VEJEZ .***

La concentración de serotonina en el cerebro y del metabolito principal de la serotonina, el 5-hidroxiindolacético, no parece variar de forma significativa con la edad. Los transportadores (recaptadores) de serotonina tampoco parecen variar con la edad, lo cual sugiere que la innervación serotoninérgica permanece intacta durante el envejecimiento (Strong, 1998).

Sin embargo, se han observado de forma precisa disminuciones en el número de receptores serotoninérgicos 5-HT1A y 5-HT2A en la corteza cerebral. Son menos consistentes los resultados en el hipocampo y en los ganglios basales (Strong, 1998).

### 1.2.3. MELATONINA.

La melatonina, o N-acetil-5-metoxitriptamina (Figura 10), es la principal hormona que produce la glándula pineal, la cual es un órgano neuroendocrino que convierte la información externa (fotoperíodo) en un mensaje interno (hormonal) para la regulación de los sitios diana periféricos, a través del torrente sanguíneo (Reiter, 1981) en su ruta biosintética, cuyo precursor es el aminoácido triptófano, siendo el sustrato intermedio entre el aminoácido y la hormona, el neurotransmisor serotonina. Esta hormona, también denominada “hormona de la oscuridad” (Reiter, 1991a) por su secreción principalmente nocturna, se produce de forma cíclica, de modo que su máxima producción ocurre en ausencia de luz, por la noche, en señal a la oscuridad, alcanzando su máximo nivel hacia mitad de la noche. La melatonina es una hormona universal que también producen todos los seres vivos (Reiter, 1993; Reiter y cols., 2001; Hardeland y Poeggeler, 2003).

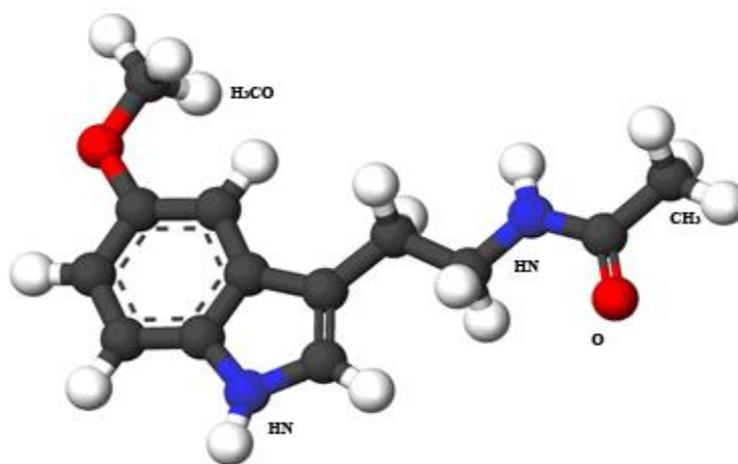


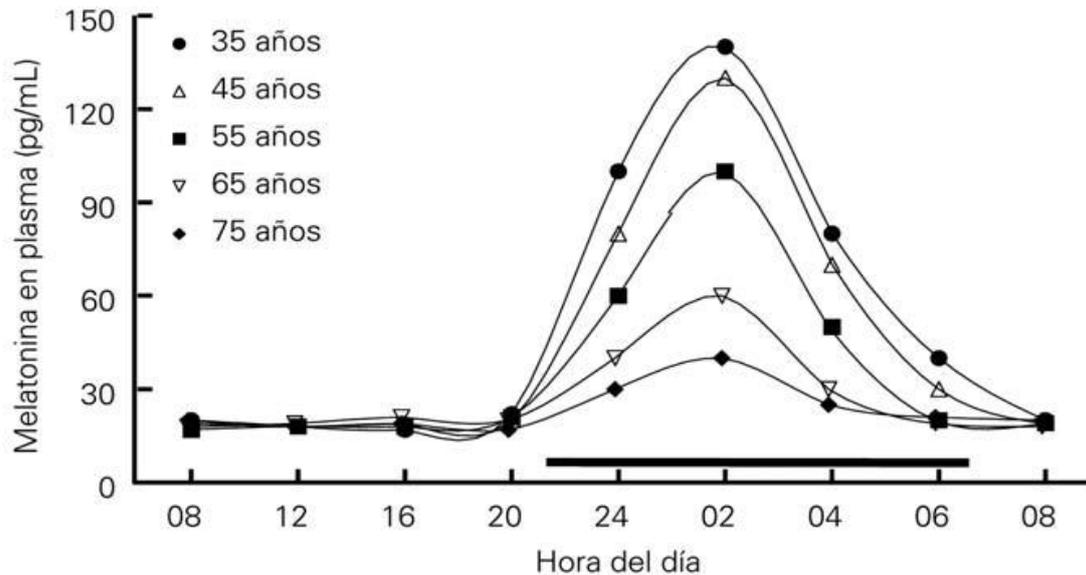
Figura 10: Estructura química de la Melatonina.

Además de ser sintetizada en los pinealocitos, la melatonina también es sintetizada en el fundus del estómago, células enterocromafines del intestino (Stefulj y cols., 2001), testículos, médula espinal, corteza cerebral, núcleo del rafe y núcleo estriado, plaquetas sanguíneas, células mononucleares de sangre periférica, células de médula ósea, así como en tejido ovárico de rata y humano donde cuentan con cantidades suficientes de ARNm de las enzimas N-acetiltransferasa (NAT) e hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT), enzimas limitantes de la formación de melatonina, estando así equipados con las herramientas necesarias para su producción.

**Ontogénicamente**, la melatonina no se produce de forma rítmica hasta los 6 meses de vida extrauterina, cuando madura su sistema fotoneuroendocrino. El feto no produce melatonina, sino que la recibe de la madre a través de la placenta, contribuyendo a las funciones cronobiológicas de aquél. Por ello, los niños prematuros presentan alteraciones más frecuentes en determinados ritmos, como el del sueño/vigilia. El recién nacido no tiene ritmo de melatonina, aunque su pineal puede producirla tónicamente porque la ausencia de luz aumenta su producción (Jaldo-Alba, 1995).

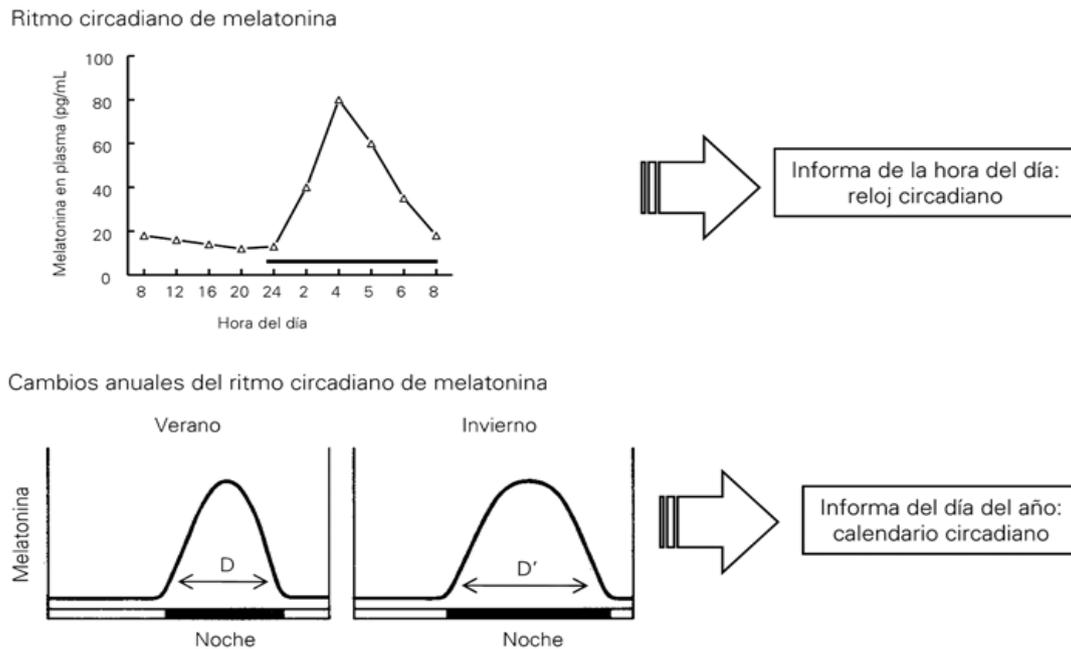
La máxima producción de melatonina se da en la infancia (Figura 11), mientras que en la vejez su síntesis es inapreciable. La producción de melatonina comienza a disminuir notablemente a partir de los 35–40 años de edad. A partir de aquí, la producción de melatonina decae y hacia los 55-65 años la amplitud del pico nocturno de melatonina es suficientemente pequeña como para no ser bien detectado por las células, siendo su ausencia casi total en la 75-80 años, considerándose que este descenso marca el inicio de los procesos de envejecimiento, que se van acelerando conforme avanzamos en edad, perdiendo así la melatonina su capacidad cronobiótica (Reiter, 1992). Es, por

tanto que la elección hoy en día de la administración de melatonina se esté incrementando para mantener unos niveles endógenos adecuados que permitan sus funciones celulares.



**Figura 11.** Cambios en la amplitud del ritmo circadiano de melatonina con la edad. La acrofase del ritmo de melatonina ocurre hacia las dos o tres de la madrugada y alcanza unos valores entre 80-200 pg/mL, dependiendo del individuo. Sin embargo, sea cual sea este valor durante la juventud, los niveles de melatonina descienden de forma proporcionalmente similar en cada persona. Entre 45-55 años desciende un 40%, y a los 65 años el pico ha descendido un 80%, lo que hace que se pierda la señal cronobiótica de la melatonina (Tomada del Instituto Internacional de la Melatonina (IIMEL)).

La codificación en amplitud del ritmo circadiano de melatonina es utilizada por el organismo para saber en qué momento del día y en qué época del año se encuentra. Por esta razón se asignó al ritmo de melatonina un papel como reloj (medida de la hora del día) y calendario (medida del día del año) (Reiter, 1993) (Figura 13).

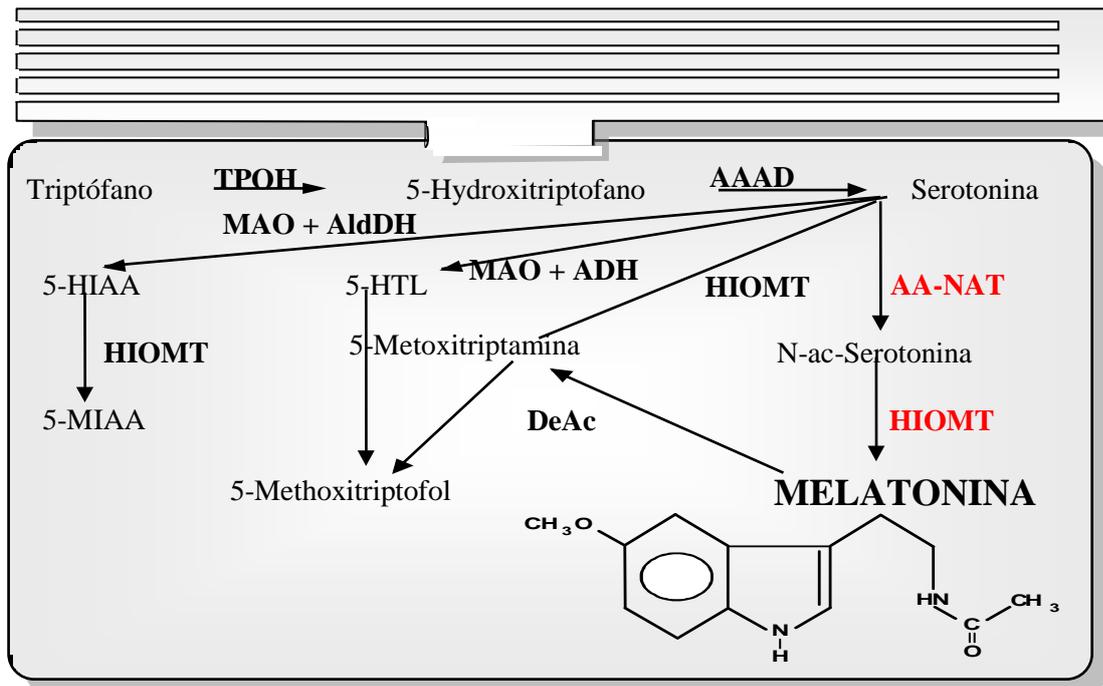


**Figura 12.** El ritmo de secreción de melatonina está codificado en amplitud. Su acrofase indica al organismo la hora del día en que éste se encuentra (función de reloj). Pero, además, la duración del pico de melatonina varía, siendo mayor durante el invierno (más horas de luz) que durante el verano, ya que la melatonina empieza a producirse al caer la tarde. La diferencia entre invierno y verano ( $D'-D$ ) la lee el organismo para saber en qué momento del año se encuentra (función de calendario) (Tomada de IIMEL).

### 1.2.3.1. METABOLISMO Y SÍNTESIS DE LA MELATONINA.

La biosíntesis pineal de indolaminas comienza con la captación del triptófano a través de un mecanismo de transporte activo que está bajo control adrenérgico. Dentro de la célula, el triptófano se convierte en 5-hidroxitriptófano por la enzima triptófano hidrolasa. La enzima 5-hidroxitriptófano descarboxilasa actúa sobre el 5-hidroxitriptófano para formar 5-hidroxitriptamina (5-HT) o serotonina. La concentración de serotonina en la pineal es muy elevada en todas las especies (niveles elevados durante las horas de luz y reducidos durante las horas de oscuridad). A partir de este momento, la vía más importante en el metabolismo pineal de la serotonina implica su transformación en N-acetilserotonina por acción de la N Acetil Transferasa

(NAT), enzima que constituye el paso limitante en la síntesis de melatonina y presenta un marcado ritmo circadiano en todas las especies estudiadas, con niveles máximos durante las horas de oscuridad determinando así la concentración circadiana de melatonina (Hardeland, 2008). Finalmente, la N-acetilserotonina es convertida mediante la O-metilación por medio de la HIOMT en melatonina (Figura 13).



**Figura 13:** Metabolismo de los indoles en las células fotosensibles pineales. Enzimas: AAAD, descarboxilasa de aminoácidos aromáticos; AA-NAT, arilalquilamina N-acetiltransferasa; DeAc, deacetilasa; HIOMT, hidroxindol-O-metiltransferasa; MAO, monoamino oxidasa; TPOH, triptófano hidrolasa. Indoles: N-Ac-serotonina, N-acetilserotonina; 5-HIAA, ácido 5-hidroxiindol acético; 5-HTL, 5-hidroxitriptofol; 5-MIAA, ácido 5-metoxiindol acético. La estructura química de la melatonina se muestra en la parte de debajo de la figura. (Tomada de Barriga y cols., 2004). En rojo enzimas limitantes.

Aunque el paso de la acetilación a N-acetilserotonina es necesario en la biosíntesis de la melatonina, también puede producirse una desaminación de la serotonina por las monoaminoxidasas en la misma pineal. El producto desaminado resultante puede continuar su oxidación a ácido 5-hidroxiindolacético o puede reducirse

a 5-hidroxitriptofol. Estos últimos productos son susceptibles de transformación por la HIOMT para dar ácido 5-metoxindolacético y 5-metoxitriptofol.

Durante la noche se produce un incremento de la actividad de la N-acetiltransferasa que presenta valores de 10 a 100 veces mayores que los que presenta durante el día (Lynch HJ., y cols. 1975). Como consecuencia se incrementa la concentración de N-acetilserotonina a valores de 10 a 30 veces mayores que los que existen durante el día. La actividad de la HIOMT también se incrementa y con ella los niveles pineales de melatonina. La luz deprime rápidamente la actividad de los enzimas pineales. Si se invierten las condiciones de luz exterior, se invierten de modo paralelo las actividades enzimáticas y la biosíntesis pineal de indolaminas. Por lo tanto, se da un ritmo diario de actividad pineal que está controlado por los cambios naturales diarios en la duración de la iluminación. Este ritmo se pierde si se dan condiciones de iluminación continua, mientras que se mantiene, aunque disminuido, si los animales se mantienen en la oscuridad.

Una vez sintetizada y tras realizar algunas de las funciones que veremos más adelante la degradación de la melatonina se produce en primer lugar en el hígado y secundariamente es excretada por el riñón. En el hígado sufre una 6-hidroxilación, siendo excretada fundamentalmente en la orina en forma de compuestos sulfatados o glucuronados (Kopin y cols., 1961). La infusión intravenosa en humanos, que evita el problema de la variación en absorción de los individuos, ha confirmado que la sulfatación es la mayor vía metabólica en humanos (Arendt, 1995). En humanos, no obstante, el 90% de la melatonina suele estar en forma de 6-sulfatoximelatonina en plasma y/u orina.

La ruta del metabolismo que aparezca depende de la vía de administración. La melatonina endógena es diacetilada a 5-metoxitriptamina, la cual es diaminada a ácido 5-metoxiindolacético y a 5-metoxitriptofol (Cahill y Besharse, 1997) en la retina, aunque también en hígado. En el cerebro y en la glándula pineal, la melatonina es metabolizada por la indolamina 2,3-dioxigenasa, eliminando el anillo indol (Fujiwara y cols., 1978). Estos metabolitos que se forman en el cerebro pueden tener actividad fisiológica y actuar como la melatonina en los ciclos circadianos, además de ser inhibidores de la síntesis de prostaglandinas. La melatonina exógena es desmetilada a N-acetilserotonina y más tarde es hidroxilada y conjugada, pero aún no se sabe con certeza si esta vía es de importancia endógena.

La N-acetilserotonina puede tener funciones por si misma además de ser el precursor de la melatonina (Arendt, 1995). De hecho, la N-acetilserotonina, precursor de la melatonina, puede estimular los mismos circuitos que son activados por el factor de crecimiento neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, de sus siglas en inglés) en el cerebro. Estos hallazgos han sido publicados en la revista *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. Parece que la falta de BDNF está relacionada con la depresión y algunas enfermedades neurodegenerativas. Los autores de este artículo buscaron compuestos que pudieran imitar al BDNF produciendo la activación de su receptor TrkB en la superficie de las células. Observaron que la N-acetilserotonina, pero no la serotonina ni tampoco la melatonina, podían activar TrkB. La N-acetilserotonina podía estimular TrkB, incluso cuando BDNF no estaba presente, tanto en placas de cultivo de células como en ratones. También puede proteger a las neuronas de la sobreestimulación de la misma manera que lo hace BDNF (Jang y cols., 2010).

La vida media de la melatonina en circulación es de aproximadamente 30 minutos (Yeleswaram, 1997; Illnerova y cols., 1978; Yellon, 1996). La melatonina oral muestra picos en humanos después de 60 minutos y fase de eliminación de 3 a 45 minutos, sin embargo se observan grandes variaciones individuales en la concentración plasmática de melatonina que son atribuidas a las diferencias en la absorción (Aldhous y cols., 1985). Tras alcanzar un pico máximo, la concentración en plasma de melatonina permanece por encima de los valores normales de 3 a 7 horas después de la administración de dosis orales en un rango de 2 a 5 mg

**El control de la síntesis de melatonina por el Sistema Nervioso Central** en los mamíferos, se produce en respuesta a la noradrenalina (NA) liberada por las terminales postganglionares procedentes del ganglio cervical superior (GCS), por lo que se considera que la pineal es un transductor neuroendocrino, como el tejido adrenal cromafín, ya que la llegada de un estímulo nervioso a uno de esos órganos se convierte en una repuesta endocrina (Wurtman, 1963; Axelrod, 1965).

La estimulación postganglionar de los pinealocitos depende de la ausencia de estimulación luminosa en las retinas oculares. Las células ganglionares de la retina codifican y proyectan hacia el encéfalo el impulso nervioso que inicia la percepción visual. Un subgrupo de estas neuronas sintetiza la *melanopsina*, este fotopigmento les permite transformar a la luz en un impulso nervioso de manera homóloga a la fototraducción de los bastones y los conos. Se conoce a las células con melanopsina como *células ganglionares fotorreceptoras o intrínsecamente fotosensibles* (ipRGC) y se ha descrito su participación en una serie de funciones adicionales a la formación de imágenes (funciones accesorias o extravisuales de la retina), entre las que destaca la sincronización del ritmo circadiano por la luz.



La glándula pineal es, esencialmente, el intermediario entre el fotoperíodo externo y el medio interno, el lugar en el que la información acerca de la luz y la oscuridad se traduce en un mensajero químico (Reiter 1991b, Reiter, 1999b). Diversos datos experimentales sugieren que el NSQ puede ser el lugar del Sistema Nervioso Central (SNC) responsable de la generación de la actividad nocturna de la síntesis de indolaminas en mamíferos. La actividad oscilatoria circadiana de las células del NSQ puede estar ligado al fotoperíodo (Hadley, 1997).

La producción de melatonina está influenciada por diferentes aspectos fisiológicos y no fisiológicos como por ejemplo la actividad diaria o los trastornos de conducta que pueden influir directamente en la secreción de melatonina, de hay otro porqué de la variabilidad de la secreción de melatonina. Este proceso explica también la disminución de la concentración de melatonina en persona con alteraciones del estado de ánimo en las cuales la secreción de serotonina esta disminuida y el metabolismo desde serotonina a melatonina puede estar también disminuida.

### **1.2.3.2. CAPACIDAD FUNCIONAL DE LA MELATONINA.**

**En cuanto a sus funciones**, a parte de la evidente relación con la mejora de la calidad del sueño, cabe destacar de la melatonina su excelente *capacidad como antioxidante endógeno*, combatiendo eficazmente a los radicales libres. La melatonina muestra diferentes propiedades químicas a los otros antioxidantes. Posee un anillo indolico en electrones con un grupo metoxi en posición 5. Este grupo metoxi es importante para las propiedades fisicoquímicas de la melatonina como un secuestrador de radicales libres. Por lo tanto, por esta ventaja de la melatonina con respecto a los otros antioxidantes, su origen dual, puede capturar radicales libres a través de una reacción

aditiva o en ciertas circunstancias puede donar (Tan y cols., 1998; Marshall y cols., 1996; Stasica y cols., 2000) o capturar electrones para detoxificar radicales libres. A menudo la forma oxidada es regenerada a la reducida mediante una reacción redox o de reciclaje, este reciclaje es considerado beneficioso porque previene el agotamiento del antioxidante (Winkler y cols., 1994).

En los últimos años, se ha venido estudiando la participación de los radicales libres así como de otras especies reactivas de oxígeno (moléculas derivadas del oxígeno que son muy reactivas y dañan fácilmente a las proteínas, lípidos y ADN de la célula) en los procesos inflamatorios durante el envejecimiento y en diferentes desórdenes fisiológicos a lo largo de la vida desde la infancia hasta la madurez. El daño principal que se observa se produce a nivel de las mitocondrias, estructuras intracelulares encargadas de producir la energía que la célula utiliza para todos sus procesos vitales. En consecuencia ese proceso de daño mitocondrial hace que disminuya nuestra capacidad de producir energía, lo que a su vez decrece la eficacia con la que las células se defienden de los radicales libres, haciéndolas más vulnerables a la disfunción y la muerte. Paralelamente al aumento de los radicales libres produce un progresivo aumento de procesos inflamatorios, que se manifiestan con una elevación de las citoquinas proinflamatorias y del óxido nítrico. Estos dos procesos colaboran en el daño mitocondrial y disfunción celular del envejecimiento (Miquel, 2006). La melatonina es un antioxidante extremadamente potente y versátil protegiendo cada célula del organismo, incluyendo las neuronas (Reiter y cols., 2003).

Las funciones de la melatonina como un antioxidante incluye: a) secuestrador directo de radicales libres, b) estimulación de enzimas antioxidante, c) incremento de la eficiencia de la fosforilación oxidativa mitocondrial y reducción de los electrones y d) aumento de la eficacia de otros antioxidantes. Además habría otras funciones de la

melatonina aún no descubiertas las cuales aumentarían su habilidad para proteger contra el daño molecular por especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Numerosos estudios in vitro e in vivo han documentado la habilidad tanto de concentraciones fisiológicas como farmacológicas de melatonina de proteger contra la destrucción de radicales libres (Reiter y cols., 2003).

La melatonina funciona a través de numerosas vías para reducir el estrés oxidativo. Las evidencias experimentales apoyan sus acciones como secuestrador directo de radicales libres (Hardeland y cols., 1993; Alegria y cols., 2003), como un antioxidante indirecto cuando estimula las enzimas antioxidantes (Reiter y cols., 2000; Rodríguez y cols., 2004), su estimulación de la síntesis de glutatión (Urata y cols., 1999) (un antioxidante intracelular esencial), su habilidad para aumentar la actividad de otros antioxidantes (o viceversa) (Gitto y cols., 2001), su protección de enzimas antioxidante del daño oxidativo (Mayo y cols., 2002; 2003a,b) y su habilidad para incrementar la eficacia en la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Acuña-Castroviejo y cols., 2002; Okatani y cols., 2003).

Por otro lado, hay numerosas *patologías nerviosas* asociadas a degeneración neuronal como consecuencia de un aumento de los fenómenos oxidativo y/o a una disminución de las defensas antioxidantes. Así, se conoce que muchas enfermedades neurodegenerativas y degenerativas inflamatorias de gran incidencia en la actualidad como Parkinson, Alzheimer, epilepsia (Cheng y cols., 2006; Mayo y cols., 2005; Srinivasan y cols., 2005), artrosis, cataratas (Siu y cols., 2006), degeneración macular de la retina (Yi y cols., 2005), fibromialgia (Acuña-Castroviejo y cols., 2006) e incluso la esquizofrenia, van acompañadas de un aumento de estrés oxidativo motivo por el cual la melatonina se presenta como un buen agente tanto preventivo como terapéutico.

Se ha observado también que la *melatonina* mejora la *diabetes* (Klepac y cols., 2006), afecta a la regulación de glucosa en los seres humanos (Korkmaz y cols., 2009). Por ende se ha observado que los pacientes diabéticos tienen niveles séricos bajos de melatonina diurnas y más receptores pancreáticos de melatonina (Tutuncu y cols., 2005; Peschke, 2008) sin embargo el papel de la melatonina en la prevención o el retraso del inicio de la diabetes no está bien establecido debido a estudios que demuestran los efectos beneficiosos de la melatonina se han llevado a cabo después de que el desarrollo de la manifestación clínica de la diabetes (Hussain y cols., 2006; Kadhim y cols., 2006).

La *melatonina* también disminuye la *presión arterial* (Paulis y Simko, 2007). Un reciente metaanálisis indica que la melatonina produce una reducción de la PA nocturna en una magnitud que se considera clínicamente relevante (Lemoine y cols., 2012). Se ha observado que la administración de melatonina durante la noche reduce la PA nocturna en hipertensos de ambos sexos (Scheer y cols., 2004; Cagnacci y cols., 2005; Grossman y cols., 2006) y en adolescentes con Diabetes Mellitus tipo 1 (Cavallo y cols., 2004). Mediante la determinación de la velocidad de la onda de pulso, una medida directa de la rigidez arterial, se ha verificado que el aumento de los niveles de melatonina durante la noche causa una disminución en la velocidad de la onda de pulso aórtico (Yildiz y cols., 2009).

Se está investigando la utilidad de la *Melatonina* en relación a la mejora del *rendimiento deportivo* en deportistas de élite. Este es el caso del estudio realizado por Maldonado y colaboradores en 2011 donde observó que el tratamiento con melatonina en los deportes de ejercicio intenso invierte el estrés oxidativo, mejora las defensas y el metabolismo de los lípidos, lo que resultaría en una mejora en el estado físico. Hay estudios que constatan que el ejercicio intenso influye en la secreción de melatonina. El

ejercicio puede actuar como un sincronizador. Dependiendo de la hora del día, de la intensidad de la luz, y la proximidad del ejercicio a la aparición o disminución de la producción circadiana de la melatonina, variará el ritmo de secreción de melatonina. Por una parte, el ejercicio extenuante especialmente per se induce un aumento del estrés oxidativo, que a su vez puede afectar los niveles de melatonina en la circulación periférica porque el indol es rápidamente utilizado para combatir los radicales libres. Por otra parte, la melatonina también puede influir en el rendimiento físico, y por lo tanto, la interacciones entre el ejercicio y la producción de melatonina puede ser beneficiosos (Germain Escames y cols., 2012). De hecho se ha observado que según a la hora del día en la cual se realiza el ejercicio físico influirá positiva (Theron, 1994) o negativamente (Monteleone, 1990) o incluso no influirá en la secreción de melatonina (Miyazaki, 2001). Hay pruebas de que la duración del ejercicio y la intensidad pueden inducir cambios de fase en los ritmos de secreción, independientemente de la luz, en sujetos de diferente estado atlético y edad (Wright y Lack, 2001).

Con respecto a la relación de la *melatonina con el sistema inmune* varias investigaciones han confirmado la correlación entre días cortos y/o picos en los niveles de melatonina por la noche con el número de linfocitos sanguíneos; estudios que fueron llevados a cabo en ratones (Demas y Nelson, 1996, 1998a; Nelson y cols., 1998) y humanos (Depres-Brummer y cols., 1997). En 1988, Kuci y colaboradores exploraron el papel inmunomodulador de la glándula pineal en ratones C57BL/6JHAN y observaron que el pico nocturno de melatonina estaba estrechamente sincronizado con el pico de proliferación de células progenitoras para granulocitos y macrófagos (CFU-GM). Se ha evaluado también el aspecto de la función inmune relacionado con el ritmo de melatonina en la inmunidad no específica, la acción de fagocitar. Estudiando los heterófilos, que son considerados fagocitos primarios y que representan el mayor

porcentaje de leucocitos periféricos, Rodríguez y colaboradores (1999a) mostraron en la tórtola collariza que los picos nocturnos séricos de melatonina se correlacionaban con un incremento en la actividad fagocítica de los heterófilos; esto sugirió una íntima relación entre la melatonina y la inmunidad no específica. En la inmunidad específica y no específica, empieza a estar claro, que la melatonina, de algún modo, participa en la regulación de estas variaciones estacionales y circadianas (Nelson y cols., 1999).

Otro efecto inmunomodulador de la Melatonina es su capacidad para estimular la linfopoyesis de las células B y la producción de monocitos y células NK (del inglés, *natural killer*) (Curier y cols., 2000), como procedimiento preventivo para reforzar la reactividad inmunitaria. Además, se ha demostrado que la Melatonina revierte la inmunosenescencia que se produce de forma natural debido al envejecimiento (Rodríguez y cols., 2005; Paredes y cols., 2007b).

Numerosos estudios están emergiendo actualmente para demostrar la eficacia terapéutica de la administración de *melatonina y determinados procesos cancerígenos*. Tal es el caso de uno de los últimos estudios publicados con respecto al hepatocarcinoma donde se evidencia que tras la administración de melatonina se induce a la apoptosis de las células del hepatocarcinoma HepG2 a través de la regulación al alza de Bim proapoptótico mediado por la translocación nuclear y la activación del factor de transcripción FoxO3a (Carbajo-Pescador y cols., 2013). En estudios in vitro con diferentes líneas celulares de cáncer han proporcionado la evidencia de la inducción de la apoptosis en las células tumorales por la acción de la melatonina (Hill y Blask, 1988; Cini y cols., 2005; Chiu y cols., 2010;) en el cáncer de colon (Farriol y cols., 2000; García-Navarro y cols., 2007), cáncer de ovario (Futagami y cols., 2001), apoptosis celular en el neuroblastoma (García-Santos y cols., 2006), disminución de la

proliferación celular de las células del melanoma en humanos (Cabrera y cols., 2010), reducción del tumor de páncreas por alteración de la fisiología mitocondrial de las células tumorales pancreáticas (González y cols., 2010).

En resumen, es de vital importancia realizar la observación sobre las diferentes evidencias clínicas de la melatonina, hormona que tiene gran cantidad de acciones en el cuerpo humano y de la cual cada día se está investigando más. Sobre todo en enfermedades importantes como las mencionadas como diabetes, hipertensión, cáncer o enfermedades neurodegenerativas y otras.

### ***1.3. CORTISOL, MELATONINA Y ESTRÉS.***

La secreción de Hormona liberadora de corticotropina (CRH) y consecuentemente de hormona adrenocorticotropa (ACTH) y cortisol mantiene un ritmo circadiano, siendo alta durante la mañana y mínima por la tarde. Estos ritmos se modifican por la alimentación (aumentando con el ayuno y disminuyendo con el alimento), los ritmos luz/oscuridad y de sueño/vigilia, de tal manera que este ritmo circadiano se establece en la infancia y no cambia con la vejez, modificándose lentamente sólo después de semanas de cambios permanentes en los ritmos biológicos (viajes transoceánicos por ejemplo). El estrés psicológico u orgánico suficientemente intenso (cirugía, traumatismos, enfermedades importantes, etc.), o el miedo aumentan la secreción de cortisol "preparando" al organismo para lo que se avecine, así como cuando se fuma tabaco y con ejercicios físicos intensos.

### 1.3.1. CORTISOL.

El cortisol (Figura 15) es una hormona esteroidea y como tal contiene una estructura básica que corresponde al núcleo de ciclopentanoperhidrofenantreno (el mismo del colesterol); los esteroides con 21 carbonos (C21) tienen propiedades glucocorticoideas y mineralocorticoideas.

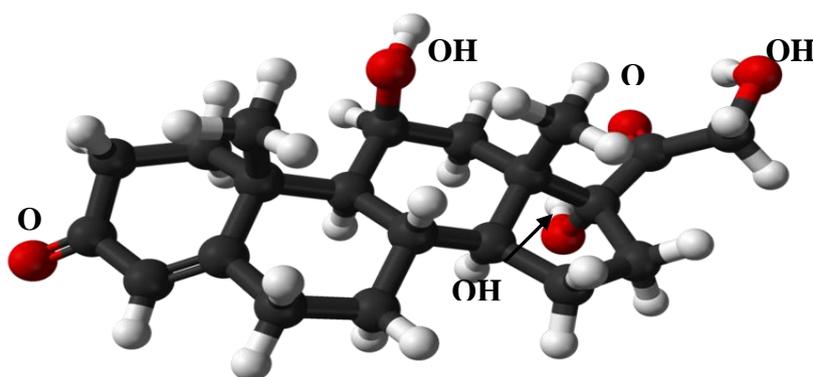


Figura 15: Estructura química del cortisol.

El cortisol es una hormona que se sintetiza en la zona reticular y fascicular de la corteza de la glándula suprarrenal a partir del colesterol y que tiene como funciones principales incrementar el nivel de azúcar en la sangre a través de la gluconeogénesis, suprimir el sistema inmunológico y ayudar al metabolismo de grasas, proteínas y carbohidratos además, de disminuir la formación ósea. (Tao Le y cols., 2009).

La glándula suprarrenal es un órgano que se sitúa justo encima de los riñones y que se divide en médula, que es la capa más interna y produce adrenalina y noradrenalina, controlando así el sistema nervioso simpático y otra zona que se denomina corteza que a su vez se subdivide en zona glomerular, donde se sintetiza aldosterona (mineralcorticoide), zona fascicular y zona reticular donde se sintetizan

cortisol y en menor medida andrógenos (dehidroepiandrosterona), síntesis que depende de la actividad y activación de diferentes enzimas contenidas en cada una de las zonas.

La cantidad de la hormona cortisol presente en la sangre está sometida a una variación diurna, con niveles más altos por la mañana (aproximadamente a las 8), y niveles más bajos entre las 12h y las 4 horas de la noche, o de 3 a 5 horas después de la aparición del sueño. La información sobre el ciclo luz/oscuridad se transmite desde la retina hasta el núcleo supraquiasmático del hipotálamo. Estas pautas no están presentes al nacer (las estimaciones de cuándo se inician varían entre dos semanas y nueve meses) (De Weerth y Buitelaar, 2003).

### ***1.3.1.1. SÍNTESIS Y METABOLISMO DE CORTISOL.***

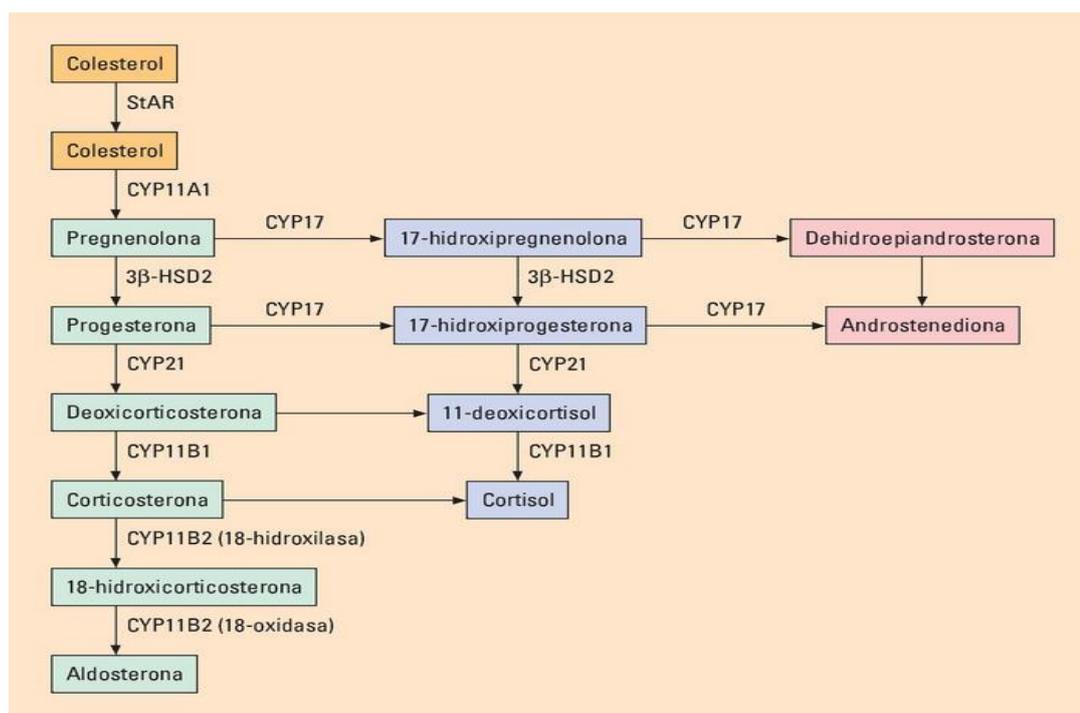
La síntesis de hormonas esteroideas es regulada por hormonas tróficas como la hormona adrenocorticotrófica (ACTH) en las células de la corteza adrenal y la hormona luteinizante (LH) en las células de Leydig de los testículos y células de la teca en los ovarios (Liu y cols., 2003).

El colesterol es el precursor para todos los esteroides suprarrenales. La principal fuente de colesterol es provista por la circulación en forma de LDL (low density lipoprotein (Lipoproteína de Baja Densidad). La LDL es internalizada vía endocitosis mediada por receptor. Las vesículas endosómica resultante se fusionan con lisosomas, y por medio de hidrólisis es producido el colesterol libre. El colesterol también puede ser generado de novo dentro de la corteza adrenal a partir de Acetil-CoA. Además, existe evidencia de que la glándula suprarrenal puede utilizar el colesterol presente en las HDL (High density lipoproteína (Lipoproteína de Alta Densidad) a través de su captación por ciertos receptores de HDL, recientemente caracterizados.

El colesterol libre, independientemente de su origen por captación periférica de las LDL o bien por síntesis de novo, debe ser transportado al interior mitocondrial donde ocurre la conversión a Pregnenolona. Este es el principal punto de control de la estimulación esteroideogénica por hormonas peptídicas y AMPc. Es el primer paso en la vía biosintética, donde el colesterol es convertido en pregnenolona por la enzima citocromo P-450<sub>scc</sub> (del inglés P-450 *side-change cleavage*) (Liu y cols., 2003). Por tanto, la primera reacción de ruptura de la cadena lateral del colesterol es el paso limitante en la regulación crónica en todos los tejidos esteroideogénicos.

En la regulación aguda, que determina la respuesta al estrés, el paso limitante es el flujo de colesterol hacia el interior de la mitocondria, en este proceso interviene la proteína StAR (Steroidogenesis Acute Regulator). La entrada de colesterol al interior de la célula se interrumpe cuando StAR finaliza su interacción con la membrana externa mitocondrial. Así se logra un rápido aumento o disminución en la biosíntesis esteroides, a través de la regulación del gen StAR (Rone y col., 2009).

Las hormonas suprarrenales son sintetizadas en múltiples pasos en los que intervienen citocromo P450 y deshidrogenasas  $\beta$ -HSD (Figura 16). Los citocromos específicos involucrados en el primer y último paso de la ruta biosintética del cortisol y la aldosterona son de localización mitocondrial.



**Figura 16:** Estereoidogénesis CYP (Citocromo P450).

Con respecto al metabolismo, el cortisol circula unido a proteínas y menos de un 5% en forma libre en el plasma. La fracción unida a proteínas está unida a cortisol binding globulin (CBG) y también a albúmina. Las fracciones unidas a proteínas pueden ser liberadas en los tejidos manteniendo un pool de reserva fácilmente disponible. Al igual que otros sistemas hormonales una elevación de la globulina transportadora de cortisol o CBG (por ejemplo en el uso de estrógenos orales) aumenta la concentración total de cortisol plasmático aunque la proporción del cortisol libre permanece normal.

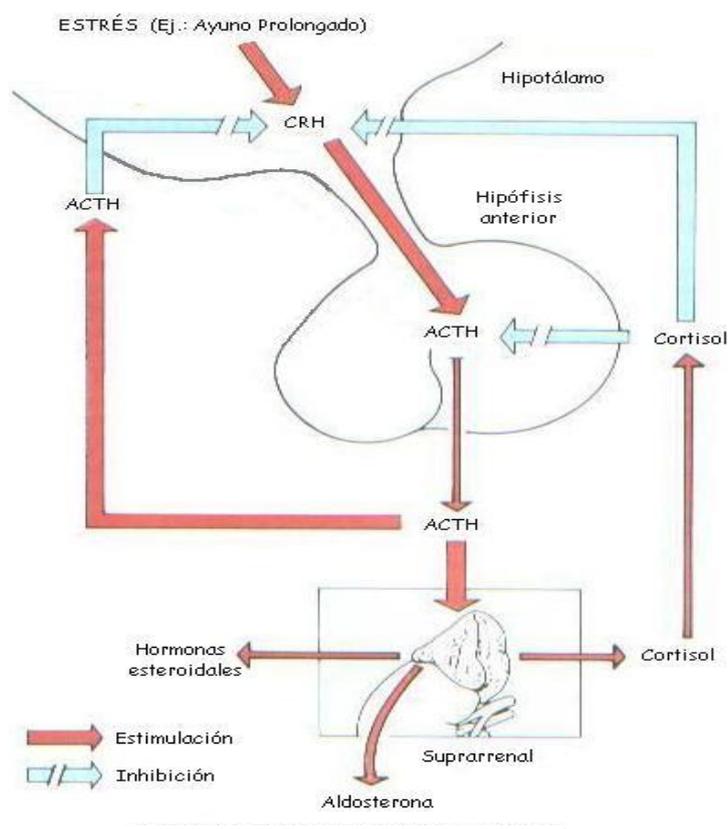
Muchos de los corticoides sintéticos se unen menos eficientemente a CBG y esto podría explicar la facilidad con que algunos análogos sintéticos producen efectos de sobredosis (síndrome de Cushing), aun utilizando bajas dosis. Los metabolitos del cortisol son biológicamente inactivos y se unen débilmente a las proteínas plasmáticas circulantes. La aldosterona también se une a proteínas plasmáticas pero en una proporción mucho menor que el cortisol.

El término glucocorticoides se aplica a todos los esteroides suprarrenales que tengan acción principalmente en el metabolismo intermediario, siendo el principal glucocorticoide el cortisol o hidrocortisona, el cual es secretado con un marcado ritmo circadiano teniendo un pico matinal, una disminución hacia medio día y un nadir vespertino o nocturno. La cantidad diaria de secreción de cortisol fluctúa entre 15 y 30 mg. La inactivación de los esteroides en general se produce a nivel hepático donde sufren una reducción de uno de los anillos y posterior conjugación con la ácido glucurónico

### ***1.3.1.2. REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE CORTISOL.***

El ACTH producido por la hipófisis anterior controla la actividad de la zona fasciculada y reticular. Específicamente, ACTH estimula la producción de cortisol aumentando la ruptura de la cadena lateral del colesterol para formar pregnenolona; esta es la etapa limitante de la síntesis de cortisol. La acción del ACTH es muy rápida, y su efecto puede verse a los 5 minutos de un aumento agudo de ACTH. Además de este efecto agudo un aumento continuado y en altas dosis de ACTH provocará hiperplasia de las células de la corteza adrenal. En oposición a esto la ausencia de ACTH por patología hipotálamo hipofisiaria llevará a una atrofia a de las zonas fasciculada y reticular confirmando que el ACTH ejerce un efecto trófico sobre el tejido.

Dentro de la regulación de la producción de corticoides existe un feed back negativo del cortisol sobre la secreción de ACTH. Este efecto se ejerce tanto a nivel hipotalámico (disminuye la liberación de CRH) como directamente sobre la hipófisis disminuyendo la ACTH (Figura 17).



**Figura 17:** Regulación de la secreción de cortisol tras un cuadro de estrés y sus efectos en el organismo.

La secreción de CRH y ACTH siguen un ritmo circadiano que funciona de acuerdo a los ciclos sueño-vigilia. Así vemos que la concentración de cortisol plasmático en los humanos es mínima alrededor de medianoche y aumenta hasta un pico máximo alrededor de las 8 de la mañana; después existe una caída a lo largo del día. Sobre impuesto a estas tendencias, existen liberaciones episódicas de algunos minutos de cortisol como respuesta a diversas circunstancias como el estrés.

Debido a las variaciones circadianas y a la posibilidad de pico de secreción de cortisol durante el día, la medición aislada de cortisol no puede ser interpretada sin la información correspondiente a la toma de la muestra. Es por eso que la medición de la secreción integrada de corticoides puede reflejar mejor el estado clínico de un paciente.

Pueden también realizarse mediciones repetidas intentando evaluar la presencia o ausencia de ritmo circadiano normal.

#### **1.3.1.4. MECANISMOS DE ACCIÓN DEL CORTISOL.**

El cortisol entra en la célula por difusión y se une a su receptor, los cuales se sitúan en lugares específicos en el DNA, produciendo un aumento en la síntesis de RNA y de proteínas de acuerdo al tipo de célula blanco. Así las acciones fisiológicas de los glucocorticoides incluyen regulación de la síntesis proteica, metabolismo de proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos.

- Metabolismo de los carbohidratos: los glucocorticoides aumentan la glicemia actuando como un antagonista de la insulina y suprimen la secreción de insulina. Así inhiben la captación de glucosa por los tejidos periféricos y promueven la gluconeogénesis.
- Metabolismo de las proteínas: se produce un efecto catabólico con aumento de la destrucción proteica y excreción de nitrógeno.
- Los glucocorticoides aumentan el glicógeno hepático y promueven la gluconeogénesis, produciendo una movilización de los aminoácidos glicogénicos que provienen de estructuras de soporte como músculo, piel, hueso y tejido conectivo; inhiben también la síntesis de proteína y la captación de aminoácidos.
- Ácidos grasos: los glucocorticoides regulan la movilización de ácidos grasos produciendo activación de la lipasa celular.

Los glucocorticoides tienen propiedades antiinflamatorias que están probablemente relacionadas con sus acciones en el territorio microvascular y también por efectos

celulares. El cortisol mantiene la respuesta vascular normal a factores vasoconstrictores y se opone a los aumentos de permeabilidad capilar característicos de las inflamaciones agudas. Induce además el aumento de los leucocitos polimorfo-nucleares, produce desaparición de los eosinófilos circulantes y disminuye la actividad de los linfocitos T. El cortisol por esta vía altera la inmunidad celular y humoral. Además los glucocorticoides inhiben la producción y/o la acción de mediadores locales de la inflamación como linfocinas y prostaglandinas. Los niveles de cortisol también pueden ser diferentes para las personas con autismo o síndrome de Asperger, existiendo estudios donde se pone de manifiesto la respuestas del sistema hipotalámico-pituitario-adrenocortical (HPA) y han demostrado estadísticamente niveles más elevados de cortisol en niños con autismo en comparación con controles (Corbet y cols., 2006).

Aparte de estas acciones, destaca el incremento de la respuesta fisiológica al estrés. En situaciones estresantes se elevan los niveles de cortisol, los cuales conducen a una cadena de fenómenos que, en última instancia, proveen de inmediata energía al organismo. Sin embargo, cuando el cortisol se secreta de forma crónica, pueden producirse secuelas fisiológicas tales como el incremento de la presión arterial y la supresión inmunológica. Se sabe que en los pacientes con depresión mayor hay un aumento general de la actividad del eje hipotálamo-hipofisario-corticoadrenal. La presencia de niveles elevados de cortisol de manera permanente, a consecuencia de una respuesta de estrés sostenida, provoca un aumento sustancial en la recaptación de serotonina, lo que reduce el nivel de serotonina en la hendidura sináptica. Ello podría ser corregido por los fármacos antidepresivos, pero no debemos olvidar que la eficacia de éstos no se observa tras su administración aguda, lo que lleva a pensar que su actividad terapéutica no se debe solamente a la acción del fármaco sobre su diana, sino a cambios compensatorios que se producen a más largo plazo.

La hipersecreción de cortisol y la falta de normalización del test de supresión con dexametasona se han estudiado ampliamente en relación con la depresión. Este test constituye una de las pruebas más relevantes sobre alteraciones en la regularización del sistema hipotálamo-pituitariocorticoadrenal (Joyce y cols., 1989, Alonso-Fernández. 1993). El 50% de los pacientes muestra no supresión de la secreción de cortisol después de la administración de la prueba de dexametasona. La normalización de esta respuesta es un marcador que correlaciona con la eficacia del tratamiento antidepresivo.

La enfermedad depresiva se ha asociado con estrés crónico en el cual existe sobre activación del eje HPA, ya que este consiste en un sistema de respuesta ante estímulos estresantes o estresores, ya sean físicos o psicológicos (Mello y cols., 2003). Existe evidencia significativa que indica que, en casos graves de trastorno depresivo mayor, hay una actividad incrementada del eje HPA, según puede verificarse por análisis en suero, orina y líquido cefalorraquídeo (Jurueña y cols., 2004), Esta actividad aumentada se relaciona con elevaciones periódicas del cortisol (Nestler y cols., 2002. Belmaker y cols., 2008.), de hecho se ha visto en estudio publicados que entre el 20-40% de los pacientes deprimidos atendidos en la consulta externa y entre el 60-80% de los hospitalizados en instituciones psiquiátricas presentan hipercortisolemia y exposición repetida y crónica a factores estresantes resulta en elevaciones prolongadas o extremas de glucocorticoides, lo que contribuye con el tiempo a una regulación a la baja de los receptores glucocorticoides en el lazo de retroalimentación negativa (Pariante y cols., 2008).

### **1.4.2. ESTRÉS.**

Como venimos comentando en esta tesis doctoral, el hombre, es un animal donde las conexiones con el medio externo esta vinculadas a un cambio en su medio interno, donde el gran determinante de todas estas funciones que produce nuestro cuerpo al relacionarse con el entorno, es el sistema nervioso y el sistema endocrino. La respuesta del organismo ante una situación amenazante constituye un claro ejemplo de integración neuroendocrina, ya que se desencadenan una serie de reacciones que preparan al organismo a la respuesta de huida, miedo o enfrentamiento.

Cuando hay una situación de estrés se ponen en marcha reacciones que producen una serie de cambio en las secreciones hormonales, siendo su última expresión en numerosos casos, la secreción de cortisol. Esta cascada de reacciones se presenta en múltiples situaciones ahora reconocidas con el nombre genérico de *estrés*, que incluye cualquier estímulo externo que cause un cambio en el equilibrio del organismo. El estrés puede definirse pues como la respuesta de un sistema autorregulable a una alarma general y también como la respuesta fisiológica, psicológica y de comportamiento, de un sujeto que busca adaptarse y reajustarse a presiones tanto internas como externas (Michal, 1992).

Hans Selye, fisiólogo canadiense y científico pionero en estrés, creó el concepto de reacción general de adaptación al estrés, que consta de tres fases: Fase A (reacción de alarma, movilización de todas las facultades del organismo); Fase B (adaptación, la reacción de estrés se dirige hacia el órgano mejor capacitado para suprimirlo); Fase C (agotamiento de este órgano o función), el poder de adaptación de un ser humano siempre tiene límites (Selye, 1960; Cruz y Vargas, 1998).

De esto se desprende que el estrés es una reacción del organismo para que éste se adapte a un esfuerzo corriente, pero debe considerarse que la sobrecarga de situaciones estresantes pueden llevar a consecuencias negativas, ya sea en términos de enfermedades médicas (enfermedad coronaria, úlcera péptica, hipertensión arterial, diabetes, enfermedades alérgicas, infecciones), o bien, psiquiátricas (insomnio grave, ansiedad, depresión) (Buceta y Bueno, 1995).

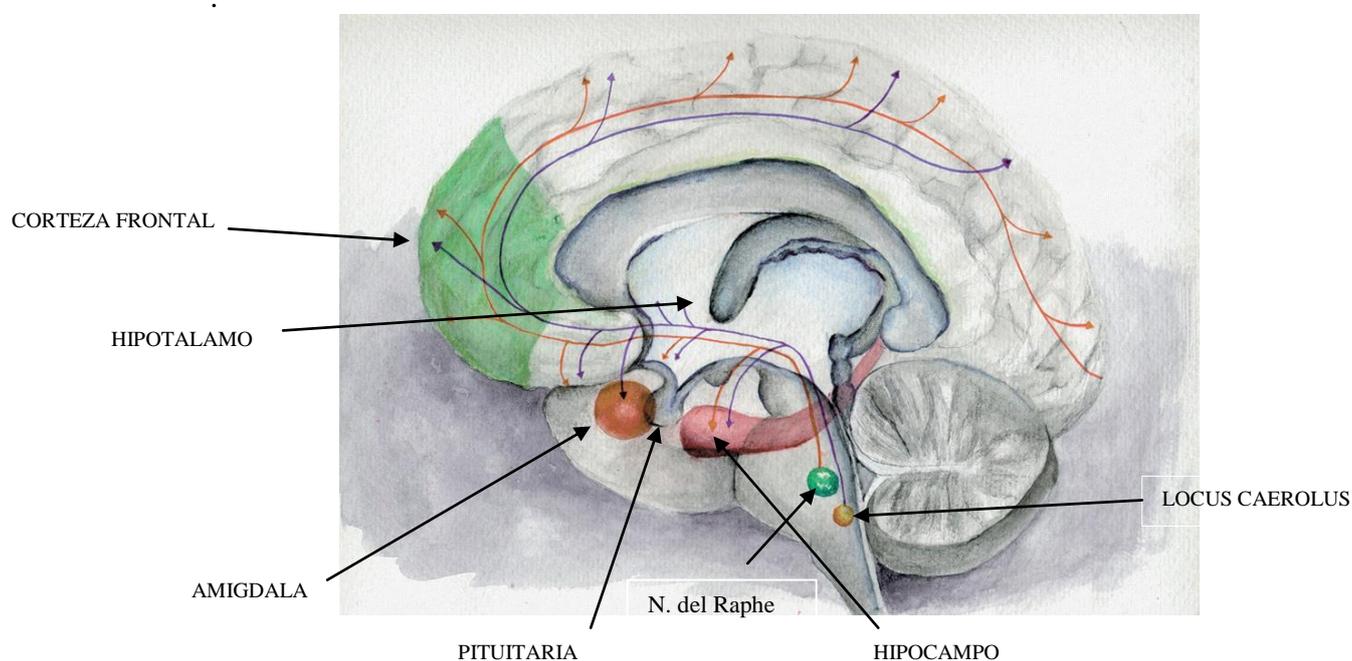
La existencia de una reacción de estrés ante una amenaza es positiva para el organismo, es el mecanismo del que dispone precisamente para defenderse contra la amenaza que percibe, y gracias a las reacciones bioquímicas y fisiológicas que desencadena, el organismo será capaz de reaccionar para defenderse del estímulo. Por lo tanto, una reacción de estrés en un determinado momento es muy positiva: Ahora bien, un estrés continuado puede ser muy perjudicial.

Estrés bueno por tanto sería el que nos da fuerzas y empuje para la realización de un trabajo positivo, como por ejemplo, preparar unos exámenes, preparar las vacaciones, iniciar un nuevo trabajo, organizar una fiesta o superar un disgusto familiar. Estrés malo sería aquel que nos lleva a un estado de insomnio, ansiedad o depresión, ya que tenemos la sensación de que no podemos controlar la causa o las causas que lo producen, y de una situación aguda se pasa a una situación crónica.

Sin embargo, el ritmo de vida en los países desarrollados sobretodo en aglomeraciones urbanas, nos depara una serie de situaciones que, aunque cada una de ellas de forma aislada no pueda considerarse como un agente estresante, en su conjunto pueden transformarse en una situación de entorno estresante. El estrés en estas situaciones es algo habitual inherente al ritmo de vida en un entorno muy competitivo, pero es difícil de diagnosticar ya que estamos ante algo habitual en nuestro estilo de

vida, y cuyas posibles causas no figuran en la anamnesis de una historia clínica habitual. Podemos citar, entre otras causas ruido ambiental, Conducir con tráfico colapsado, la presión del trabajo, incluso en condiciones “normales” espíritu de superación y de éxito, problemas familiares (aunque sean los normales).

Un “agente estresante” es un estímulo que activa el eje HHA (hipotálamo hipófisis adrenales) y/o el sistema nerviosos simpático, para ayudar al organismo en su adaptación fisiológica ante una amenaza. Los efectos del estrés son regulados por tres variables: magnitud, duración y la respuesta del individuo. Los cambios fisiológicos y conductuales producidos en respuesta al estrés, así como las regiones activadas del SNC, en particular el sistema límbico: amígdala, corteza frontal, hipocampo e hipotálamo, (Figura 18) y los neurotransmisores involucrados, dependen del tipo de estresor, su duración e intensidad (Buceta y Bueno, 1995; Gortari y Bravo, 2007).



**Figura 18:** Estructuras límbicas del cerebro humano. En líneas azules algunas aferencias de las neuronas del locus caeruleus que sintetizan noradrenalina, y en anaranjadas del núcleo rafe que sintetizan serotonina e inervan distintas estructuras, incluyendo diversos núcleos del hipotálamo (Tomada de Gortari y Bravo, 2007).

Dependiendo del tipo de estrés, físico o psicológico, se activan las neuronas del tallo cerebral o las de áreas del sistema límbico (respectivamente), las cuales inciden sobre neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) que sintetizan CRH (hormona liberadora de corticotropina). Las neuronas CRHérgicas hipofisiotrópicas envían sus proyecciones a la eminencia media de donde, en respuesta a un estímulo, se libera el CRH a la circulación portal que llega a la pituitaria y controla la síntesis y liberación de (ACTH) que viaja por el torrente sanguíneo a la glándula adrenal liberando glucocorticoides (cortisol en el caso humano y corticosterona en el caso de otros mamíferos).

Los glucocorticoides proveen la energía necesaria a los músculos para efectuar la respuesta e influyen en muchos otros fenómenos incluyendo la transmisión sináptica. Un fuerte incremento en los niveles de cortisol, por efecto del estímulo estresante, ejerce un efecto retroalimentador negativo sobre la pituitaria y sobre el hipotálamo inhibiendo la síntesis y liberación de ACTH y de CRH. En caso de un nivel menor al umbral, ocurre el fenómeno contrario de incremento en la síntesis y liberación de estas hormonas. Estos efectos de retroalimentación negativa o positiva, orientados a reestablecer el equilibrio, constituyen la base de la homeostasis (Gortari y cols., 2000).

En el humano, la respuesta al estrés se filtra a nivel del conocimiento expresándose bajo diversas conductas y movimientos que condicionan la experiencia psíquica de cada individuo, tales como enojo, depresión o ansiedad. Esto, gracias a la adquisición filogenética de la neocorteza que permite el conocimiento y racionalización del medio externo y elabora la respuesta, primero al nivel del razonamiento (respuestas cognitivas y de comportamiento) y luego a nivel de las emociones (sistemas límbico, neuroendocrino y neurovegetativo).

Entendemos al estrés como algo cotidiano, como un mecanismo adaptativo cuya función es neutralizar los factores que alteran el estado de homeostasis del organismo. Desafortunadamente, el estrés puede ser causado por problemas psicológicos que desencadenan las mismas respuestas. Mientras el organismo responde para recuperar la homeostasis, la integridad del cuerpo y el estado de normalidad se recupera. Esto se dificulta cuando el estrés es crónico y el organismo se ve afectado en condiciones de conflicto y adversidad por tiempos prolongados, generando un estado continuo de activación que se transforma en ansiedad y puede generar patologías a distintos niveles: alteraciones del sueño, envejecimiento prematuro, obesidad, bulimia, anorexia, afectaciones al sistema inmune e incluso embolias. El estrés aumenta el riesgo cardiovascular, es un factor importante en la obesidad, altera biorritmos como los del Cortisol o la Melatonina que van a condicionar la calidad del sueño, altera ciclos hormonales, es la causa de muchas patologías dermatológicas, deprime nuestro sistema inmunitario y tiene un efecto negativo sobre la longevidad y crea debilitamiento muscular además de enfermedades como la úlcera, colitis, impotencia, amenorrea.

### ***1.3.3. RELACION CORTISOL-ACTH-MELATONINA.***

El ritmo diario de melatonina es una señal cronobiótica, es decir, permite al individuo ajustar sus funciones fisiológicas al ciclo luz-oscuridad imperante (Arendt y Skene, 2005). Recientemente ha despertado interés su posible acción sobre la esteroidogénesis.

La melatonina actúa a través de 2 receptores de membrana llamados MT1 y MT2. En humanos, ambos receptores de melatonina están presentes en tejidos esteroidogénicos como la placenta y células de la granulosa (Lanoix y cols., 2006; Woo

y cols., 2001). Adicionalmente, estudios realizados en animales demuestran la presencia, solo del receptor MT1, en las células de Leydig de la rata y hamster y en la glándula suprarrenal de rata adulta y de fetos y adultos de primates no humanos (Valenti y Giusti, 2002; Torres-Farfan y cols., 2003), en esta última glándula, la melatonina inhibe la expresión de genes circadianos (Valenzuela y cols., 2008) y también la producción de cortisol estimulada por ACTH (Torres-Farfán y cols., 2004). Este efecto inhibitorio de melatonina sobre la producción de cortisol estimulada por ACTH, también está presente en la suprarrenal humana (Campino y cols., 2008; Campino y cols., 2011).

En humanos, los ritmos circadianos de melatonina y de cortisol en plasma tienen fases opuestas, es decir el alza nocturna de melatonina coincide con los valores bajos del ritmo de cortisol y viceversa (Weibel y Brandenberger, 2002), Por otra parte, la supresión aguda de melatonina producida por una breve exposición a luz brillante al final de la noche se asocia con un alza brusca del cortisol plasmático y salival (Leproult y cols., 2001), por lo tanto los investigadores concluyeron tras largos experimentos que la glándula suprarrenal humana expresa el receptor MT1 y un efecto agudo de la melatonina disminuye la producción de cortisol estimulada por ACTH (Campino y cols., 2008).

Tanto la Melatonina como el cortisol son moléculas que exhiben marcados ritmos diarios. Pero, mientras que la producción diaria de la indolamina es estrictamente nocturna en todas las especies estudiadas, el perfil rítmico diario del cortisol circulante muestra una gran variabilidad, con máximos diurnos, nocturnos o durante ambos periodos, dependiendo de las especies (Pavlidis y cols., 1999). Así el biorritmo normal del cortisol tiene un máximo de secreción a las 8-9 de la mañana, siendo precisamente

este pico el que nos despierta. A partir de este momento cae bruscamente, de forma que a las 12 del mediodía ya se encuentra a unos niveles por debajo de la mitad del basal y a las 11-12 de la noche tiene unos valores muy bajos del orden 1/10- 1/20 de los valores máximos de la mañana, y precisamente estos niveles bajos contribuyen a la secreción de la melatonina y a la aparición del sueño.

Hemos visto con anterioridad que el estrés crónico modifica el biorritmo del cortisol, manteniendo valores altos durante la noche, lo que a su vez, altera el biorritmo de la melatonina, la cual con su pico máximo entre las 3 y las 4 h de la madrugada aproximadamente, induce la fase REM del sueño. La fase REM es la fase del sueño más profundo donde se “desconecta” y se produce la acción reparadora sobre el cansancio (Cardinali, 2007). En consecuencia, la alteración del biorritmo del cortisol que se produce con el estrés, con su asincronía y a través de su acción sobre el biorritmo de la melatonina, modifica el sueño y sobre todo la fase REM del mismo, que afecta a su calidad y a su acción reparadora sobre el cansancio acumulado durante la jornada de trabajo.

Diferentes estudios han evidenciado como era la secreción a plasma de cortisol a través de un ritmo circadiano de pulsos horarios, con subidas en amplitud en los periodos del día (o de la noche en roedores) de máxima actividad. Así se ha observado que se coordina un “reloj central” situado en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo, con relojes periféricos del organismo y todo ello regula, además, acontecimientos y alteraciones del sueño (Young y Gallagher., 2004). Asimismo, la glándula suprarrenal está expuesta cada noche al aumento de la concentración plasmática de melatonina, como consecuencia del ritmo circadiano de síntesis de esta hormona (Dubocovich y cols., 2010).

A nivel molecular, los relojes circadianos son generados por la interacción de un grupo de genes colectivamente denominados genes reloj y sus proteínas en un circuito autorregulado transcripcional/traduccional. Los máximos y mínimos de la expresión de los mRNA de los reguladores positivos Bmal1 y Clock y de los negativos Per1-2 y Cry1-2 muestran una expresión horaria opuesta en las 24h. El heterodímero BMAL-CLOCK se une a las cajas E del promotor de los genes Per estimulando su transcripción (Dickmeis, 2009).

En suprarrenales humanas cultivadas por 12 horas, se observó que la ACTH junto con la estimulación de la expresión de las proteínas esteroideogénicas StAR and 3 $\beta$ -HSD y la producción de cortisol y progesterona, también estimuló la expresión del mRNA del gen Per1. Tanto la respuesta esteroideogénica a ACTH como la respuesta del gen reloj Per1, fueron inhibidas por melatonina (Campino y cols., 2011; Valenzuela y cols., 2012) lo que podría ayudar a entender los efectos inhibitorios de melatonina sobre la esteroideogénesis.

En resumen las acciones esteroideogénicas de ACTH involucran una respuesta temprana a través de la movilización de colesterol a las mitocondrias y una respuesta más prolongada a través de la inducción de genes de enzimas esteroideogénica (Sewer y Waterman, 2001), induciendo la expresión temprana de Per1, ello contribuiría a la formación de Cortisol por la glándula suprarrenal, que en períodos de estrés esta aumentada, pero al identificarse las acciones inhibitorias de la melatonina sobre la glándula suprarrenal es de suponer que influye de manera positiva en la secreción de cortisol en cuadros de estrés patológico incluso de insomnio, ansiedad o depresión para restablecer la homeostasis fisiológica que esta alterada en estos procesos por secreción crónica de cortisol.

### **1.3.4. CORTISOL Y ENVEJECIMIENTO.**

Como ya hemos comentado anteriormente, el envejecimiento va disminuyendo dentro del sistema neuroendocrino determinadas sustancias en su secreción, pero con respecto al eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HHA) sufre pocas alteraciones. Se ha descrito que la hipófisis disminuye su volumen y sufre procesos de fibrosis, necrosis focal, alteraciones vasculares y depósito de hierro, sin grandes cambios de contenido hormonal. Las glándulas suprarrenales aumentan la fibrosis, formación de nódulos y el depósito de lipofuscina. El ritmo circadiano del cortisol se mantiene pero los individuos mayores de 40 años adelantan el horario, probablemente por los cambios del ritmo de sueño.

La existencia de diferentes patrones de envejecimiento remarca la importancia de las investigaciones centradas en los factores que pueden estar interviniendo en el desarrollo de un envejecimiento saludable o patológico. Así, en los últimos 20 años se ha producido un incremento importante en el número de estudios centrados en los factores protectores o, por otro lado, propiciadores del deterioro cognitivo en personas mayores siendo en la actualidad, uno de los que está recibiendo una especial atención es el estrés. De hecho, uno de los aspectos más importantes del estrés es que por sí solo produce daño neurobiológico, habiéndose propuesto como una de las causas del deterioro cognitivo observado en el envejecimiento (McEwen, 2008).

Diferentes estudios transversales y longitudinales han destacado el importante papel que juega el estrés en el desarrollo de un envejecimiento patológico y, sobre todo, su asociación con el deterioro cognitivo (Lupien, 2009). El estrés se ha relacionado con el proceso de envejecimiento y con los cambios cognitivos que se producen en esta última etapa del ciclo vital. Así, por ejemplo, la “Hipótesis de la Cascada de

Glucocorticoides” (Sapolsky, 1986), redefinida más tarde como “Hipótesis de la Neurotoxicidad” (Gilbertson y cols., 2002), explica el deterioro cognitivo asociado a la edad, por una regulación a la baja de los receptores de cortisol provocada por el exceso en la secreción de cortisol a lo largo de la vida. Esta regulación a la baja provocaría un desajuste en la actividad del eje HHA, que conduciría finalmente a una hipersecreción de cortisol. Ésta desencadenaría toxicidad neuronal sobre todo a nivel del hipocampo (y con ello, el deterioro de la memoria).

De hecho, la investigación en humanos ha mostrado que, con el envejecimiento, se producen cambios en la actividad del eje HHA, los cuales se han relacionado con problemas de memoria. De nuevo aquí nos encontramos con una amplia diversidad individual, ya que se ha observado que algunas personas presentan incrementos en sus niveles de cortisol basal a través de los años, mientras otras muestran reducciones, y esto tiene unos efectos muy interesantes sobre su función cognitiva (Lupien, 1996). Así, en una serie de estudios de Lupien y colaboradores (1994; 1996; 1998), las personas que mostraron aumento de los niveles de cortisol basal en el tiempo, junto con altos niveles de cortisol al final del estudio, también tuvieron un peor rendimiento de memoria y un 14% menos de volumen del hipocampo (Lupien y cols., 1994; 1998). Además, estudios transversales han mostrado un peor rendimiento en memoria en personas mayores con mayores niveles de cortisol basal (MacLulich, 2005; Comijs, 2010).

A modo de resumen, podemos considerar el estrés y su relación con el cortisol y este con la melatonina como uno de los factores a tener en cuenta para explicar las diferencias entre un envejecimiento normal o saludable y uno patológico.

## ***2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS***

Durante la senectud la mayoría de los ritmos circadianos se pierden y, en consecuencia, se produce una desincronización interna del sistema circadiano. Esta desincronización se traduce en desajustes en la regulación de importantes funciones fisiológicas como el ciclo sueño/vigilia o el estado de ánimo (Poeggeler, 2005; Hardeland, 2012). De hecho, la mayoría de autores que tratan el tema de la Cronobiología en la senescencia, coinciden en que los aspectos principales que ocurren durante el envejecimiento de los organismos son tanto un adelanto de fase como una menor amplitud de los ritmos circadianos.

Como consecuencia de la alteración de los ritmos circadianos, a medida que se envejece se va produciendo un desgaste cada vez mayor en las oscilaciones de determinadas moléculas que le indican al organismo en qué momento del día se encuentra. Pero no solo influye la fisiología normal del envejecimiento en la secreción de determinadas sustancias si no que el entorno social y psicológico de cada persona también influyen, en mayor o menor medida, en la alteración de los ritmos circadianos, existiendo por tanto un feed back positivo o negativo en la concentración de determinadas sustancias que influyen en la evolución a la senescencia. Por lo tanto el medio interno y el medio externo van cogidos de la mano en la andadura hacia la vejez teniendo que tener en cuenta ambos y modificándolos según convenga y tengamos la posibilidad de realizarlo, más cada uno a su tiempo, para que el envejecimiento sea de calidad.

Resultados previos obtenidos por nuestro grupo de investigación, referente a la ingesta de cereales enriquecidos en triptófano en niños con alteraciones en ritmos biológicos, han puesto de manifiesto que la ingesta de los mismos son capaces de aumentar los niveles de los metabolitos urinarios ácido 5-hidroxiindolacético y 6-

sulfatoximelatonina, metabolitos de excreción del neurotransmisor serotonina y del indol melatonina respectivamente. Este incremento de los niveles de serotonina y melatonina son capaces de reconsolidar los ritmos biológicos cuando estos presentan alteraciones, como puede ser una menor amplitud del biorritmo.

Los estudios epidemiológicos indican que alrededor de un 80 por ciento de la población anciana sufre alteraciones crónicas de sueño nocturno y que sólo un 20 por ciento no muestran dichos problemas. Dichas alteraciones propician un deterioro de la calidad de vida, la salud y los estados físico y mental. Esta situación conduce a que las personas mayores consuman el 40 por ciento de los hipnóticos que se encuentran a la venta y que entre el 10 y el 27 por ciento de los ancianos tomen algún tipo de medicamento para conciliar el sueño, llegando en muchos casos a una importante dependencia de los fármacos. Además el efecto depresivo que tienen los hipnóticos sobre la respiración aumenta críticamente el riesgo de mortalidad en esta población.

Ahora y dado el aumento tan importante de pacientes en tratamiento con antidepresivos o benzodiacepinas en mayores de 65 años, a lo que se suma el aumento de la población en este rango de edad, seguimos investigando por este camino y nos propusimos evaluar si una dieta rica en un aminoácido esencial, como es Triptófano, puede mejorar sustancialmente la concentración de determinadas moléculas que intervienen en nuestro sueño, nuestra vigilia, nuestro estado de animo, nuestra capacidad de excretar sustancias que producen envejecimiento celular y alteraciones genéticas, como son los radicales libres, y mejorar en definitiva y en la medida de lo posible, la calidad de vida.

Por tanto y en resumen nuestros objetivos son:

1. Determinar cómo influye una dieta enriquecida con triptófano en el sueño y la vigilia, en el estado de ansiedad y el ánimo deprimido en los sujetos participantes.
2. Evaluar el efecto de la ingesta de cereales enriquecidos con triptófano en personas mayores sobre las moléculas ácido 5-hidroxindolacético y 6-sulfatoximetatonina, metabolitos de excreción de la serotonina y la melatonina respectivamente.
3. Analizar la capacidad antioxidante de una dieta enriquecida con triptófano en personas mayores, de tal manera que aumentemos la excreción de radicales libres
4. Evidenciar si una dieta enriquecida con triptófano disminuye el pico de secreción matutino de cortisol, entendiendo matutina como la concentración de cortisol en la primera orina de la mañana.

## *3. MATERIALES*

## *Y METODOS*

### ***3.1. MUESTRA DE ESTUDIO.***

El estudio fue realizado en la población de la ciudad de Badajoz, donde se eligieron a 35 pacientes mayores ( $62\pm 4,1$  años) caucásicos, voluntarios, de los cuales 26 eran mujeres 9 hombres. Los criterios de selección de la muestra de estudio fueron: problemas de sueño, no tenían afecciones cardíacas agudas o durante el mes previo, no fumadores, no consumo de drogas, tener problemas de sueño de conciliación o de desestructuración.

Durante el estudio permanecieron en su residencia principal y se les dieron instrucciones sobre cómo tomar los cereales y se les instó a que tomaran notas sobre los cambios que observaran en su sueño y en su vigilia. En este estudio intentamos sobre todo interferir lo menos posible en la rutina de su vida diaria para así intentar que ellos fueran controles de sí mismo.

Todos los individuos firmaron un consentimiento informado (Anexo 2) y el estudio fue aprobado por el Comité Ético de la Universidad de Extremadura (Badajoz, España) de acuerdo a la Declaración de Helsinki, el Consejo de Europa y la Declaración de la UNESCO sobre derechos humanos, biomedicina y genoma humano, así como cumplir todos los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y bioética.

#### ***3.1.1 Historia Clínica de cada Paciente (Anexo 1).***

A todos los pacientes se les realizó una historia clínica detallada sobre su salud donde se incluían consideraciones sobre su calidad de sueño.

## 3.2. DIETA Y CEREALES DE ESTUDIO.

Los cereales utilizados han sido producidos y manufacturados por Laboratorios ORDESA S.L. (Barcelona, España). Para nuestro estudio hemos utilizado las formulas Blevit Plus 8 cereales© (cereales control) con una concentración de 75 mg de triptófano por cada 100 mg de cereales y Blemil Plus 8 cereales© modificados con 200 mg de triptófano por cada 100 mg de producto.

**Cereales control:** Los cereales utilizados en el estudio fueron *Blevit Plus 8 cereales*© (Laboratorios Ordesa, S.L.), papillas de cereales infantiles elaboradas a partir de trigo, arroz, cebada, centeno, maíz, mijo, sorgo, avena, fructooligosacáridos, extracto de malta, sales minerales y extractos de plantas como tila, melisa y manzanilla. Los mismos llevan un complejo vitamínico incluyendo vitaminas A, B1, B2, B6, B12, C, D, E, K, nicotinamida, pantotenato cálcico, ácido fólico y biotina. Dichos cereales contienen una composición de *Triptófano* de 75 mg por 100 g de producto.

**Cereales enriquecidos con *Triptófano*:** Estos cereales contienen los mismos macro y micronutrientes que los cereales control, pero enriquecidos en *Triptófano* con 200 mg por 100 g de producto.

Durante la primera semana todos los participantes ingerían un preparado de cereales control con 22,5 mg de triptófano en 30 g de cereales que tomaban en el desayuno y en la cena. Durante la segunda semana, semana de tratamiento, los individuos ingerían 30g de cereales enriquecidos con triptófano a una concentración de 60 mg también durante el desayuno y la cena. Finalmente durante la tercera semana, semana post tratamiento, los individuos no ingerían cereales, manteniendo su dieta habitual como en las semanas previas al estudio.

SEMANA	CEREAL	CANTIDAD DE PRODUCTO	CANTIDAD DE TRIPTOFANO
1	Control	30 g de cereal	22,5 mg
2	Tratamiento	30 g de cereal	60 mg
3	Post-Tratamiento	0 g de cereal	0 mg

**Tabla II:** Representación de las dietas seguida por los participantes del estudio durante 3 semanas en las que consumieron cereales durante las dos primeras y una tercera semana con su dieta habitual. Control: Cereales Blevit Plus 8 cereales©; Tratamiento: Cereales Blevit Plus 8 cereales © enriquecidos en Triptófano.

En ninguna de las dos primeras semanas de estudio los voluntarios conocían si tomaban cereales controles o enriquecidos en *triptófano*, es decir, se realizó el ensayo a ciegas.

### 3.3. OBSERVACION DEL SUEÑO.

#### 3.3.1. AGENDAS DE SUEÑO.

Cada semana experimental los voluntarios recibían una agenda de sueño (Anexos 3, 4 y 5) con el fin de que anotasen la hora a la que se levantaban y se acostaban cada día. En dicha agenda se indicaba las horas de recogida de las muestras de orina, las cuales se tomaban a periodos horarios concretos en botes de orina estériles, los cuales se congelaron a - 24°C hasta la realización de las determinaciones.

Paralelamente los voluntarios tomaron nota en la agenda de alimentación que seguían diariamente. La tensión arterial fue valorada a lo largo del estudio no existiendo variaciones importantes.

### 3.3.2. *ACTIWATCH® (ACCELERÓMETRO), READER (LECTOR CONECTADO A UN PC) Y EL SOFTWARE: CAMBRIDGE NEUROTECHNOLOGY LTD (V 5.42).*

Para la monitorización de la actividad motora general de cada paciente a lo largo del protocolo experimental se utilizaron actímetros de muñeca (*Actiwatch® Cambridge Neurotechnology Ltd.*) que los voluntarios llevaron ininterrumpidamente durante el estudio excepto para los momentos de aseo personal.

El *Actiwatch®* (Figura 19) es un dispositivo compacto y muy ligero que los individuos llevaron en la muñeca de su mano no dominante, permitiendo el registro y medida de los movimientos físicos. Debido a su tamaño y peso ligero (5 g) se asegura que se pueda llevar fácilmente.

Los datos se transfirieron a un ordenador y fueron analizados mediante el software *Sleep Analysis®*. La recogida de la actividad por los actímetros se realizó en bloques de 2 minutos. El *Actiwatch* permite marcar el intervalo en el que el individuo se va a la cama presionando un botón localizado en la parte superior; el intervalo finalizará cuando el individuo vuelva a presionar el botón a la hora de levantarse.

El sistema monitorizado *Actiwatch®* está constituido por tres partes:

- Actímetro
- Reader (lector conectado a un ordenador)
- Software *Sleep Analysis®*

El *actímetro* registra la actividad mediante un acelerómetro que mide aceleraciones en los tres ejes del espacio. El correspondiente voltaje es convertido y almacenado como medida de actividad en la unidad de memoria del actímetro. La

frecuencia máxima que puede generar es de unos 32 Hz. El actímetro presenta un umbral de detección a partir de una aceleración de los 0.05 g.



**Figura 19:** Actímetro de muñeca que llevaron todos los participantes durante las 3 semanas de duración del estudio.

La actigrafía es una técnica válida y muy útil para el estudio del sueño en seres humanos. Los resultados de De Souza y colaboradores en 2003 demostraron que la actigrafía, además de ser una herramienta muy potente y útil para los estudios del sueño, presenta un nivel muy elevado de concordancia con los obtenidos mediante polisomnografía, que a pesar de ser el patrón perfecto para los estudios de sueño en este estudio, se descartó por exigir un elevado nivel de intervención además de obligar a la institucionalización de los sujetos.

Tras finalizar el experimento, la actividad adquirida por el Actiwatch, se vuelca sobre *el Reader*, y éste la transfiere al ordenador personal donde se analiza con el correspondiente software, el cual nos da una serie de parámetros que son los que nosotros utilizamos para averiguar si la papilla ha mejorado el sueño. Se estimó así, a lo largo de todo el estudio, tanto la cantidad como la calidad del sueño del anciano mientras recibían las diferentes dietas, a través del *software Sleep Analysis*© (Figura

20). Este programa permite el cálculo de los parámetros cronobiológicos sueño/vigilia de los datos registrado por el actímetro a lo largo del estudio de cada voluntario.

El programa ofrece una serie de algoritmos que hacen estimaciones sobre el movimiento, el sueño y vigilia para el periodo comprendido entre el comienzo y el final del sueño. El tiempo en que el participante está en la cama y las horas en la que se acuesta y se levanta, se registraron, también en las agendas rellenas.

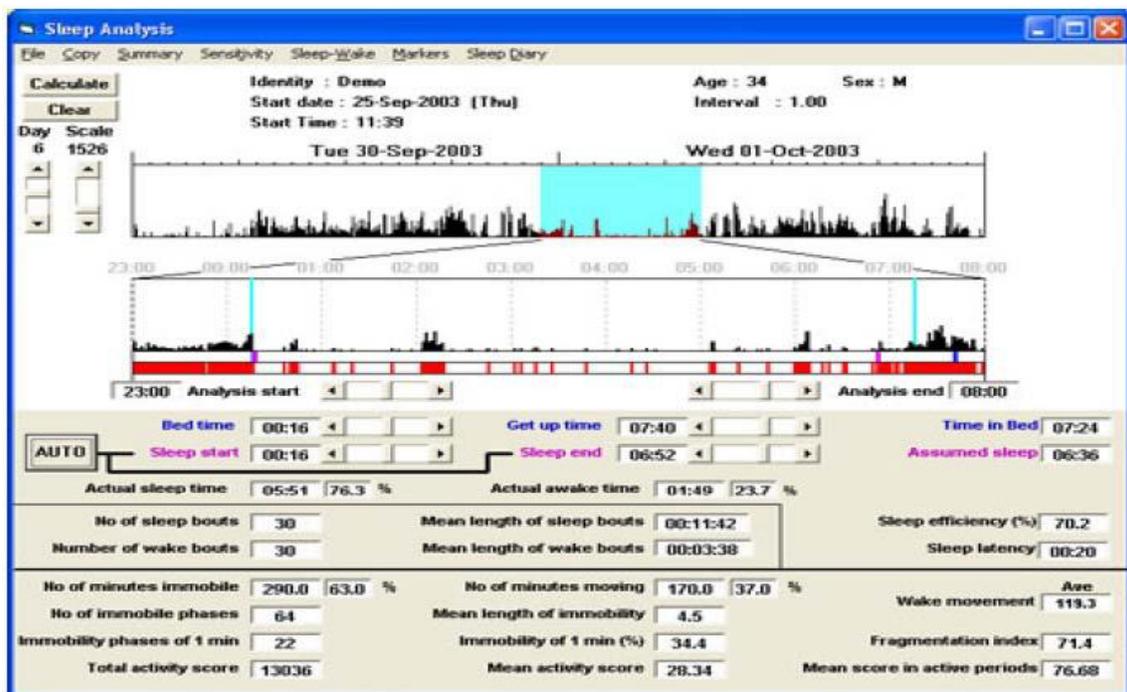


Figura 20: Captura de pantalla de la ventana de análisis del sueño del software Sleep Analysis 5.02© donde se aprecian los distintos parámetros que determina el programa.

Los parámetros más importantes analizados fueron:

- **Hora de irse a la cama:** determinado a partir de la agenda de sueño y del marcador de acontecimientos que debían realizar los pacientes, queda registrado si se presiona el círculo del Actiwatch®.

- **Hora en la que se levanta:** determinado a partir de la agenda de sueño y del marcador de acontecimientos que debían realizar los pacientes, quedar registrado si se presiona el círculo del Actiwatch®.
- **Tiempo de permanencia en la cama:** es la diferencia entre las dos horas anteriores.
- **Tiempo de vigilia:** determinado por algoritmos.
- **Tiempo asumido como sueño:** la diferencia entre el final y el principio del sueño.
- **Tiempo real del sueño:** determinado por algoritmos y es equivalente al tiempo de sueño asumido menos el tiempo de vigilia.
- **Eficiencia de sueño:** Porcentaje de tiempo de sueño mientras el sujeto permanece en la cama.
- **Latencia de sueño:** Tiempo que transcurre antes del inicio del sueño.
- **Número de periodos de sueño:** muestra el número de episodios de sueño.
- **Número de periodos de vigilia:** muestra el número de episodios de vigilia.
- **Tiempo de inmovilidad:** Número total de minutos en los que el sujeto tiene una movilidad cero, que se asume como tiempo de sueño.
- **Tiempo de movilidad:** número total de minutos en los que el sujeto tiene movilidad durante los periodos de sueño asumido.
- **Porcentaje de tiempo de movilidad/inmovilidad:** relación entre el tiempo con o sin movimiento en el periodo asumido como sueño.

- **Número de fases de inmovilidad:** Número de períodos con cero movimientos registrados de una forma consecutiva.
- **Número de fases de inmovilidad de 1 minuto:** número de fases de inmovilidad de duración de más de un minuto.
- **Índices de movimiento y fragmentación:** es el resultado de sumar el tiempo de movilidad y el porcentaje de fases de inmovilidad de 1 minuto. Es un indicador de la calidad del descanso.
- **Media de la actividad:** valor promedio de la actividad en el tiempo total de sueño.
- **Actividad total:** Número total de actividad durante el sueño.
- **Despertares:** Número de sucesos de despertares durante el sueño.
- **Promedio de los movimientos en vigilia:** promedio de la actividad registrada intrasueño.

Una vez calculados estos parámetros para una noche, el procedimiento se repitió para cada día registrado. De todos los parámetros calculados, se seleccionaron aquellos que ofrecían información más relevante acerca de la calidad del sueño.

**1. Minutos en cama, 2. Sueño asumido, 3. Sueño Real, 4. Latencia de Sueño, 5. Eficiencia de Sueño, 6. Despertares, 7. Minutos de Inmovilidad (%), 8. Actividad total, 9. Índice de Fragmentación.**

### **3.4. MUESTRAS DE ORINA.**

Las muestras de orina eran recogidas:

1. *Semana Control*: Las orinas se recogieron a mediados de esta; se les recogía tanto la primera orina de la mañana como la última de la tarde.

2. *Semana Tratamiento*: Se recolectaron las orinas en agudo (primer día de tratamiento), tanto la primera por la mañana como la última por la tarde. La misma operación fue repetida el último día de tratamiento.

3. *Semana Post-tratamiento*: Las orinas fueron recogidas el último día de la semana tanto la primera de la mañana como la última de la tarde.

Todas las muestras de orina fueron congeladas a  $-24^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis y determinación de metabolitos.

### **3.5. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE SEROTONINA, MELATONINA, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CORTISOL.**

*Los niveles de Serotonina y Melatonina* se determinaron a través de sus metabolitos excretados en la orina: el ácido *5-hidroxiindolacético (5-HIAA)* para *Serotonina* y la *6-sulfatoximelatonina* para *Melatonina*. La concentración de este sulfato en orina está relacionada con el total de melatonina en sangre. Estas cuantificaciones se llevaron a cabo mediante inmunoensayos E.L.I.S.A.s. Para ello se utilizaron los kits comerciales EIA 4482 para el ácido 5-hidroxiindolacético y EIA-1432 para la 6-sulfatoximelatonina (DRG®). La absorbancia se midió a una longitud de onda de

635nm en el caso de la determinación del metabolito de excreción de la serotonina y a una longitud de onda de 625nm para el metabolito de excreción de la melatonina.

Para ajustar la variación en la diuresis de las muestras, los resultados fueron expresados como el ratio del metabolito de excreción (medido en pg./ml) entre la creatinina presente en la orina (medida en mg/ml). Para ello, la determinación de los niveles de creatinina se llevó a cabo mediante el test de Jaffe (Garrido y cols., 2010). Finalmente, los resultados expresados como pg. de metabolito/mg de creatinina se normalizaron a 1 en el caso de las orinas recogidas durante la semana control. Las orinas recogidas durante las semanas de tratamiento y post-tratamiento se relativizaron respecto a su propio control.

***Para la realización del estudio de la capacidad antioxidante*** se llevó a cabo mediante el método de la equivalencia en Trolox. Para ello se dispuso del kit comercial *Antioxidant Assay Kit 709001 (Cayman Chemical Company)*. La suma de los antioxidantes endógenos más los de la dieta representan el total de la actividad antioxidante del sistema. La cooperación entre los diferentes antioxidantes produce una gran protección frente a los ataques del oxígeno activo o el nitrógeno de las especies, mucho más que si lo hiciera uno solo. Así, la capacidad antioxidante general puede proporcionar información biológica más pertinente comparada con la obtenida por la medida de un componente individual por lo que consideramos la acción de todos los antioxidantes presentes en el plasma y en los fluidos corporales y veremos como aumentan tras la administración de las papillas.

Las lecturas de las absorbancias se llevaron a cabo a temperatura ambiente en un lector de placas *TECAN infinite M200©* y con el software *Tecan-i-control©*.

*Para la valoración de la concentración de cortisol libre en la primera orina de la mañana* se utilizó la técnica ELISA con el Kit comercial EIA-2989 (DRG® cortisol urinario). Método por el cual de manera competitiva e inmunoenzimáticamente y posterior utilización de colorimetría se objetiva el cortisol libre urinario. Posteriormente la absorbancia se midió a una longitud de onda de 450 nm mostrándonos así los niveles de cortisol.

### **3.6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.**

Para el análisis estadístico de los datos recogidos por actimetría y los datos obtenidos de las muestras de orina se empleó el software *Graphpad Prism 5.02*© para el entorno de *Windows*©. Los datos se estudiaron estadísticamente con el test de Kolmogorov-Smirnov para determinar si los datos seguían o no la distribución normal. Posteriormente se analizaron con el test de Kruskal-Wallis y el post-test de Dunns para comparaciones múltiples.

### **3.7. VALORACION DE LA ANSIEDAD.**

En estudios previos objetivamos que durante la semana de tratamiento los individuos de estudio mejoraban su estado de ánimo, su iniciativa y su vigilia en más aspectos a parte del relacionado con un sueño reparador, por lo que en este estudio pensamos en la posibilidad de objetivar ese resultado con test que pudieran darnos datos reales sobre la ansiedad y/o el estado deprimido durante el tiempo de tratamiento. Los test se pasaron antes de empezar a tomar los cereales, durante y después de finalizar el

estudio, es decir, en el último día de la última semana, para así mitigar, en la medida de lo posible, el efecto placebo que sobre el sujeto pudiera tener la toma de los cereales.

Utilizamos para ello dos test:

- Test STAI de estado rasgo de ansiedad.
- Test de Depresión de Beck

### ***3.7.1. TEST STAI de ansiedad (State-Trait Anxiety Inventory) (Anexo 6).***

Este cuestionario fue elaborado por Spielberg y cols. en 1970, y se encuentra editado en T.E.A. Ediciones, Investigaciones y Publicaciones Psicológicas. Se considera, dentro de los instrumentos de evaluación psicológica, como un autoinforme.

Las propiedades psicométricas han sido extensamente analizadas en relación con la consistencia interna, la fiabilidad test-retest y la obtención de diferentes evidencias de validez (Virella y cols, 1994; Vigneau y Cormier, 2008; Mystakidou y cols., 2009; Vautier y Pohl, 2009; Bados y cols., 2010; Guillén-Riquelme y Buela-Casal, 2011) de este tipo de test.

Spielberg distingue entre ansiedad estado y ansiedad rasgo:

- *La ansiedad estado(A/E)* está conceptualizada como un estado o condición emocional transitoria del organismo humano, que se caracteriza por sentimientos subjetivos, conscientemente percibidos, de tensión y aprensión, así como por una hiperactividad del sistema nervioso autonómico con la importante característica de que varía a lo largo del tiempo fluctuando en su intensidad.

- *La ansiedad rasgo (A/R)* señala una relativamente estable propensión ansiosa por la que difieren los sujetos en su tendencia a percibir las situaciones como amenazantes y a responder a esto con elevaciones en su estado de ansiedad (A/E). Es decir, la ansiedad rasgo (A/R) implica diferencias entre los sujetos en su disposición para responder a situaciones estresantes con diferentes cantidades de ansiedad estado.

Así pues, en la escala ansiedad estado se pregunta por la intensidad con que se siente lo expresado por los ítems en ese momento, mientras que en la escala ansiedad rasgo se le pide al sujeto que evalúe la frecuencia con que siente generalmente los ítems de esa escala.

En principio, el STAI fue diseñado para una autoaplicación, y puede ser administrado individual y colectivamente. Puede utilizarse en adolescentes y adultos, y no tiene tiempo limitado de respuesta. El cuestionario comprende escalas separadas de autoevaluación que miden dos conceptos independientes de la ansiedad, la ansiedad como estado (E) y la ansiedad como rasgo (R).

La escala Ansiedad Estado consta de 20 frases con las que el sujeto puede describir cómo se siente "en un momento particular".

Las respuestas a estos ítems se hacen en una escala de 4 pasos, de 0 a 3:

0= Nada

1= Algo

2= Bastante

3= Mucho

La escala de Ansiedad Rasgo también consta de 20 frases en las que el sujeto puede mostrar cómo se siente "generalmente". Las respuestas a estos ítems, al igual que en la escala anterior (ansiedad estado) se hacen en una escala de 4 pasos, de 0 a 3:

0= Casi nunca

1= A veces

2= A menudo

3= Casi siempre

Las puntuaciones de ansiedad estado (A/E) y ansiedad rasgo (A/R) pueden variar desde un mínimo de 0 puntos hasta un máximo de 60 puntos, con matices diferentes en cada uno de ellos. Hay que tener en cuenta que la versión del STAI contiene ítems directos que reflejan existencia de ansiedad, e ítems inversos que manifiestan ausencia de la misma. Ambos tipos de elementos se han entremezclado para evitar en lo posible el efecto de aquiescencia en las respuestas del sujeto.

En la escala A/E hay 10 ítems directos y 10 inversos, mientras que la escala A/R contiene 13 elementos directos y 7 inversos.

Los elementos de la escala invertida en cada parte son los siguientes:

- Ansiedad estado (A/E): 1, 2, 5, 8, 10, 11, 15, 16, 19 y 20.

- Ansiedad rasgo (A/R): 21, 26, 27, 30, 33, 36 y 39.

Una vez obtenida la puntuación directa de la forma indicada, se transforman estas puntuaciones en centiles, teniendo en cuenta el sexo y edad del sujeto con los

baremos pertinentes. La puntuación centil indica el tanto por cien del grupo normativo al que un sujeto determinado es superior en la variable apreciada por el test.

La calificación directa se hace utilizando plantillas ya estructuradas, que se colocan sobre el protocolo de preguntas y respuestas, para después hacer la sumatoria en cada una de las columnas de respuestas; y aplicar una fórmula ya establecida, que permite hacer una conversión en cada uno de los reactivos, y obtener un puntaje bruto que deberá ubicarse dentro de una escala de baremos estructurada según sexo y edad, para finalmente obtener la puntuación directa y darle la interpretación que corresponda dentro de una escala de decatipos y/o centiles (la puntuación centil indica el tanto por cien del grupo normativo al que un sujeto determinado es superior en la variable apreciada por el test) en la cual se entenderá como valor significativo arriba de la media, y debajo de la media, no significativo.

### ***3.7.2. TEST DE DEPRESION DE BECK,***

El Inventario de Depresión de Beck (Anexo 7) se presentó en la siguiente publicación: Beck, A. y cols., “An inventory for measuring depression. *Archives of General Psychiatry*” 1961; 4:561–71.

En 1971 el texto fue revisado ligeramente, en una versión conocida como **BDI-IA**, y que es la usada en esta página. Existe una versión más reciente, publicada en 1996 y conocida como **BDI-II**, que sólo está disponible comercialmente. El Inventario de Depresión de Beck-II (BDI-II) es un autoinforme de lápiz y papel compuesto por 21 ítems de tipo Likert. El inventario inicialmente propuesto por Beck y sus versiones posteriores han sido los instrumentos más utilizados para detectar y evaluar la gravedad de la depresión. De hecho, es el quinto test más utilizado por los psicólogos españoles (Muñiz y Fernández-Hermida, 2010). Sus ítems no se derivan de ninguna teoría

concreta acerca del constructo medido, sino que describen los síntomas clínicos más frecuentes de los pacientes psiquiátricos con depresión.

El BDI-II ha experimentado algunas modificaciones respecto a las versiones anteriores para representar mejor los criterios para el diagnóstico de los trastornos depresivos recogidos en el DSM-IV (Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales, cuarta edición, American Psychiatric Association, 1994) y CIE-10 (Clasificación estadística internacional de enfermedades y problemas relacionados con la salud, Organización Mundial de la Salud, 1993). La prueba ha de ser destinada preferentemente para un uso clínico, como un medio para evaluar la gravedad de la depresión en pacientes adultos y adolescentes.

El BDI-II es un autoinforme que proporciona una medida de la presencia y de la gravedad de la depresión en adultos y adolescentes de 13 años o más. Se compone de 21 ítems indicativos de síntomas tales como tristeza, llanto, pérdida de placer, sentimientos de fracaso y de culpa, pensamientos o deseos de suicidio, pesimismo,

El cuestionario ha sido traducido directamente de su fuente original. En relación al género, cuando ha sido posible se ha optado por expresiones neutras como "alguien" o "algunas personas". En las demás ocasiones se ha optado por utilizar el masculino como genérico, evitando así la fórmula "o/a", "él/ella" que tanta naturalidad resta al lenguaje y suponiendo en el lector la elemental capacidad de interpretación.

El BDI-II es fácil de utilizar. Se puede aplicar de forma individual o colectiva, con formato de papel y lápiz o de forma oral. En general, requiere entre 5 y 10 minutos para ser completado.

Evalúa fundamentalmente los pensamientos intrusivos de la depresión y síntomas clínicos de la misma, evitando los relacionados con ansiedad y síntomas motores.

El cuestionario consta de 21 preguntas, proporcionando cada pregunta una puntuación entre 0 y 3. La puntuación máxima posible es por tanto 63. Los puntos de corte sugeridos para interpretar el resultado obtenido son los siguientes:

<b>00–10</b>	Considerado normal
<b>11–16</b>	Ligero trastorno emocional
<b>17–20</b>	Depresión clínica borderline
<b>21–30</b>	Depresión moderada
<b>31–40</b>	Depresión severa
<b>más de 40</b>	Depresión extrema

## **4. RESULTADOS**

A continuación se exponen en sucesivas figuras los resultados obtenidos de los estudios de actimetría y estado de ánimo, así como del resto de parámetros analizados en orina.

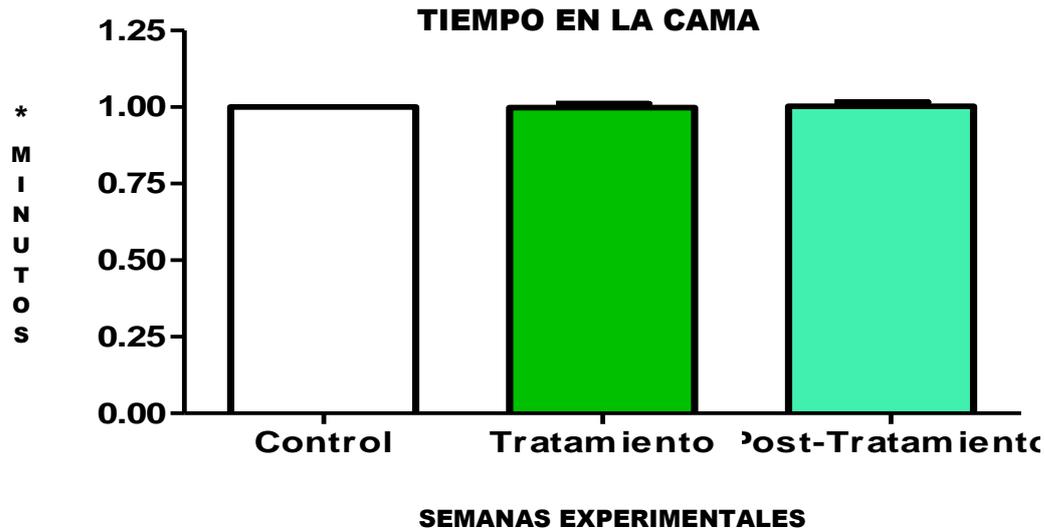
#### ***4.1. CUANTIFICACION ACTIVIDAD/INACTIVIDAD COMO VALORACION DEL SUEÑO/VIGILIA.***

Tras retirar los actiwacht de las muñecas de los individuos en estudio y analizar los parámetros obtenidos realizamos unas gráficas donde representamos los resultados del sueño de cada persona.

##### ***4.1.1. TIEMPO EN CAMA.***

Este valor viene determinado a partir del marcador de acontecimientos que deben realizar los individuos pulsando el botón que presenta el *Actiwatch*®, o de la agenda de sueño si los sujetos olvidaban pulsar el botón.

Tal como aparece en la Figura 21, en las tres semanas que duró el estudio no hubo diferencias significativas en el tiempo total que los sujetos experimentales pasaron en la cama.

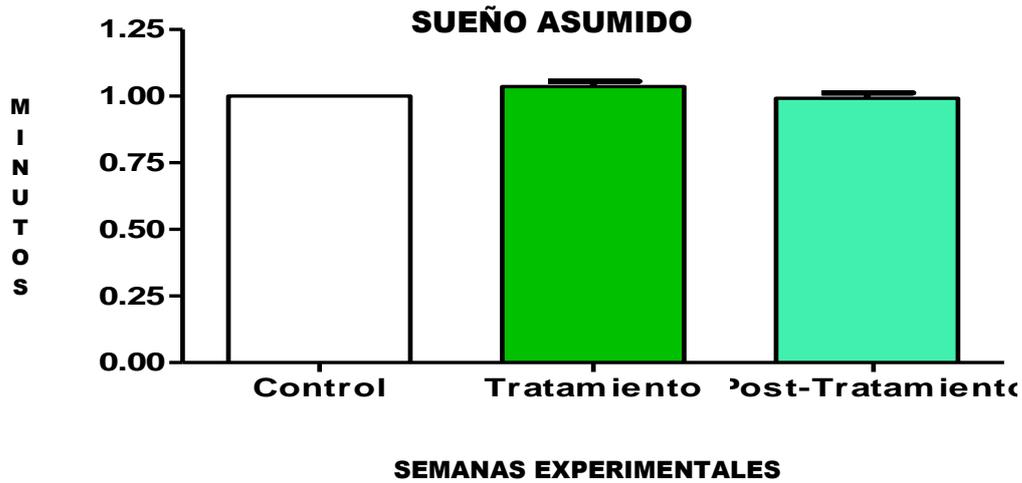


*Figura 21: Tiempo nocturno total, expresados en minutos, que los individuos pasaron en la cama a lo largo de todo el estudio: Los valores se expresan con respecto a la media del control (expresada y normalizada a 1). Control: primera semana (ingesta de 22,5 mg de Triptófano tanto en el desayuno como en la cena); Tratamiento: segunda semana (ingesta de 60 mg de Triptófano tanto en el desayuno como en la cena); Post-Tratamiento: dieta habitual. \*Relativizados a su propio control.*

#### 4.1.2. SUEÑO ASUMIDO.

Este valor representa el dato obtenido a través de la diferencia entre el final y el principio del sueño.

Al igual que con el tiempo en la cama, los individuos que participaron en el estudio no reflejaron cambios en su sueño asumido, el cual, representa la cantidad de tiempo que los sujetos experimentales pasan desde que se duermen hasta el que se despiertan incluyendo el número de despertares a lo largo de la noche (Figura 22).



*Figura 22: Tiempo de sueño asumido, expresados en minutos, que los individuos pasaron en la cama a lo largo de todo el estudio. Los valores se expresan con respecto a la media del control (expresada y normalizada a 1. Control: primera semana (ingesta de 22,5 mg de Triptófano tanto en el desayuno como en la cena); Tratamiento: segunda semana (ingesta de 60 mg de Triptófano tanto en el desayuno como en la cena); Post-Tratamiento: dieta habitual.*

#### 4.1.3. SUEÑO REAL.

Parámetro, determinado por algoritmos, que recoge la información determinada en minutos, medida a través de actimetría y es equivalente al tiempo de sueño asumido menos el tiempo de vigilia intrasueño.

Como se puede apreciar en la figura 23, durante la semana en la que los voluntarios tomaron cereales enriquecidos en *Triptófano* se produjo un aumento significativo del sueño real con respecto al cereal control.

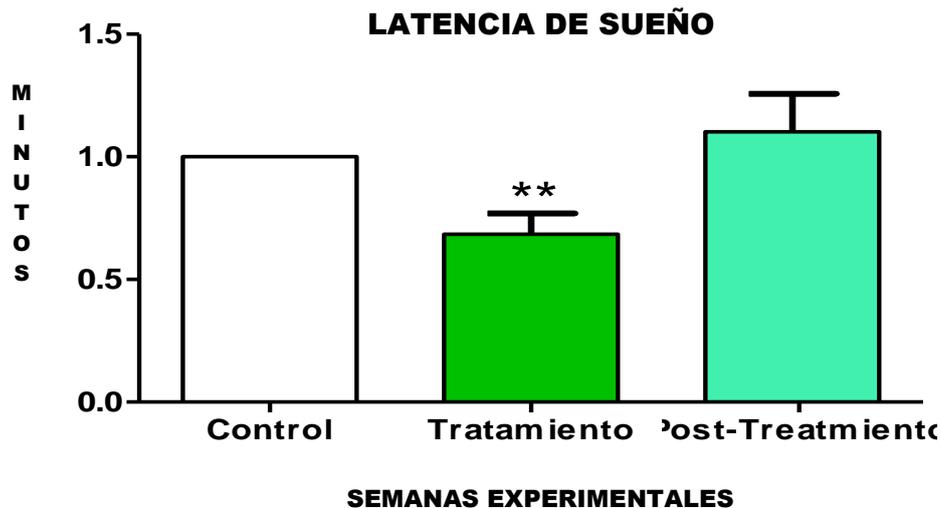


**Figura 23:** Tiempo de Sueño Real en minutos, que los voluntarios presentaron a lo largo de todo el estudio. Los resultados se expresan sobre la media del control (normalizada y expresada como 1. Control: primera semana (ingesta de 22,5 mg de Triptófano tanto en el desayuno como en la cena); Tratamiento: segunda semana (ingesta de 60 mg de Triptófano tanto en el desayuno como en la cena); Post-Tratamiento: dieta habitual. \*\*  $p < 0,01$  Control vs. Tratamiento.

#### 4.1.4. LATENCIA DE SUEÑO.

Representa el tiempo que transcurre desde que el individuo se acuesta hasta que comienza el sueño. Este parámetro nos indica el tiempo que tarda el individuo en dormirse.

La toma de cereales enriquecidos en *Triptófano* produjo una disminución de la latencia de sueño con respecto a la primera semana del estudio tal y como se expresa en la figura 24.

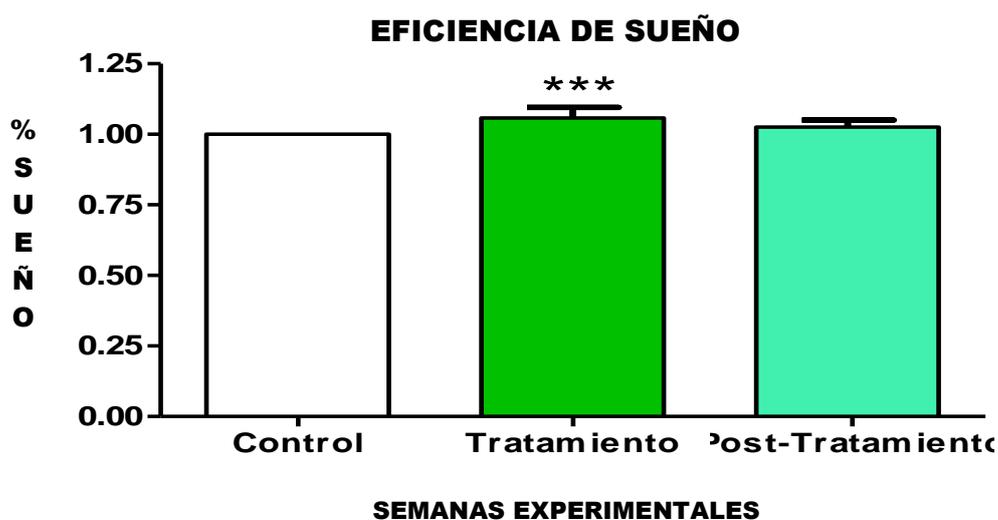


**Figura 24:** Tiempo de la latencia de sueño que los individuos presentaron a lo largo de las 3 semanas del estudio. Los resultados se expresan sobre la media del control (normalizada y expresada como 1. Control: primera semana (ingesta de 22,5 mg de Triptófano tanto en el desayuno como en la cena); Tratamiento: segunda semana (ingesta de 60 mg de Triptófano tanto en el desayuno como en la cena); Post-Tratamiento: dieta habitual.  $**P < 0,01$  Control vs. Tratamiento.

#### 4.1.5. EFICIENCIA DE SUEÑO.

Este parámetro expresa el porcentaje de tiempo de sueño mientras el sujeto permanece en la cama. Es decir, de todo el tiempo que el individuo permanece acostado, cuánto sueño ha realizado. La eficiencia de sueño se determinó al hallar el cociente entre las horas de sueño nocturno y el periodo de tiempo que el paciente permaneció en la cama, expresándose dichos parámetros en porcentaje de sueño.

Como se refleja en la figura 25 la eficiencia de sueño se vio incrementada tras una semana de ingesta de cereales enriquecidos en *Triptófano* tanto en el desayuno como en la cena.

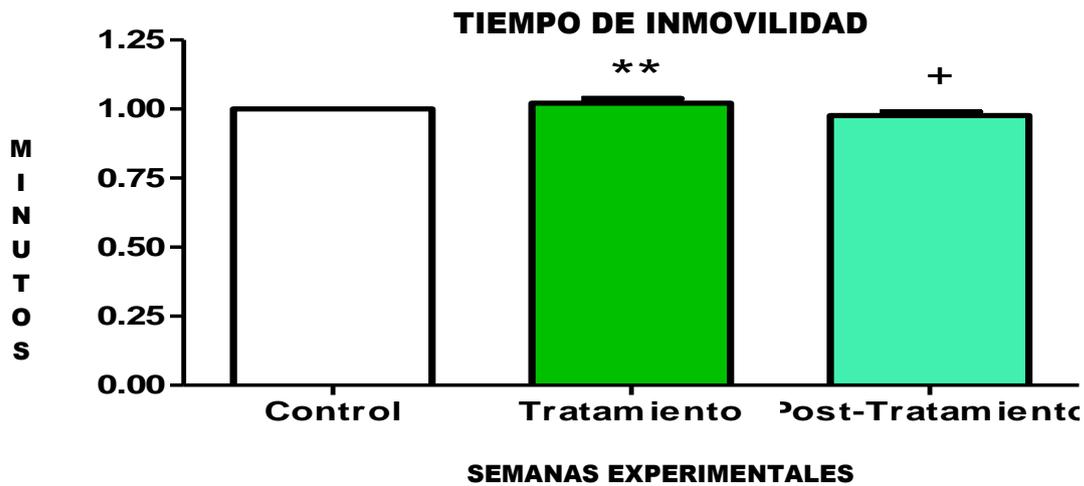


*Figura 25: Eficiencia de sueño, expresado en porcentajes, que los sujetos experimentales mostraron a lo largo del estudio. Los valores se expresan sobre el valor medio del control (expresado y normalizado como 1. Control: primera semana (ingesta de 22,5 mg de Triptófano tanto en el desayuno como en la cena); Tratamiento: segunda semana (ingesta de 60 mg de Triptófano tanto en el desayuno como en la cena); Post-Tratamiento: dieta habitual. \*\*\*  $p < 0,001$  Control vs. Tratamiento.*

#### **4.1.6. TIEMPO DE INMOVILIDAD.**

El software de análisis de sueño presenta este valor como el número total de minutos en los que el sujeto tiene una movilidad cero, hecho que se asume como sueño.

La ingesta de cereales enriquecidos en *Triptófano* produjo un aumento significativo respecto al cereal control. Asimismo, al término de la ingesta de los cereales, es decir, cuando los sujetos volvieron a su dieta habitual, el tiempo de inmovilidad disminuyó con respecto al tratamiento y fue similar al control (Figura 26).

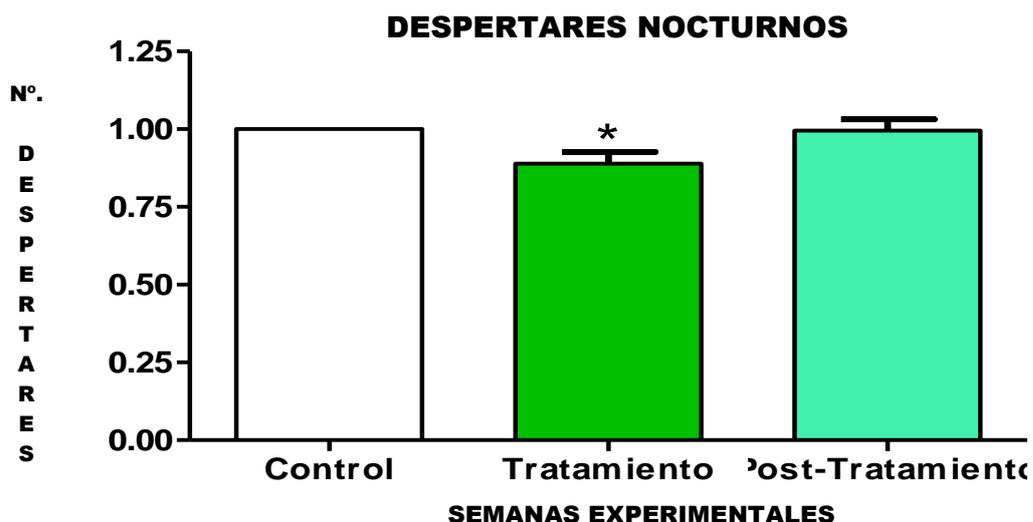


**Figura 26:** Tiempo de inmovilidad que los sujetos mostraron en las distintas semanas del estudio. Los valores se expresan sobre el valor medio (expresado y normalizado como 1). Control: primera semana (ingesta de 22,5 mg de Triptófano tanto en el desayuno como en la cena); Tratamiento: segunda semana (ingesta de 60 mg de Triptófano tanto en el desayuno como en la cena); Post-Tratamiento: dieta habitual. \* $p < 0.05$  Control vs. Tratamiento; + $p < 0,05$  Tratamiento vs. Post-Tratamiento.

#### 4.1.7. DESPERTARES.

El número de despertares o Fase D obtenidos mediante actimetría representa el número de episodios de vigilia a lo largo de las noches.

Durante la toma de cereales enriquecidos en *Triptófano* en nuestra población de estudio, se observó una disminución en el número de episodios de movimiento, con respecto al cereal control, la semana en que las personas mayores tomaron estos cereales enriquecidos en triptófano (Figura 27).

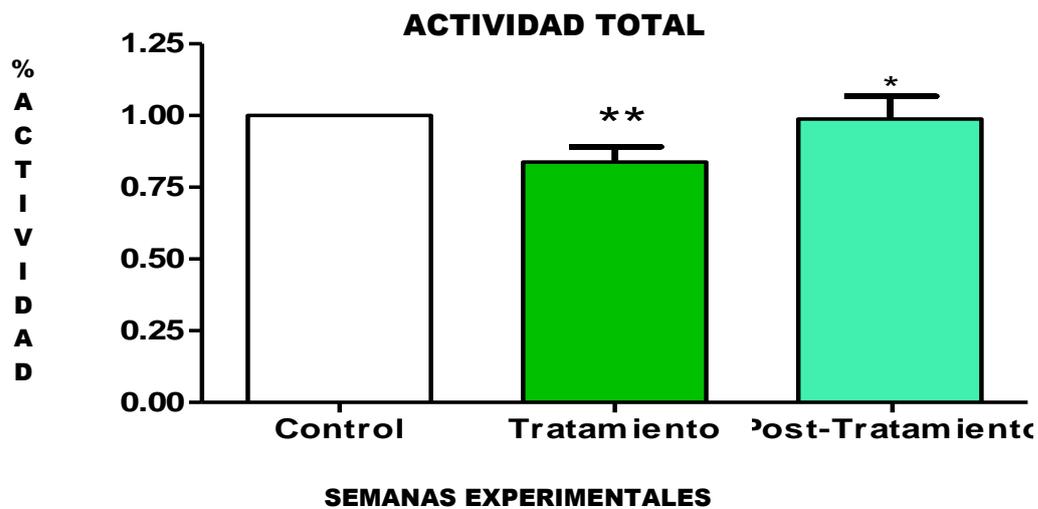


*Figura 27: Número de despertares por noche que los individuos presentaron durante las tres semanas del estudio. Los valores se expresan sobre el valor medio (normalizado y expresado como 1). Control: primera semana (ingesta de 22,5 mg de Triptófano tanto en el desayuno como en la cena); Tratamiento: segunda semana (ingesta de 60 mg de Triptófano tanto en el desayuno como en la cena); Post-Tratamiento: dieta habitual. \* $p < 0,05$  Control vs. Tratamiento.*

#### 4.1.8. ACTIVIDAD TOTAL.

El número total de movimientos realizados durante el sueño, recogidos mediante el actiwatch de muñeca, representa la actividad total durante el periodo nocturno. Es la medida de la intensidad, cantidad y duración del movimiento en todas las direcciones del espacio registradas durante el sueño. Cuanto mayor sea la actividad menor será la calidad de sueño

Tal y como se muestra en la figura 28, la semana de ingesta de cereales enriquecidos en *Triptófano* produjo un descenso en la actividad nocturna total con respecto al cereal control. Al término del estudio, la actividad nocturna se vio incrementada con respecto a la toma de cereales.

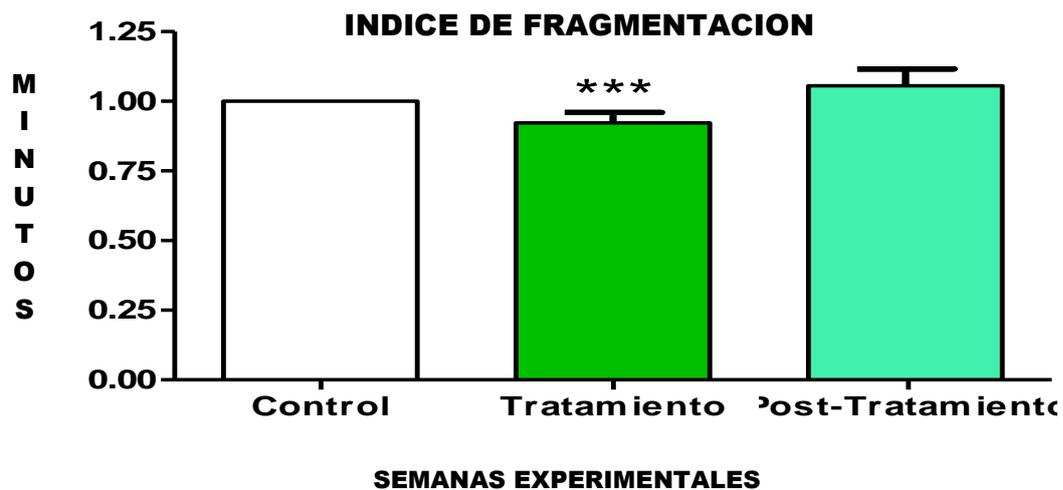


**Figura 28:** Actividad total que los voluntarios presentaron durante el estudio. Los valores se expresan con respecto al valor medio del control (normalizado y expresado como 1). Control: primera semana (ingesta de 22,5 mg de Triptófano tanto en el desayuno como en la cena); Tratamiento: segunda semana (ingesta de 60 mg de Triptófano tanto en el desayuno como en la cena); Post-Tratamiento: dieta habitual. \*\* $p < 0,01$  Control vs. Tratamiento; \* $p < 0,05$  Tratamiento vs. Post-Tratamiento.

#### 4.1.9. ÍNDICE DE FRAGMENTACIÓN DEL SUEÑO.

Este parámetro representa el resultado de sumar el tiempo de movilidad y el porcentaje de fases de inmovilidad de 1 minuto.

Es un indicador de la calidad del descanso. Tras una semana de ingesta de cereales enriquecidos en *Triptófano* se observó una reducción del Índice de Fragmentación en nuestra población de estudio (Figura 29).



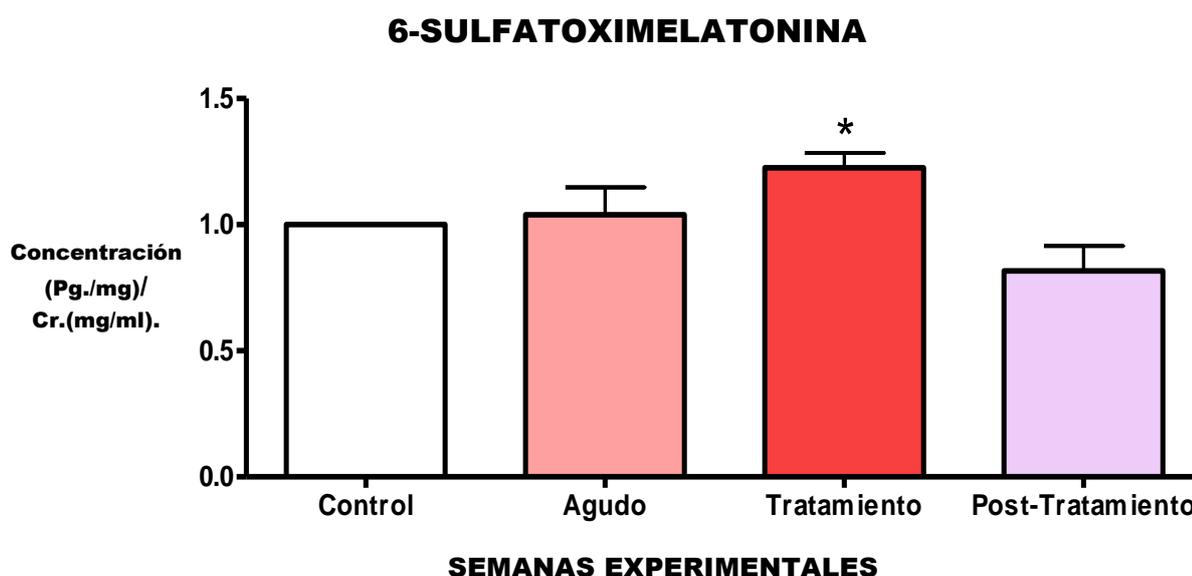
*Figura 29: Índice de fragmentación de los sujetos experimentales a lo largo del estudio. Los valores se expresan sobre el valor medio del control (expresado y normalizado como 1). Control: primera semana (ingesta de 22,5 mg de Triptófano tanto en el desayuno como en la cena); Tratamiento: segunda semana (ingesta de 60 mg de Triptófano tanto en el desayuno como en la cena); Post-Tratamiento: dieta habitual. \*\*\* $p < 0,001$  Control vs. Tratamiento.*

## 4.2. NIVELES DE MELATONINA A TRAVES DE SU METABOLITO DE EXCRECION URINARIA 6-SULFATOXIMNELATONINA.

Parte de la melatonina producida por la glándula pineal se metaboliza en hígado pasando a 6-hidroximelatonina y posteriormente a 6- sulfatoximelatonina que es excretada por la orina.

Administrando su precursor en un formato de cereales enriquecidos en Triptófano el objetivo del estudio fue aumentar los niveles de dicho indol en personas mayores. Este estudio se llevó a cabo para valorar si podría incrementar los niveles de Melatonina circulantes a través de los niveles de 6-sulfatoximelatonina, metabolito de excreción de la Melatonina tras la ingesta de cereales enriquecidos en Triptófano en personas mayores.

Los resultados obtenidos (Fig. 30) indican que en la fase aguda de la ingesta de cereales enriquecidos en Triptófano (60 mg de Triptófano tanto en el desayuno como en la cena) no parece haber cambios en la secreción de Melatonina. Sin embargo, tras 7 días de ingesta de estos cereales se produce un incremento significativo en los niveles urinarios de 6-sulfatoximelatonina en los sujetos de estudio con respecto a los niveles obtenidos en la orina correspondientes a la semana control (22,5 mg de Triptófano ingeridos tanto en el desayuno como en la cena). Esta medida indirecta evidencia una subida de los niveles plasmáticos del indol Melatonina en el organismo. Es decir, hemos conseguido que a través de la ingesta de cereales con Triptófano aparezca un incremento de Melatonina en personas mayores.



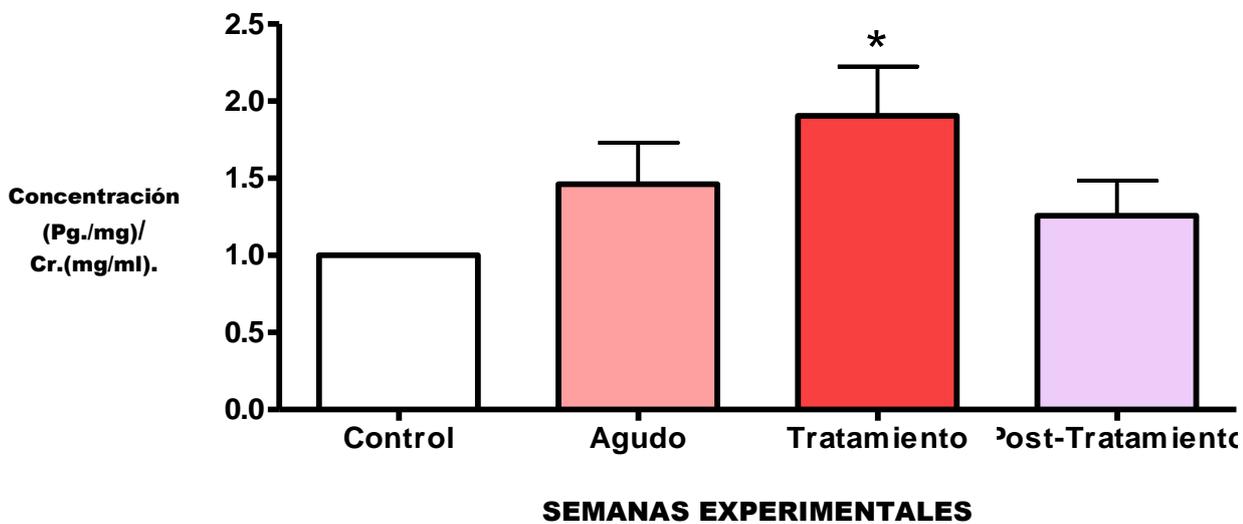
**Figura 30:** Niveles de 6-sulfatoximelatonina en (pg/mg)/(mg/ml) Cr. (metabolito urinario de la Melatonina) calculados como el ratio de los niveles del metabolito de excreción entre la cantidad de creatinina y expresados sobre la concentración control (normalizada y expresada con respecto a 1) en las primeras orinas de la mañana. Cada valor representa la media  $\pm$  la desviación estándar de un número de diez determinaciones realizado por duplicado. Control: primera semana (ingesta de 22,5 mg de Triptófano tanto en el desayuno como en la cena); Agudo: primer día de la semana de tratamiento (ingesta de 60 mg de Triptófano tanto en el desayuno como en la cena); Tratamiento: segunda semana (ingesta de 60 mg de Triptófano tanto en el desayuno como en la cena); Post-Tratamiento: dieta habitual. \*  $p < 0,05$  Control vs. Tratamiento.

### ***4.3. NIVELES DE SEROTONINA A TRAVÉS DE SU METABOLITO DE EXCRECIÓN URINARIO ÁCIDO 5 HIDROXINDOLACÉTICO (5-HIAA).***

La Serotonina es un neurotransmisor que interviene en gran cantidad de procesos biológicos. Debido al envejecimiento se produce una menor cantidad de este neurotransmisor, con lo cual aparecen trastornos asociados a la edad en la conducta alimentaria, estado de ánimo, la actividad motora, en procesos perceptivos y cognitivos e incluso alteraciones del reloj interno. Con la ingesta de cereales ricos en Triptófano quisimos valorar si los niveles de Serotonina podían incrementarse en personas mayores. Para ello se llevó a cabo su cuantificación mediante su metabolito de excreción en orina: el ácido 5-hidroxitriptófano (5-HIAA).

La toma de cereales enriquecidos en Triptófano produjo un incremento desde el primer día de toma en el metabolito urinario de Serotonina. Tras una semana de ingesta de los mismos los voluntarios muestran una subida con respecto a la primera semana. A través de este metabolito se pone de manifiesto un aumento de los niveles de Serotonina en personas mayores que consumieron los cereales con Triptófano (Figura 31).

### ÁCIDO 5-HIDROXINDOLACÉTICO



**Figura 31.** Niveles de 5-HIAA (ácido 5-hidroindolacético) en (pg/mg)/(mg/ml) Cr. Calculados como el ratio de los niveles del metabolito de excreción entre la cantidad de creatinina y expresados sobre la concentración control (normalizada y expresada respecto a 1) en muestras de orina recogidas a última hora de la tarde. Control: primera semana (ingesta de 22,5 mg de Triptófano tanto en el desayuno como en la cena); Agudo: primer día de la semana de tratamiento (ingesta de 60 mg de Triptófano tanto en el desayuno como en la cena); Tratamiento: segunda semana (ingesta de 60 mg de Triptófano tanto en el desayuno como en la cena); Post-Tratamiento: dieta habitual. \* $p < 0,05$  Control vs. Tratamiento.

## 4.4. ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL EN LAS MUESTRAS DE ORINA.

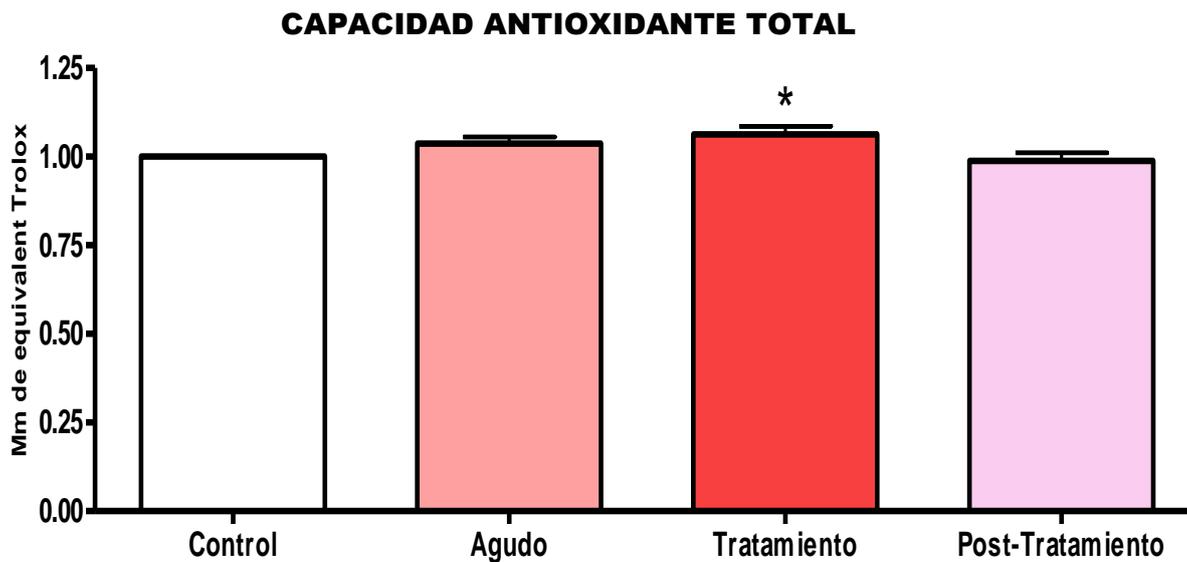
Con el avance de la edad se producen en el organismo cada vez una mayor producción de radicales libres causantes, entre otros factores, del envejecimiento. La actividad de dichos radicales se ve aumentada por una disminución en la capacidad de neutralización debido a la pérdida de secuestradores de radicales libres

La suma de los antioxidantes endógenos, más los de la dieta, representan el total de la actividad antioxidante del sistema. La cooperación entre los diferentes

antioxidantes produce una gran protección frente a los ataques del oxígeno activo o el nitrógeno de las especies, mucho más que si lo hiciera uno solo. Así, la capacidad antioxidante general puede proporcionar información biológica más pertinente comparada con la obtenida por la medida de un componente individual, por lo que consideraremos la acción de todos los antioxidantes presentes en el plasma y en los fluidos corporales.

La melatonina, indol con una potente acción anti-radical libre, incrementa sus niveles en el organismo tras la ingesta de triptófano. Por dicho motivo quisimos valorar si cereales enriquecidos con este aminoácido esencial podrían provocar un incremento de la capacidad antioxidante en los voluntarios participantes en el estudio.

Tal como se muestra en la Figura 32, la capacidad antioxidante aumenta significativamente tras una semana de consumo de cereales enriquecidos en triptófano. Se pone de manifiesto en nuestro ensayo, el papel antioxidante del indol melatonina a través de las muestras de orina recogidas a los voluntarios que participaron en nuestro estudio.



#### SEMANAS EXPERIMENTALES

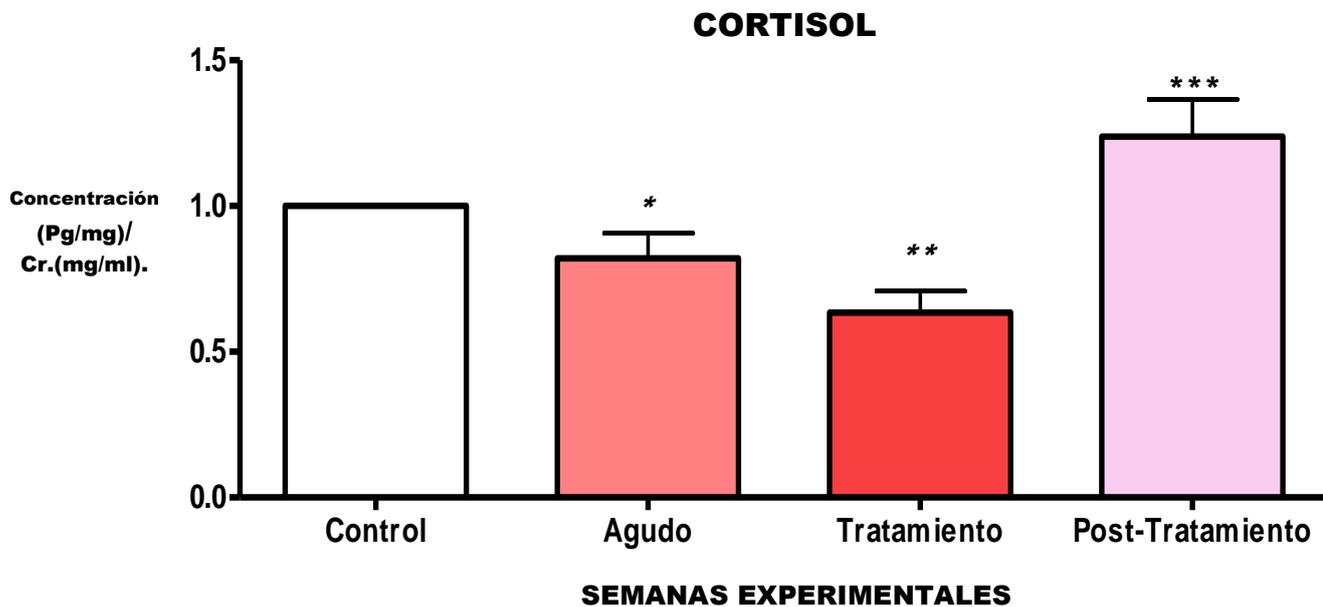
**Figura 32.** Niveles de capacidad antioxidante total en orina relativizados a la capacidad control (expresada y normalizada a 1) en la primera orina de la mañana. Control: primera semana (ingesta de 22.5 mg de triptófano tanto en el desayuno como en la cena); Agudo: primer día de la semana de tratamiento (ingesta de 60 mg de triptófano tanto en el desayuno como en la cena); Tratamiento: segunda semana (ingesta de 60 mg de triptófano tanto en el desayuno como en la cena); Post-Tratamiento: dieta habitual. \* $p < 0.05$  Control vs. Tratamiento.

## 4.5. NIVELES DE CORTISOL EN ORINA.

El estrés crónico modifica el biorritmo del cortisol, manteniendo valores altos durante la noche, lo que a su vez altera el biorritmo de la melatonina la cual, con su pico máximo entre las 2 y las 3 de la madrugada aproximadamente, induce la fase REM del sueño. La fase REM es la fase del sueño más profundo donde se “desconecta” y se produce la acción reparadora sobre el cansancio. En consecuencia, la alteración del biorritmo del cortisol que se produce con el estrés, con su asincronía y a través de su acción sobre el biorritmo de la melatonina, modifica el sueño y sobre todo la fase REM

del mismo, que afecta a su calidad y a su acción reparadora sobre el cansancio acumulado durante la jornada de trabajo.

Quisimos comprobar (Figura 33) si el aumento de melatonina nocturna y serotonina diurna, tras la ingesta de cereales enriquecidos con triptófano actuaban sobre la concentración de cortisol. Observamos como en la semana en la que no se ingería ninguna concentración de triptófano (semana post-tratamiento) el cortisol se elevaba muy significativamente en relación con la semana de de tratamiento, donde se ingería la mayor concentración de triptófano en nuestro estudio de manera muy significativa. Apreciamos también que durante la semana de tratamiento disminuía la concentración de cortisol matutino de manera significativa en comparación con la muestra de orina de la semana de control, donde aun a pesar de que se ingería triptófano en escasa cantidad, disminuía la concentración de cortisol diurno. Se prueba así que la ingesta de triptófano aumenta la concentración de melatonina nocturna disminuyendo el cortisol matutino elevado por el estrés con el que se inicia el día. También evidenciamos en el estudio que desde el primer día en el que se ingiere Triptófano (Orinas de Fase aguda) ya disminuyeron las concentraciones de cortisol.



**Figura 33:** Niveles de concentración de cortisol relativizados a la primera orina de la mañana de la semana control (expresada y normalizada a 1). Control: primera semana (ingesta de 22,5 mg de triptófano tanto en el desayuno como en la cena); Agudo: primer día del aumento de la ingesta de triptófano; Tratamiento: segunda semana (ingesta de 60 mg de triptófano tanto en el desayuno como en la cena); Post-Tratamiento: dieta habitual. \* $p < 0,05$  Agudo vs Post-Tratamiento \*\* $p < 0,01$  control vs tratamiento y \*\*\* $p < 0,001$  Tratamiento vs Post-Tratamiento.

## 4.6. ANÁLISIS DEL ESTADO PSICOLÓGICO DE LOS VOLUNTARIOS DURANTE LA REALIZACIÓN DEL ESTUDIO.

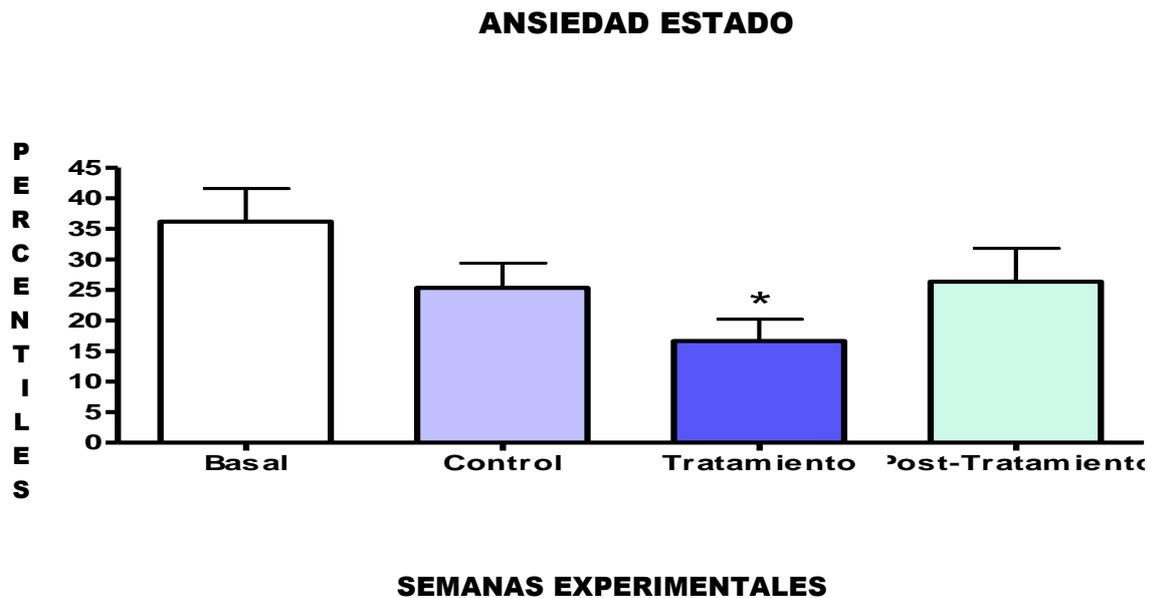
A medida que vamos envejeciendo nuestro organismo va perdiendo la capacidad de seguir adaptándose al entorno de una manera efectiva, ya que van mermando funciones fisiológicas básicas como es el sueño, la actividad motora, la función autoinmune, la secreción de melatonina, la sensación de sed. Todo ello hace que estemos mas predispuestos a padecer no solo enfermedades físicas si no psicológicas

como la depresión, la ansiedad, la distimia, patologías que están muy influenciadas tanto por factores externos como internos.

En nuestro estudio quisimos valorar de una manera objetiva si la mejoría del sueño con una dieta rica en triptófano mejora a su vez el estado de ánimo. Para ello realizamos unos cuestionarios psicológicos y los resultados obtenidos fueron los siguientes.

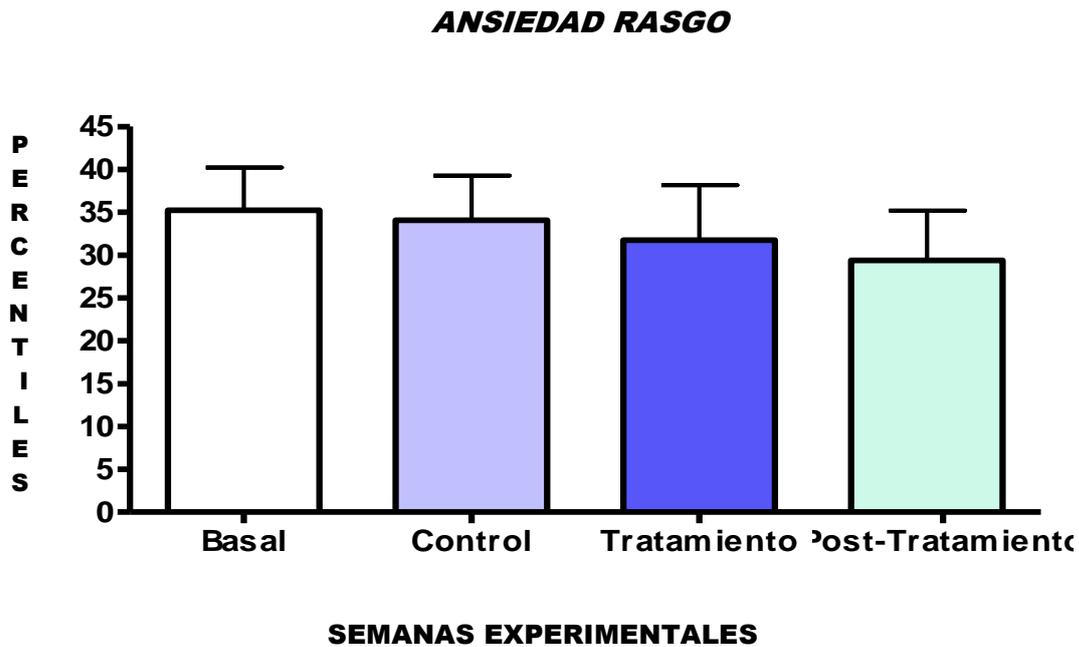
#### ***4.6.1. VALORACION DE LA ANSIEDAD DE LOS SUJETOS.***

El estudio psicológico de la ansiedad en los sujetos voluntarios que participaron en nuestro estudio revela en primer lugar que los participantes comenzaron el ensayo con un nivel de ansiedad inferior al percentil 50, con lo cual, su nivel de ansiedad no era considerado negativo pero si alto para el estado de ansiedad de los pacientes. Tras una semana de ingesta de cereales enriquecidos en triptófano, el nuestros resultados demuestran una disminución de la ansiedad como hecho subjetivo de percepción de los acontecimientos en ese momento con respecto al momento antes de empezar a realizar el ensayo, es decir la ansiedad disminuyo tras la toma de cereales (Figura 34).



*Figura 34.* Puntuación obtenida en el test de ansiedad STAI para la ansiedad estado, relativizadas a los percentiles para la población española. Basal: día antes de empezar el estudio. Control: primera semana (ingesta de 22,5 mg de triptófano tanto en el desayuno como en la cena); Agudo: primer día de la semana de tratamiento; Tratamiento: segunda semana (ingesta de 60 mg de triptófano tanto en el desayuno como en la cena); Post-Tratamiento: dieta habitual. \* $p < 0,05$  Basal vs. Tratamiento.

Con respecto al rasgo de ansiedad nuestros resultados muestran una mejora en las puntuaciones, pero no variaron significativamente. Es decir, disminuyó su tendencia a percibir las situaciones como amenazantes y a responder a esto con elevaciones en su estado de ansiedad durante la toma de cereales con respecto a su estado basal y a la semana post-tratamiento (Figura 34).



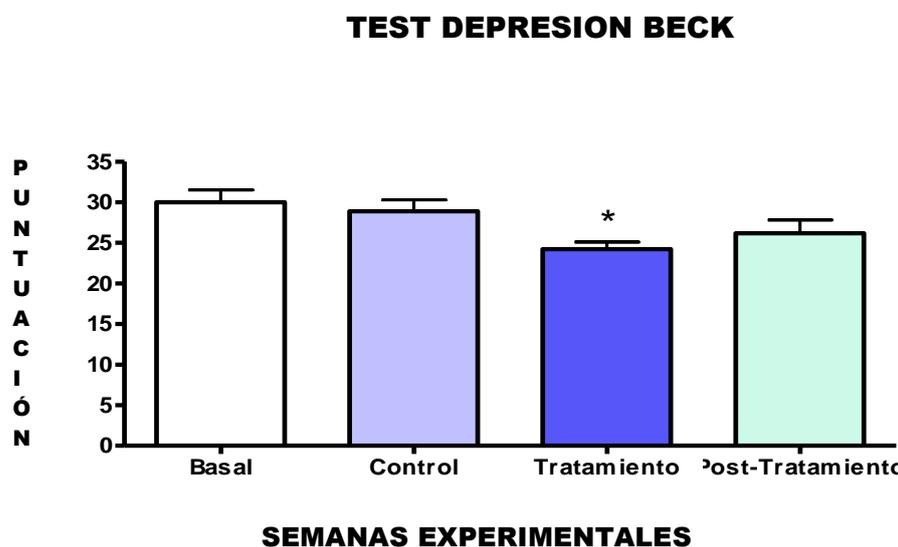
*Figura 35. Puntuación obtenida en el test de ansiedad STAI para la ansiedad rasgo, relativizadas a los percentiles para la población española. Basal: día antes de empezar el estudio. Control: primera semana (ingesta de 22,5 mg de triptófano tanto en el desayuno como en la cena); Agudo: primer día de la semana de tratamiento; Tratamiento: segunda semana (ingesta de 60 mg de triptófano tanto en el desayuno como en la cena); Post-Tratamiento: dieta habitual.*

#### **4.6.2. VALORACION DEL ESTADO DEPRESIVO DE LOS SUJETOS.**

Tras una semana de ingesta de cereales enriquecidos en triptófano se produce una bajada en la puntuación para el Test de Depresión de Beck en nuestra población de personas mayores con respecto a los resultados obtenidos en el estado basal y el tratamiento.

Este resultado (Figura 36) nos indica que la ingesta de los cereales mejoró el estado deprimido de los sujetos durante el estudio de investigación. Observamos también que este efecto de mejoría del estado de ánimo permaneció tras terminar la

ingesta de los cereales, aunque no de manera significativa con respecto al estado basal. Pudiera ser que el efecto serotoninérgico, o simplemente el efecto de bien estar durante la toma de cereales, permanezcan en la psique del individuo aun dejando de ingerir los cereales.



**Figura 36.** Puntuación obtenida en el Test de Depresión de Beck. Basal: día antes de empezar el estudio. Control: primera semana (ingesta de 22,5 mg de triptófano tanto en el desayuno como en la cena); Agudo: primer día de la semana de tratamiento; Tratamiento: segunda semana (ingesta de 60 mg de triptófano tanto en el desayuno como en la cena); Post-Tratamiento: dieta habitual. \* $p < 0,05$  Basal vs. Tratamiento.

## *5. DISCUSIÓN*

Resulta sorprendente como el hombre se ha adaptado al medio que nos rodea tan eficazmente. Hemos creado ritmos biológicos para acomodarnos a los cambios de luz/oscuridad, a los ciclos lunares, a los cambios climáticos. En definitiva a todos los cambios externos que nos rodean. Pero si son incuestionables y admirables por parte de nuestro entendimiento estas adaptaciones al medio externo, más aun lo son la capacidad de nuestro medio interno de utilizar los nutrientes según el momento del día, según la estación del año, para mejorar el sistema inmune, reparar y proteger, eliminar materiales tóxicos (radicales libres), consolidar la memoria y mejorar la inteligencia y el aprendizaje, liberar hormonas como Melatonina o Serotonina según necesitemos, realizar reposo de todos los procesos metabólicos.

Para ello nuestra fisiología tiene que tener momentos de actividad y momentos de reposo o recuperación, lo que se produce durante la fase nocturna en los humanos y los cuales son esenciales para que las funciones propias de la fase diurna se lleven a cabo eficientemente y tener unos ritmos circadianos que refuercen el estado de salud en el organismo (Barriga y cols., 2005; Madrid y Rol de Lama, 2006).

No obstante todos estos procesos tiene un fin, es decir, que a medida que van pasando los años nuestro entorno permanece, pero nuestros mecanismos fisiológicos van deteriorándose por lo que empezarán a ser defectuosos y decrecerá la calidad de los ritmos circadianos en la tercera edad (Gilliam, 2009; Monjan, 2010), debido a una menor amplitud y un adelanto de fase de los mismos (Van Someren, 2000). No por ello el envejecimiento, al que todos los animales estamos sometidos, debe ser tedioso y lleno de incertidumbre, sino que podemos intentar mejorar nuestra senectud adaptando nuestra alimentación a ese imparable proceso.

Una de las hormonas que durante el envejecimiento se va perdiendo es la melatonina, de hecho, cambia su producción a lo largo de la vida, presentando sus niveles más bajos en la vejez. Este fenómeno, en gran parte, responsable de la aparición de la cronosenescencia, definida como el empeoramiento de los ritmos biológicos asociado al envejecimiento (Sánchez-Barceló y cols., 2010). Muchos de los problemas del envejecimiento se han corregido a través de la crononutrición. De hecho estudios previos han mostrado evidencias de que el aminoácido triptófano, precursor del neurotransmisor serotonina y del indol melatonina, han resultado satisfactorios a la hora de tratar alteraciones en ritmos circadianos como son el ritmo sueño/vigilia, la capacidad fagocítica, la disminución en los niveles de radicales libres y una mejor viabilidad frente al estrés oxidativo tal y como se ha comprobado en aves, roedores y humanos como consecuencia de la ingesta de triptófano o melatonina (Delgado y cols., 2013). Además la melatonina presenta una acción antitumoral en células leucémicas cultivadas *in vitro* (Bejarano y cols., 2009) consolidando aún más la importancia de este indol para la salud (Cubero y cols., 2007; Sánchez y cols., 2008; Paredes y cols., 2009). Por lo tanto y viendo el ritmo de envejecimiento de la población y las condiciones en las que muchas veces se llega, surgió de nuestro departamento la idea de evidenciar como con una ingesta de aminoácido triptófano a una concentración óptima y a horas determinadas del día, podíamos mejorar de una u otra manera nuestro medio interno y actúan sobre él.

La administración de triptófano para mejorar la concentración de serotonina y melatonina en sangre ha sido mostrada en numerosos estudios llevados a cabo en suero, plasma y orina. Esto se evidencia de manera indirecta por el incremento en los niveles de los metabolitos urinarios de ambas aminas biógenas tras una semana de consumo de cereales enriquecidos en triptófano tal y como se ha comprobado en investigaciones

anteriores con resultados similares (Delgado y cols., 2012; González-Flores y cols., 2012). Asimismo, se ha observado que la eliminación del triptófano en la dieta deriva en alteraciones del sueño incrementando el periodo de latencia y la fragmentación del mismo (Arnulf y cols., 2002). Concretamente, las dietas enriquecidas en triptófano han sido capaces de incrementar la cantidad y la calidad del sueño en recién nacidos (0-6 meses) que padecían problemas de sueño (más de 3 despertares nocturnos en una noche). Así, nuestro grupo de investigación observó que la concentración de Triptófano dada era exitosa para actuar en las alteraciones del sueño nocturno (Cubero y cols., 2009). Por ello, el desarrollo del presente trabajo se llevó a cabo para valorar si la administración de cereales enriquecidos en triptófano tanto en el desayuno como en la cena a personas mayores ( $62 \pm 4,1$  años) con problemas de conciliación y de consolidación del sueño podría actuar aumentando la calidad de sueño nocturno y así mejorar el periodo de vigilia.

Para observar la mejoría del sueño nocturno, en nuestra población utilizamos la actimetría que es una técnica no invasiva que permite trabajar con una muestra grande en este tipo de ensayos, dando información suficiente para evaluar si una dieta mejora el ritmo circadiano actividad/inactividad (Ancoli-Israel y cols., 2003; Adamec y cols., 2010). Es una técnica validada y aceptada que permite estudiar el sueño nocturno y que está ampliamente referenciada (Martin y Hakim, 2011). Este método ha sido muy utilizado para determinar alteraciones en el sueño real, eficiencia de sueño, latencia de sueño, despertares y fragmentación del sueño en personas mayores (Huang y cols., 2002).

La mayoría de los parámetros nocturnos evaluados por actimetría mejoraron en los sujetos experimentales aquejados de problemas de sueño, incluidos aquellos que ya habían sido descritos con anterioridad como alteraciones propias de la vejez (Huang y cols., 2002). Este hecho es debido a que al introducir una pequeña cantidad de triptófano en la dieta habitual de los sujetos los niveles de serotonina diurnos y melatonina nocturnos mejoraron la vigilia y el sueño respectivamente siendo este más placentero y reparador. Así mismo se observa una disminución de la latencia de sueño, periodo en el cual se producen o inician muchas alteraciones en las demás fases del sueño. La mejoría del sueño recogida en nuestro estudio puede deberse al incremento de los niveles de serotonina y melatonina en el cerebro. De hecho, cuando se midieron en la orina los metabolitos de la serotonina (5-HIAA) y de la melatonina (6-sulfatoximelatonina), éstos aparecieron incrementados tras la ingesta de triptófano tanto en el desayuno como en la cena.

No obstante, sumamos la positividad para nuestro organismo de la ingesta de concentraciones de triptófano cuantificando en orina la concentración de antioxidantes, dándonos unos resultados más que esperanzadores en cuanto a la posibilidad de detoxificar el organismo de radicales libres que tan nocivos son para nosotros. La melatonina funciona a través de numerosas vías para reducir el estrés oxidativo. Las evidencias experimentales apoyan sus acciones como secuestrador directo de radicales libres (Hardeland y cols., 1993; Alegra y cols., 2003), como un antioxidante indirecto cuando estimula las enzimas antioxidantes (Reiter y cols., 2000; Rodríguez y cols., 2004), su estimulación de la síntesis de glutatión (Urata y cols., 1999) (un antioxidante intracelular esencial), su habilidad para aumentar la actividad de otros antioxidantes (o viceversa) (Gitto y cols., 2001), su protección de enzimas antioxidante del daño oxidativo (Mayo y cols., 2002; 2003 a, b) y su habilidad para incrementar la eficacia en

la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Acuña-Castroviejo y cols., 2002; Okatani y cols., 2003).

Sumamos también a esta tesis el estudio del cortisol en orina para investigar con objetividad, si disminuye su concentración en orina tras la ingesta de triptófano. De esta forma intentamos evidenciar si una dieta rica en este aminoácido, y más concretamente adecuando su ingesta al ciclo de luz/oscuridad, pueden mejorar la concentración de cortisol, actuando así sobre el estado de ánimo que produce el estrés en toda su extensión. La concentración de cortisol no vale de nada si no sabemos a que hora del día se recoge la muestra. En nuestro estudio las muestras de orina se recogieron a primera hora de la mañana y eran siempre las primera orina al levantarse. A pesar de que la mejor manera de saber si el estrés, la ansiedad o la depresión están influenciadas por el cortisol pudiera ser la medida del cortisol durante 24h., nosotros recogimos solo la primera orina de la mañana, para intentar demostrar que realmente un sueño, tras ingesta de triptófano nocturno, mejora la concentración de cortisol matutino, disminuyendo así el estrés que el insomnio pueda producir.

La melatonina inhibe la expresión de genes circadianos en la glándula suprarrenal de ratas y primates adultos (Valenzuela y cols., 2008) y también la producción de cortisol estimulada por ACTH (Torres-Farfán y cols., 2004). Este efecto inhibitorio de melatonina sobre la producción de cortisol estimulada por ACTH también está presente en la suprarrenal humana (Campino y cols., 2008, Campino y cols., 2011). En humanos, los ritmos circadianos de melatonina y de cortisol en plasma tienen fases opuestas, es decir el alza nocturna de melatonina coincide con los valores bajos del ritmo de cortisol y viceversa (Weibel y Brandenberger, 2002), Por otra parte, la supresión aguda de melatonina producida por una breve exposición a luz brillante al

final de la noche se asocia con un alza brusca del cortisol plasmático y salival (Leproult y cols., 2001), por lo tanto los investigadores concluyeron tras largos experimentos que la glándula suprarrenal humana expresa el receptor MT1 y un efecto agudo de la melatonina disminuye la producción de cortisol estimulada por ACTH (Campino1a y cols., 2008).

El biorritmo normal del cortisol tiene un máximo de secreción a las 8-9 de la mañana. Es precisamente este pico el que nos despierta. A partir de este momento cae bruscamente, de forma que a las 12 del mediodía ya se encuentra a unos niveles por debajo de la mitad del basal y a las 11-12 de la noche tiene unos valores muy bajos del orden 1/10- 1/20 de los valores máximos de la mañana, siendo precisamente estos niveles bajos los que contribuyen a la secreción de Melatonina y a la aparición del sueño. El estrés crónico modifica el biorritmo del cortisol, manteniendo valores altos durante la noche, lo que a su vez, altera el biorritmo de Melatonina la cual, con su pico máximo entre las 2 y las 3 h de la madrugada aproximadamente, induce la fase REM del sueño. La fase REM es la fase del sueño más profundo donde se “desconecta” y se produce la acción reparadora sobre el cansancio. En consecuencia, la alteración del biorritmo del cortisol que se produce con el estrés, con su asincronía y a través de su acción sobre el biorritmo de la melatonina, modifica el sueño y sobre todo la fase REM del mismo, que afecta a su calidad y a su acción reparadora sobre el cansancio acumulado durante la jornada de trabajo.

Nosotros hemos evidenciado como con, relativamente pequeñas concentraciones de triptófano, no solo aumenta la melatonina, si no que disminuye la concentración de cortisol matutino, por lo que hemos de pensar que el sueño ha sido reparador. Esta consideración es observable cuando vemos como durante la etapa de control, donde hay

una pequeña cantidad de triptófano ya existe una concentración menor de cortisol con respecto a la etapa de post tratamiento donde no hay ingesta de triptófano. Esta bajada de Cortisol se manifiesta más en la etapa de tratamiento donde se hace más evidente si cabe, la disminución de cortisol.

Por lo tanto podemos aseverar que una alimentación rica en triptófano mejora el pico de secreción matutino de cortisol, seguramente por la mejora de la calidad del sueño y más aun, si esta alimentación rica en triptófano la mantenemos durante el día, donde los niveles de serotonina aumentan. De esta manera mejoraremos la secreción de cortisol y evitaremos los efectos secundarios de un exceso de esta sustancia.

No obstante no nos quedamos en hechos meramente analíticos, sino que queríamos saber que sentían y como se encontraban los voluntarios del estudio. Para ello utilizamos dos test para determinar si el estado emocional de los individuos de estudio variaba. Utilizamos el Test STAI de estado/rasgo para valoración de la ansiedad elaborado por Spielberger y colaboradores en 1970. Las propiedades psicométricas de este test han sido extensamente analizadas en relación con la consistencia interna, la fiabilidad test-retest y la obtención de diferentes evidencias de validez (Virella y cols., 1994; Suzuki y cols., 2000; Vigneau y Cormier, 2008; Mystakidou y cols., 2009; Vautier y Pohl, 2009; Bados y cols., 2010; Guillén-Riquelme y Buéla-Casal, 2011) y el Cuestionario de Beck para la Depresión (Beck y cols., 1961) el cual evalúa fundamentalmente los pensamientos intrusivos de la depresión y síntomas clínicos de la misma, evitando los relacionados con ansiedad y síntomas motores, es un autoinforme que proporciona una medida de la presencia y de la gravedad de la depresión en adultos y adolescentes de 13 años o más. Nuestros resultados fueron muy gratificantes ya que observamos como mejoraban la ansiedad y la depresión en la última semana de

tratamiento. Pudiera ser por la mejora subjetiva del sueño al elevar los niveles de melatonina además de por el aumento de serotonina diurna que mejoraron el estado de ánimo de la muestra de estudio

En resumen podemos decir que una dieta equilibrada, fundamentada en la crononutrición, nos ayudará en cada momento de nuestra vida a mejorar los estados carenciales que en cada momento puedan aparecer. De hecho nosotros hemos puesto de manifiesto como ingiriendo cereales ricos en triptófano se puede actuar sobre la secreción de melatonina, serotonina, cortisol, aumentar la secreción de antioxidantes en orina y mejorar el estado de ánimo.

Por lo tanto, nuestros datos apoyan la idea de que la ingesta de los alimentos debe de estar en concordancia con la cronobiología, apoyando el concepto de Crononutrición. Queremos insistir en el hecho de que la mejora en el sueño de los individuos que tomaron los cereales fue obtenida por una ingesta de nutrientes apropiados durante la noche y el día y no por ningún componente farmacológico

Finalmente señalar la apertura a nuevos mercados que presenta la ingesta de estos cereales durante la noche y el día, porque evidentemente hay muchos colectivos que presentan problemas de sueño. De hecho, mujeres menopáusicas, adultos en situaciones de estrés, niños y adultos con enfermedades neurodegenerativas o ancianos, son poblaciones con graves problemas de sueño, existiendo además la peculiaridad en estos colectivos de presentar un descenso en los niveles circulantes de serotonina y melatonina.

## **6. CONCLUSIONES**

De la administración de cereales enriquecidos con Triptófano (60 mg de triptófano tanto en el desayuno como en la cena) a personas mayores podemos concluir que:

1. La ingesta de cereales enriquecidos en Triptófano es capaz de modificar el sueño nocturno, provocando un aumento del tiempo de sueño real, una mejoría en la eficiencia del mismo y un incremento en el tiempo en que los individuos permanecen inmóviles en la cama.
2. La latencia de sueño, los despertares nocturnos, la actividad total y la fragmentación del sueño disminuyen tras la ingesta de cereales enriquecidos en Triptófano.
3. Los niveles diurnos del ácido 5-hidroxiindolacético, metabolito de excreción del neurotransmisor Serotonina, se vieron incrementados tras una semana de ingesta de cereales enriquecidos en Triptófano.
4. Tras una semana de ingerir los cereales enriquecidos en Triptófano se produce un incremento en los niveles de 6-sulfatoximelatonina, metabolito de excreción del indol Melatonina.
5. Los niveles de la capacidad antioxidante total, medido en las muestras de orina de nuestra población de personas mayores, se vieron incrementados tras una semana de ingesta de cereales enriquecidos en triptófano.

6. La ingesta del aminoácido Triptófano disminuyó la concentración de cortisol urinario vespertino.
  
7. Los cereales con un mayor contenido en triptófano mostraron un efecto ansiolítico y antidepresivo sobre las personas que participaron en nuestro estudio.

Los resultados aquí presentados apoyan la idea de que a través de la Crononutrición podemos ejercer un efecto restaurador y reversible sobre los ritmos circadianos que se encuentran alterados en la cronosenescencia.

## ***7. BIBLIOGRAFIA***

- Acuña Castroviejo D., Carazo A., Leon J., Khaldy H., Reiter R.J. Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases. *Currents Topics in Medicinal Chemistry*. 2:133-151, 2002.
- Acuña-Castroviejo D., Escames G., Reiter R.J. Melatonin therapy in fibromyalgia. *Journal Pineal Research*. 40:98-99, 2006.
- Adamec O., Domingues A., Paiva T., Sanches J.M. Statistical characterization of actigraphy data during sleep and wakefulness states. *Conference Proceedings IEEE Engineering of Medicine and Biology Society* 15: 2342–2345. 2010.
- Aldhous M., Franey C., Wright J. Plasma concentrations of melatonin in man following oral absorption of different preparations. *British Journal of Clinical Pharmacology*; 19:517-521. 1985.
- Alegra E., Díaz A., Sofía López A., Úriz M., Murillo O., Melero I., González Á. Indoleamine 2,3-dioxygenase: From tolerance during pregnancy to cancer. *Inmunología.net*. 24 20-27. 2003.
- Alonso-Fernández F. Diagnosis and subdiagnosis of depression. *Annuity Medical of Psychology (Paris)*: 151: 23-32. 1993.
- Ancoli-Israel S., Cole R., Alessi C., Chambers M., Moorcroft W., Pollak C.P. The role of actigraphy in the study of sleep and circadian rhythms. *Sleep* 26 (3): 342–392. 2003.
- Arendt J. Melatonin and the mammalian pineal gland. Chapman Hall (Ed.) 1995.
- Arendt J., Skene D.J. Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Medical Revisit*. 9: 25-39. 2005.
- Arnulf I., Quintín P., Álvarez J.C., Vigil L., Toitou Y., Lèbre A., Varagaux O., Derenne J.P., Allilair J.F., Benkelfat C.H., Leboyer M. Mid-morning tryptophan depletion delays REM sleep onset in healthy subjects. *Neuropsychopharmacology*. 27: 843-851. 2002.
- Arora R.C., Kregel L., Meltzer H.Y. Circadian rhythm of serotonin uptake in blood platelets of normal controls. *Biological Psychiatry*. 19(11):1579-1584, 1984.

- Axelrod J., Quay W.B. and Baker P.C. Enzymatic synthesis of the skin-lightening agent, melatonin, in amphibians. *Nature*. 208(8): 386-390. 1965.
- Barrett P., Morris M., Choi W-S., Ross A., Morgan P.J. Melatonin Receptors and Signal Transduction Mechanisms. *Biological Signals Receipt*; 8: 6-14. 1999.
- Barriga C., Madrid J.A., Terrón M.P., Rial R.V., Cubero J., Paredes S.D., Sánchez S., Rodríguez A.B. The pineal gland: Functional connection between melatonin and immune system in birds”. *Biogenic Amines*, 18: 147-176, 2004.
- Barriga C., Rodríguez A.B., Esteban S., Rial R.V. Interrelaciones entre el sueño y el estado inmune. *Revista de Neurología*. 40(9): 548-556. 2005.
- Bados A., Gómez-Benito J. Balaguera G. The State-Trait Anxiety Inventory, Trait Version: does it really measure anxiety? *Journal of Personality Assessment*, 92, 560-567. 2010.
- Baumer F.M., Howe M., Gallelli K., Simenova D.I., Hallmayer J., Chang K.D. A pilot Study of Antidepressant-Induce Mania in Pediatric Bipolar Disorder: Characteristics, Risk Factors, and the Serotonin Transporte Gene. *Biological Psychiatry*. 60:1005-1012, 2006.
- Beck A.T., Ward C.H., Mendelson M., Mock J., Erbaugh J. An inventory for measuring depression. *Archives of General Psychiatry*. 4:561–71. 1961.
- Bejarano I., Redondo P.C., Espino J., Rosado J.A., Paredes S.D., Barriga C., Reiter R.J., Pariente J.A., Rodríguez A.B. Melatonin induces mitochondrial-mediated apoptosis in human myeloid HL-60 cells. *Journal of Pineal Research*. 46: 392–400. 2009.
- Belmaker R.H., Agam G. Major depressive disorder. *New England Journal Medicine*; 358: 55-68. 2008.
- Bernetó A. Trastornos del sueño en el anciano. *Epidemiología. Universidad del sueño. Servicio de neurofisiología clínica. Hospital universitario la FE. Valencia. España. Revista Neurología*; 30 (6); 581-586. 2000.

- Bliwise D.L., Kryger M.H, Roth T., Dement W.C. Principles and Practice of Sleep Medicine. Philadelphia: WB Saunders. 249. 1989.
- Bjorvatn B., Pallesen S. A practical approach to circadian rhythm sleeps disorders. *Sleep Medicine Rev.* (13: 47-60). 2009.
- Brydon L., Roka F., Petit L., de Coppet P., Tisot M., Barrett P., Morgan P.J., Nanoff C., Strosberg A.D., Jockers R. Dual signalling of human Mel1a melatonin receptors via G(i2), G(i3), and G(q/11) proteins. *Molecular Endocrinal.* 13:2025-2038, 1999a.
- Brydon L., Petit L., de Coppet P., Barrett P., Morgan P.J., Strosberg A.D., Jockers R. Polymorphism and signalling of melatonin receptors. *Reproduction Nutrition Development.* 39:315-324, 1999b.
- Boullosa O., López-Mato A., Cetkovich B. Ciprian-Olliver J. Actualización en serotonina. *Alcmeon, Revista Argentina de Neuropsiquiatría.* 2 (3): 327-36. 1992.
- Boylan C.B., Blue M.E., Hofmann C. Modeling early cortical serotonergic deficits in autism. *Behavioural Brain Research.* 176:94-108. 2007.
- Brzezinski A. Melatonin in humans. *New England Journal Medicine.* 336. 186-95.1997.
- Buceta J., Bueno A. Control del estrés y trastornos asociados. Madrid: Editorial Dykinson, *Psicología y salud.* 1995.
- Cabrera J., Negrin G., Estevez F., Loro J., Reiter R.J., Quintana J. Melatonin decreases cell proliferation and induces melanogenesis in human melanoma SK-MEL-1 cells. *Journal Pineal Research.* 49: 45-54. 2010.
- Cagnacci A., Cannoletta M., Renzi A., Baldassari F., Arangino S., Volpe A. Prolonged melatonin administration decreases nocturnal blood pressure in women. *American Journal of Hypertension.* 18: 1614-1618. 2005.
- Cahill M., Besharse H. Circadian Melatonin Rhythms in Cultured Zebrafish Pineals Are Not Affected by Catecholamine Receptor Agonists. *General and Comparative Endocrinology.* 105: 270-275. 1997.

- Campino C., Valenzuela F., Arteaga E., Torres-Farfán C., Trucco C., Velasco A. Melatonin reduces cortisol response to ACTH in humans. *Revista Médica de Chile*. 136: 1390-1397. 2008.
- Campino C., Valenzuela F.J., Torres-Farfán C., Reynolds H.E., Abarzúa-Catalán L., Arteaga E. Melatonin exerts direct inhibitory actions on ACTH responses in the human adrenal gland. *Hormones and Metabolism Research*. 43: 337-342. 2011.
- Carbajo-Pescador S., Steinmetz C., Kashyap A., Lorenz S., Maurizl J.L., Heise M., Galle P.R., Gonzalez-Gallego P., Strand S. Melatonin induces transcriptional regulation of Bim by FoxO3a in HepG2 cells. *British Journal of Cancer*. 108, 442–449. 2013.
- Cardinali D.P., Jordá J.J., Sánchez-Barceló J.E. *Introducción a la Cronobiología: Fisiología de los ritmos biológicos*. Servicio de Publicaciones Universidad de Cantabria/Caja Cantabria. Santander. 1994.
- Cardinali D.P. *Neurociencia aplicada: sus fundamentos*. Editorial Panamericana. 2007.
- Campino C., Valenzuela F., Arteaga E., Torres-Farfán C., Trucco C., Velasco A., Guzmán S., Serón-Ferré M. Melatonin reduces cortisol response to ACTH in humans. *Revista Médica Chile*; 136: 1390-1397. 2008.
- Carlson H.C., Allen J.R. The acute inflammatory reaction in chicken skin: blood cellular response. *Avian D.*, 14: 817-33. 1969.
- Carskadon M.A., Brown E.D., Dement W.C. Sleep fragmentation in the elderly: relationship to day time sleep tendency. *Neurobiology Aging*. 3: 3217. 1982.
- Caspi K., Sugden T.E., Moffitt A., Taylor I.W., Craig H., Harrington J., McClay J., Mill J., Martin A., Braithwaite and Poulton R., Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT. *Genetics Science*. 301: 386–389, 2003.
- Cavallo A., Daniels S.R., Dolan L.M., Bean J.A., Khoury J.C.: Blood pressure-lowering effect of melatonin in type 1 diabetes. *Journal Pineal Research*. 36: 262-266. 2004.

- Chan A.S., Lai F.P., Lo R.K., Voyno-Yasenetskaya T.A., Stanbridge E.J., Wong Y.H. Melatonin MT1 and MT2 receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins. *Cell Signal*. 14: 249-257, 2002.
- Cheng Y., Feng Z., Zhang Q.Z., Zhang J.T. Beneficial effects of melatonin in experimental models of Alzheimer disease. *Acta Pharmacologic*. 27(2): 129–139 Review. 2006.
- Chiu C.C., Chen J.Y., Lin K.L., Huang C.J., Lee J.C., Chen B.H., Chen W.Y., Lo Y.H., Chen Y.L., Tseng C.H., Chen Y.L., Lin S.R. p38 MAPK and NF-kappaB pathways are involved in naphtho[1,2-b] furan-4,5-dione induced antiproliferation and apoptosis of human hepatoma cells. *Cancer Letter*. 295: 92–99. 2010
- Cini G., Neri B., Pacini A., Cesati V., Sassoli C., Quattrone S., D'Apolito M., Fazio A., Scapagnini G., Provenzani A., Quattrone A. Antiproliferative activity of melatonin by transcriptional inhibition of cyclin D1 expression: a molecular basis for melatonin-induced oncostatic effects. *Journal Pineal Research*. 39: 12–20. 2005.
- Clemens J.W., Jarzynka M.J., Witt-Enderby P.A. Down-regulation of mt1 melatonin receptors in rat ovary following estrogen exposure. *Life Science*. 69: 27-35, 2001.
- Comijs H. C., Gerritsen L., Penninx B. W., Bremmer M. A., Deeg D. J., y Geerlings M. I. The association between serum cortisol and cognitive decline in older persons. *American Journal of Geriatric Psychiatry*. 18(1): 42-50. 2010.
- Corbett B.A., Mendoza S., Abdullah M., Wegelin J.A., Levine S. Cortisol circadian rhythms and response to stress in children with autism. *Psych neuroendocrinology*. 31(1): 59-68. 2006.
- Copinschi G., Van Reeth O., Van Cauter E. Biologic rhythms. Effect of aging on the desynchronization of endogenous rhythmicity and environmental conditions. *Presser Medical*. 28:942-946, 1999.
- Cowen P.J. Serotonin receptor subtypes: implications for psychopharmacology. *Journal Psychiatry Supplement*. 12: 7-14. 1991.

- Cruz C., Vargas L. Estrés, entenderlo es manejarlo. Santiago de Chile: Ediciones Universidad Católica de Chile. 1998.
- Cubero J., Rodríguez A.B., Narciso D., Valero V., Paredes S.D., Sánchez S., Barriga C. Anotaciones básicas del aminoácido triptófano. *Biogernis Anime*. 8: 1-5, 2006a.
- Cubero J., Narciso D., Rivero M., Rodríguez A.B., Barriga C. Study of 6-sulfatometoximelatonin and interleukin-1B and in infants fed a day/night dissociated formula milk. *Biogenic Amines*. 20: 41-52, 2006b.
- Cubero J., Narciso D., Aparicio S., Garau C., Valero V., Rivero M., Esteban S., Rial R., Rodríguez A.B., Barriga C. Improved circadian sleep-wake cycle in infants fed a day-night dissociated formula milk". *Neuroendocrinology letters*. 27(3): 373-380, 2006c.
- Cubero J., Narciso D., Terrón P., Rial R., Esteban S., Rivero M., Parvez H., Rodríguez A.B., Barriga C. Chrononutrition applied to formula milks to consolidate infants' sleep/wake cycle. *Neuroendocrinology letters*. 28(4):360- 366. 2007a.
- Cubero J., Valero V., Narciso, D., Sánchez J., Rodríguez A.B., Barriga C. Application of the oral administration of amino acid L-tryptophan as possible antioxidant. *Act Alimentaria Hungarica*. 36 (4): 419-424, 2007b.
- Cubero J, Chanclón B, Sánchez S, Rivero M, Rodríguez AB, Barriga C. Improving the quality of infant sleep through the conclusion at supper of cereals enriched with tryptophan, adenosine-5'-phosphate, and uridine-5'-phosphate. *Nutrition Neuroscience*. *Nutrition and Neuroscience*. 12(6), 272-80. 2009.
- Curier N.L., Sun L.Z., Miller S.C. Exogenous melatonin: quantitative enhancement in vivo of cells mediating non-specific immunity. *Journal of Neuroimmunology*. 104: 101-108. 2000.
- Davis R., Faulds D. Dexfenfluramine. An updated review of its therapeutic use in the management of obesity. *Drugs*. 52(5): 696-724. 1996.
- De la Calzada M.D. Modificaciones del sueño en el envejecimiento. *Revista de Neurología*; 30 (6): 577-580. 2000.

- Delgado J., Terrón M.P., Garrido M., Pariente J.A., Barriga C., Rodríguez A.B., Paredes S.D. A cherry nutraceutical modulates melatonin, serotonin, corticosterone, and total antioxidant capacity levels: effect on ageing and chronotype. *Journal of Applied Biomedicine*. 10: 109-117. 2012.
- Demas G.E., Nelson R.J. Photoperiod and temperature interact to affect immune parameters in adult male deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *Journal Biology Rhythms*. 11: 95-103. 1996.
- Demas G.E., Nelson R.J. Short-day enhancement of immune function is independent of steroid hormones in deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *Journal of Comparative Physiology B*. 168: 419-426. 1998.
- Depres-Brummer P., Bourin P., Pages N., Metzger G., Levi F. Persistent T lymphocyte rhythms despite suppressed circadian clock outputs in rats. *American Journal of Physiology*. 273: 1899-1997. 1997.
- Dickmeis T. Glucocorticoids and the circadian clock. *Journal of Endocrinology*. 200: 3-22. 2009.
- Duffy J.F., Czeisler C.A. Age-related change in the relationship between circadian period, circadian phase, and diurnal preference in humans. *Neuroscience Letters*. 318:117-120, 2002.
- Duffi J. The lessons of Eosinophilia-Myalgia Syndrome. *Hospital Practice*. 30: 65-90, 1992.
- Dubovsky S.L., Thomas M. Beyond specificity: effects of serotonin and serotonergic treatments on psychobiological dysfunction. *Journal of Psychosocial Research*. 39(4): 429-44. 1995.
- Dubocovich, M.L. Pharmacology and function of melatonin receptors. *Faseb Journal*. 2(12): 2765-73. 1988.
- Dubocovich M.L. Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Trends Pharmacology Science*. 16:50-56. 1995.

- Dubocovich M.L., Delagrange P., Krause D.N., Sugden D., Cardinali D.P., Olcese J. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacology Revisit.* 62: 343-380. 2010.
- Ekström P., Meissl H. Electron microscopic analysis of 5-antigen and serotonin-immunoreactive neural and sensory elements in the photosensory pineal organ of the salmon. *Journal of Neurology.* 292. 73-82. 1990.
- Erturul A., Rezaki M. The neurobiology of sleep and its influence on memory. *Türk Psikiyatri Derg.* 15(4): 300-8. 2004.
- Farriol M., Venereo Y., Orta X., Castellanos J.M., Segovia-Silvestre T. In vitro effects of melatonin on cell proliferation in a colon. Adenocarcinoma line. *Journal of Applied Toxicology.* 20: 21–24. 2000.
- Fernstrom J., Wurtman R. Elevation of plasma tryptophan by insulin in rat. *Metabolism.* 21(4). 337-42. 1972.
- Firk C., Markus C.R. Mood and cortisol responses following tryptophan-rich hydrolyzed protein and acute stress in healthy subjects with high and low cognitive reactivity to depression. *Clinical Nutrition.* 28; 266-271. 2009.
- Foret J., Webb W.B. Evolution de l'organisation temporelle des estades de sommeil chez l'homme de 20 à 70 ans. *Revista EEG Neurophysiologie.* 10: 1716. 1980.
- Fujiwara M., Shibata M., Watanabe Y., Nikiwa T., Hirata F., Mizuno F., Hayaishi O. Indolamina 2-3dioxigenasa. *Journal of Biologic Chemistry.* 253: 6081. 1978.
- Franco P.J., Ballesteros Z.P., Custodio V., Paz C. Principales neurotransmisores involucrados en la regulación del ciclo sueño vigilia. *Revista Investigación Clínica.* 64: 182-91. 2012.
- Futagami M., Sato S., Sakamoto T., Yokoyama Y., Saito Y. Effects of melatonin on the proliferation and cis-diamminedichloroplatinum (CDDP) sensitivity of cultured human ovarian cancer cells. *Journal of Genealogy-Oncology.* 82: 544–549. 2001.

- Garau C., Aparicio S., Rial R.V., Nicolau M.C., Esteban S. Age-related changes in circadian rhythm of serotonin synthesis in ring doves: Effects of increased tryptophan ingestion. *Experimental Gerontology*. 41(1):40-48, 2006.
- Garcia-Navarro A., González-Puga C., Escames G., Lopez L.C., Lopez A., Lopez-Cantarero M., Camacho E., Espinosa A., Gallo M.A., Acuna-Castroviejo D. Cellular mechanisms involved in the melatonin inhibition of HT-29 human colon cancer cell proliferation in culture. *Journal Pineal Research*. 43: 195–205. 2007.
- Garcia-Santos G., Antolin I., Herrera F., Martin V., Rodriguez-Blanco J., del Pilar Carrera M., Rodriguez C. Melatonin induces apoptosis in human neuroblastoma cancer cells. *Journal Pineal Research*. 41: 130–135. 2006.
- Garrido M.; Paredes S.D.; Cubero J.; Lozano M.; Toribio-Delgado A.F.; Muñoz J.L.; Reiter R.J.; Barriga C.; Rodríguez A.B. *Journal of Gerontology*. Published Online: 14-6. 2010.
- Gaspar P., Cases O., Maroteaux L. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Natural Revisit Neuroscience*. 4:1002-1012, 2003.
- Gauer F., Masson-Pevet M., Stehle DJ., Pevet P. Daily variations in melatonin receptor density of rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei are distinctly regulated. *Brain Research*. 641:92-98, 1994.
- Geary G.G., Krause D.N., Duckles S.P. Melatonin directly constricts rat cerebral arteries through modulation of potassium channels. *Journal of Physiology*. 273: 1530-1536, 1997.
- Germaine E., Guler O., Beatriz B., María J.P., Juan A.M., Russel J.R., Serrano E., Melquiades C., Acuña-Castroviejo D., El ejercicio y la melatonina en los seres humanos: los beneficios recíprocos. *Journal of Pineal Research*. Volumen 52, Número 1. 2012.
- Gibbs F.A., Gibbs E.L. *Atlas of Electroencephalography*. Vol.3. 2ª ed. Reading, MA: AddisonWesley. 1964.

- Gilbertson M.W., Shenton M.E., Ciszewski A., Kasai K., Lasko N.B., Orr S., Pitman S.K. Smaller hippocampal volume predicts pathologic vulnerability to psychological trauma. *Nature Neurosciences*. 5(11): 1242-1247. 2002.
- Giles G.I., Collins C.A., Stone T.W., Jacob C. Electrochemical and in vitro evaluation of the redox-properties of kynurenine species. *Biochemist Biophysics Research Commune*. 300 (3). 719-24. 2003.
- Gilliam T. Understanding primary insomnia in older people. *Nursing Older People*. 21(3): 30-33. 2009.
- Gitto E., Tan D.X., Reiter R.J., Karbownick M., Manchester L.C., Cuzzocrea S., Fulia F., Barberi I. Individual and synergistic antioxidative actions of melatonin: studies with vitamin E, vitamin C, glucathione and desferroxamine (desferoxamine) in rat liver homogenates. *Journal of Pharm and Pharmacology*. 53:224-232, 2000.
- Gershon M.D., Tack J. The Serotonin Signaling System: From Basic Understanding To Drug Development for Functional GI Disorders. *Gastroenterology*. 132 (1): 397-414, 2007.
- Gómez G. y Llorca R. Neurotrasmisores: Serotonina. *Biopsicología*. 3(1). 79-84, 2000a.
- Gómez G. y Llorca R. Aminoácidos. *Biopsicología*. 3(4). 548-76. 2000b.
- González A., Del Castillo-Vaquero A., Miro-Moran A., Tapia J.A., Salido G.M. Melatonin reduces pancreatic tumour cell viability by altering mitochondrial physiology. *Journal Pineal Research*. 50: 250–260. 2010.
- González-Flores D., Gamero E., Garrido M, Ramírez R., Moreno D., Delgado, J., Valdés E., Barriga C., Rodríguez A.B., Paredes S.D. Urinary 6- sulfatoxymelatonin and total antioxidant capacity increase after the intake of a grape juice cv. Tempranillo stabilized with HHP. *Food & Function*. 3(1): 34-39. 2012.
- Gortari (De) P., González-Alzati M.E., Cisneros M., Joseph-Bravo P. Effect of fasting on the content of thyrotropin-releasing hormone and its mRNA in the central

nervous system and pyroglutamyl peptidase II activity in the anterior pituitary of post-weaned and adult rats. *Nutricional Neuroscience*. 3: 255–265 2000.

- Gortari P., Bravo M.J. El estrés y sus efectos en el metabolismo y el aprendizaje. *Biotecnología*. V14. CS3. 2007.

- Grossman E., Laudon M., Yalcin R., Zengil H., Peleg E., Sharabi Y., Kamari Y., Shen-Orr Z., Zisapel N: Melatonin reduces night blood pressure in patients with nocturnal hypertension. *American Journal of Medicine*. 119:898-902. 2006.

- Gross B., Ronen N., Igman S., Livne E. Tryptophan toxicity. Time and dose response in rats. En: tryptophan, serotonin and melatonin: Basic aspects and applications. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 507-16. 1999.

- Guillén-Riquelme A. y Buela-Casal G. Actualización psicométrica y funcionamiento diferencial del ítem en el State Trait Anxiety Inventory (STAI). *Psicothema*, 23, 510-515. 2011.

- Guyton A., Hall J.A. Tratado de fisiología médica. 11ª Edición. Elsevier. Madrid. 2006.

- Hadley M.E. Papel endocrino de la glándula pineal. En: *Endocrinología*. Edición Prentice-Hall, 535-557, 1997.

- Hastings M.H., Duffield G.E., Ebling F.J., Kidd A., Maywood E.S., Schurov I. Non-photic signalling in the suprachiasmatic nucleus. *Biological Cell*. 89:495-503, 1997.

- Hardeland R. y Balzer I. Cronobiology of unicells: multiplicity of frequencies, non-oscillatory states, fotoperiodism and effects of biogenic amines. *Trends Compendium of Biochemistry and Physiology*. 1:71-87, 1993.

- Hardeland R., Poeggeler B. Non-vertebrate melatonin. *Journal Pineal Research*. 34:233-241, 2003.

-Hardeland R. Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell Molecular Life Scientific*. 65 (13):2001-18 2008.

- Hardeland R. Melatonin in aging and disease—multiple consequences of reduced secretion, options and limits of treatment. *Aging Disorder*. 3: 194-225. 2012.
- Heine Willi E. The significance of tryptophan in infant nutrition. In: *Tryptophan, serotonin and melatonin: Basic aspects and applications. Advances in experimental medicine and biology*. 705-710. 1999.
- Hill S.M., Blask D.E. Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture. *Cancer Research*. 48, 6121–6126. 1988.
- Ho M.K., Yung L.Y., Chan J.S., Chan J.H., Wong C.S., Wong Y.H. Galpha (14) links a variety of G (i) - and G(s)-coupled receptors to the stimulation of phospholipase C. *Journal of Pharmacology*. 132:1431-1440, 2001.
- Honma K., Kohsaka M., Fukuda N., Morita N., Honma S. Effects of vitamin B<sub>12</sub> on plasma melatonin rhythm in humans: increased light sensitivity phase advances the circadian clock? *Experientia*. 48 716-20. 1992.
- Huang Y., Liu R., Wang Q., Van Someren E.W.J., Xu H., Zhou J. Age-associated difference in circadian sleep-wake and rest-activity rhythms. *Physiology Behaviour*. 76:597–603. 2002.
- Hudson G., Hudson S., Hecht T., Mackenzih T. Protein source tryptophan versus pharmaceutical grade tryptophan an efficacious treatment for chronic insomnia. *Nutritional Neurosciences*. 8.121-127. 2005.
- Hussain S.A., Khadim H.M., Khalaf B.H., Ismail S.H., Hussein K.I. Efectos de la melatonina y el zinc en el control glucémico en pacientes con diabetes tipo 2 mal controlados con metformina. *Arabia Medicine Journal*. 27: 1483-1488. 2006.
- Iber C., Ancoli-Israel S., Chesson A. *The AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events: Rules, Terminology and Technical Specifications*. American Academy of Sleep Medicine. 2007.
- Illnerova H., Backstrom M., Saaf J., Wetterberg L., Vangbo B. Melatonin in rat pineal gland and serum: rapid parallel decline after light exposure at night. *Neuroscience Letter*. 9:189-193. 1978.

- Jaldo-Alba F., Muñoz-Hoyos A., Molina-Carballo A., Molina-Font J.A., Acuña Castroviejo D. Light deprivation increases plasma levels of melatonina during the first 72 h of life in human infants. In Fanaroff AA, Klaus MH, eds. Year book of neonatal and perinatal medicine. New York: Mosby; 193-194. 1995.
- Jang S.W., Xia L., Sompol P., Gianluca T., Qiang Ch., Michael Iuvone P., Keqiang Y. N-acetylserotonin activates TrkB receptor in a circadian rhythm. National Academy Science.123-128. 2010.
- Jansman A.J.M. Necesidades y utilización del triptófano en animales monogástricos. En: Avances en nutrición y alimentación animal. 16. 25-43. 2000.
- Jeyabalan G., Geller D.A. The importance of platelet-derived serotonin in mediating hepatic regeneration. Journal of Hepatology. 45 (4): 629-630, 2006.
- Jiang Z.G., Nelson C.S., Allen C.N. Melatonin activates an outward current and inhibits Ih in rat suprachiasmatic nucleus neurons. Brain Research. 687:125-132, 1995.
- Jhanwar-Uniyal M., Moorjani B., Kahn A.H. Indications of pre- and post-synaptic 5-HT1A receptor interactions in feeding behaviour and neuroendocrine regulation. Brain Research. 646(2). 247-57. 1994.
- Jones M.P., Melan M.A., Witt-Enderby P.A. Melatonin decreases cell proliferation and transformation in a melatonin receptor-dependent manner. Cancer Letters. 151:133-143, 2000.
- Joseph-Bravo P., Gortari P. El estrés y sus efectos en el metabolismo y el aprendizaje. Biotecnología. V14 CS3.indd. 2007.
- Joyce P.R., Paykel E.S. Predictors of drug response in depression. Archive Genetic and Psychiatry. 46: 89-99. 1989.
- Juruena M.F., Cleare A.J., Pariante C.M. The hypothalamic pituitary adrenal axis, glucocorticoid receptor function and relevance to depression. Review Brazilian Psiquiatry. 26: 189-201. 2004.

- Kadhim H.M., Ismail S.H., Hussein K.I., Bakir I.H., Sahib A.S. Efectos de la melatonina y el zinc en el perfil lipídico y la función renal en pacientes diabéticos tipo 2 mal controlados con metformina. *Journal Pineal Research*. 41: 189-193. 2006.
- Karasek M., Reiter R.J. Melatonin and aging. *Neuroendocrinology Letters*. 23:14-46, 2002.
- Klepac N., Ruds Z., Klepac R. Effects of melatonin on plasma oxidative stress in rat with streptozotocin induced diabetes. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 60: 32-35, 2006.
- Kripke D.F., Youngstedt S.D., Elliott J.A., Tuunainen A., Rex K.M., Hauger R.L., Marler M.R. Circadian phase in adults of contrasting ages. *Chronobiology International*. 22:695-709, 2005.
- Kopin I.J., Pare C.M., Axelrod J., Weissbach H. The fate of melatonin in animals. *Journal of Biological Chemistry*. 236 (11) 3072-3075. 1961.
- Korkmaz A., Topal T., Tan D.X., Reiter R.J. El papel de la melatonina en la regulación metabólica. *American Endocrinology Metabolism Disorder*. 10: 261-270. 2009.
- Kotagal S. Sleep in Children at Risk. *Sleep Medicine Clinics*. 2:477-490, 2007.
- Kuci S., Becker J., Veit G., Hangretinger R., Attanasio A., Bruchelt G., Treuner J., Niethammer D., Gupta D. Circadian variations in the immunomodulatory role of the pineal gland. *Neuroendocrinology Letters*. 10: 65-79. 1988.
- Kubicki S., Scheuler W., Jobert M., PastelackPrice C. Der Einfluss des Alters auf die Schfs spindle und KKomplexDichte. *Z. EEGEMG*; 20: 5963. 1989.
- Kryger M.H. Principios y medicina práctica del sueño. Philadelphia, W.B. Saunders Company. 1994.
- Lanoix D., Ouellette R., Vaillancourt C. Expression of melatonergic receptors in human placental choriocarcinoma cell lines. *Human Reproductive*. 21: 1981-1989. 2006.

- Lemoine P., Wade A.G., Katz A, Nir T., Zisapel N. Efficacy and safety of prolonged-release melatonin for insomnia in middle-aged and elderly patients with hypertension: a combined analysis of controlled clinical trials. *Integrin Blood Press Control*. 5:9-17. 2012.
- Liu J., Li H., Papadopoulos V. PAP7, a PBR/PKARIalpha-associated protein: a new element in the relay of the hormonal induction of steroidogenesis. *Journal Steroid Biochemistry Molecular and Biologic*. 85, 275-283. 2003.
- Lupien S.J., de Leon M., de Santi S., Convit A., Tarshish C., Nair N.P.V., Thakur M., McEwen B.S., Hauge, R.L., y Meaney M.J. Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits. *Nature Neurosciences*. 1(1): 69-73. 1998.
- Lupien S., Lecours A.R., Schwartz G., Sharma S. Longitudinal study of basal cortisol levels in healthy elderly subjects: Evidence for subgroups. *Neurobiology of Aging*. 17(1): 95-105. 1996.
- Lupien S.J., McEwen B.S., Gunnar M., y Heim C. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature Reviews*. 10: 434-445. 2009.
- Leproult R., Colecchia E.F., L'hermite-Baleriaux M., Van Cauter E. Transition from dim to bright light in the morning induces an immediate elevation of cortisol levels. *Journal Clinic of Endocrinal and Metabolism*. 86: 151-7. 2001.
- Lyons P., Truswell A. Serotonin precursor influenced by type of carbohydrate meal in healthy adults. *A. Journal Clinic of Nutrition*. 47: 433-9. 1988.
- Lynch H.J., Wurtman R.J., Moskowitz M.A. Daily rhythm in human urinary melatonin. *Science*. 187:169. 1975
- MacLulich A.M., Deary I.J., Starr J.M., Ferguson K.J., Wardlaw J.M., Seckl J.R. Plasma cortisol levels, brain volumes and cognition in healthy elderly men. *Psychoneuroendocrinology*. 30(5): 505-515. 2005.
- MacKenzie R.S., Melan M.A., Passey D.K., Witt-Enderby P.A. Dual coupling of MT(1) and MT(2) melatonin receptors to cyclic AMP and phosphoinositide signal

transduction cascades and their regulation following melatonin exposure. *Biochemist and Pharmacology*. 63:587- 595, 2002.

- Madrid J.A., Rol de Lama A. *Cronobiología Básica y Clínica*. Editec Red. S.L. 2006.

- Maestroni G.J., Zammaretti F., Pedrinis E. Hematopoietic effect of melatonin involvement of type 1 kappa-opioid receptor on bone marrow macrophages and interleukin-1. *Jornal Pineal Research*. 27:145-153, 1999.

- Maldonado M.D., Manfredi M., Ribas-Serna J., García-Moreno H., Calvo J.R. Melatonin administrated immediately before an intense exercise reverses oxidative stress, improves immunological defenses and lipid metabolism in football players. *Physiology Behavior*. 105: 1099-103. 2011.

- Martin J.L., Hakim A.D. Wrist Actigraphy. *Chest*. 139 (6):1514–1527.2011.

- Marshall K.A., Reiter R.J., Poeggeler B. Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vitro. *Free Radical Biologist Medical*. 21: 307-315. 1996.

- Mayo J.C., Sainz R.M., Antoli I., Herrera F., Martin V., Rodriguez C. Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cell Molecular Life Science*. 59:1706-1713, 2002.

- Mayo J.C, Tan D.X., Sainz R.M., Natarajan M., Lopez-Burillo S., Reiter R.J. Protection against oxidative protein damage induced by metal-catalyzed reaction or alkylperoxyl radicals: comparative effects of melatonin and other antioxidants. *Biochemist Biophysics Acted*. 1620:139-150, 2003a

- Mayo J.C., Tan D.X., Sainz R.M., Lopez-Burillo S., Reiter R.J. Oxidative damage to catalase induced by peroxyl radicals: functional protection by melatonin and other antioxidants. *Free Radical Research*. 37:543-553, 2003b

- Mayo J.C., Sainz R.M., Tan D.X., Antolín I., Rodríguez C., Reiter R.J. Melatonin and Parkinson's disease. *Endocrine*. 27(2):169-78, 2005.

- Mello A.A, Mello M.F., Carpenter L.L., Price L.H. Update on stress and depression: the role of the hypothalamic-pituitaryadrenal (HPA) axis. *Revista Brasileira Psiquiatria*. 25: 2318. 2003.

- McEwen, B.S. Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *European Journal of Pharmacology*. 583(2-3): 174-185. 2008.
- McNulty S., Ross A.W., Barrett P., Hastings M.H., Morgan P.J. Melatonin regulates the phosphorylation of CREB in ovine pars tuberalis. *Journal of Neuroendocrinology*. 6:523-532, 1994.
- Miyazaki T., Hashimoto S., Masubuchi S. Avance de fase, cambios de marcapasos circadiano humano son acelerados por el ejercicio físico durante el día. *Am Journal Physiology Regular Integer Comp Physiology*. 281: R197 - R205. 2001.
- Mello A.A., Mello M.F., Carpenter L.L, Price L.H. Update on stress and depression: the role of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Revista Brasileira Psiquiatria*. 25:2318. 2003.
- Michal M. *Stress*. Bale: Editions Roche. 1992.
- Miquel J. Integración de teorías del envejecimiento (parte II). *Revista Española Geriátria y Gerontología*. 41:125-127, 2006.
- Mokaky S., Cogan U., Aviram M. Dietary tryptophan enhances platelet aggregation. *Journal of Nutrition Science*. 36. 171. 1990.
- Molinari E.J., North P.C., Dubocovich M.L. 2-[125I] iodo-5-methoxycarbonylamino-Nacetyltryptamine: a selective radioligand for the characterization of melatonin ML2 binding sites. *Europe Journal Pharmacology*. 301:159-168, 1996.
- Monjan A.A. Perspective on sleep and aging. *Frontiers in Neurology*. DOI: 10.3389/FNeurology.2010.00124. 2010.
- Monteleone P., Maj M., Fusco M. Physical exercise at night blunts the nocturnal increase of plasma melatonin levels in healthy humans. *Life Science*. 47:1989-1995. 1990.

- Monti M., Hector J. Effects of the serotonin 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptor agonist and of the selective 5-HT<sub>2A</sub> or 5-HT<sub>2C</sub> receptor antagonists EMD 281014 and SB-243213, respectively, on sleep and waking in the rat. *European Journal of Pharmacology*. 553(1-3, 28): 163-170, 2006.
- Monti J.M. La hipótesis serotoninérgica de la depresión. *Revista de Psiquiatría de Uruguay*. 62(1). 60-8, 1998.
- Moore R.Y., Speh J.C., Card J.P. The retino-hypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. *Journal Comp Neurology*. 352: 351-366. 1995.
- Morgan P.J., Lawson W, Davidson G., Howell H.E. Guanine nucleotides regulate the affinity of melatonin receptors on the ovine pars tuberalis. *Neuroendocrinology*. 50 359–362. 1989.
- Morgan P.J., Barrett P., Howell HE, Helliwell R. Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochemical International*. 24:101-146, 1994.
- Moruzzi G., The functional significance of sleep with particular regard to the brain mechanisms underlying consciousness. In: *Eccles, eci Brain and conscious experience*. Berlin. Springer-Verbiage, (345-388). 1996.
- Muñoz J., Fernández-Hermida J.R. La opinión de los psicólogos españoles sobre el uso de los test. *Papeles del Psicólogo*. 31, 108-121. 2010
- Myint A., Schwarz M.J., Müller N. The role of the kynurenine metabolism in major depression. *Journal of Neural Transmission*. 119; 245-251. 2012.
- Mystakidou K., Tsilika E., Parpa E., Sakkas P., Vlahos L. The psychometric properties of the Greek version of the State-Trait Anxiety Inventory in cancer patients receiving palliative care. *Psychology and Health*. 24, 1215-1228. 2009.
- Neill J.C., Cooper S.J. Evidence that d-fenfluramine anorexia is mediated by 5-HT<sub>1</sub> receptors. *Psychopharmacology (Berl)*. 97(2). 213-8. 1989.

- Nelson R.J. Demas G.E., Klein S.L. Photoperiod mediation of seasonal breeding and immune function in rodents: A multifactorial approach. *American Zoologist*. 38: 226-237.1998.
- Nelson R.J. Drazen D.L. Melatonin mediates seasonal adjustments in immune fuction. *Reproduction Nutrition Development*. 39: 383-398. 1999.
- Nemethy M. Sedation with regional anesthesia: Inter-rater agreement on a modified Wilson sedation scale. *Anesthesia and Analgesia Journals*. 94:723-728. 2002.
- Nestler E.J., Barrot M., DiLeone R.J., Eisch A.J., Gold S.J., Monteggia LM. Neurobiology of depression. *Neurology*. 34: 13-25, 2002.
- Nonogaki K., Nozue K., Takahashi Y., Yamashita N., Hiraoka S., Kumano H., Kuboki T., Oka, Y. Fluvoxamine, a selective serotonin reuptake inhibitor, and 5-HT<sub>2C</sub> receptor inactivation induce appetite-suppressing effects in mice via 5-HT<sub>1B</sub> receptors. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 10 (5). 675-81. 2007.
- Nosjean O., Ferro M., Coge F., Beauverger P., Henlin J.M., Lefoulon F., Fauchere J.L., Delagrangé P., Canet E., Boutin J.A. Identification of the melatonin-binding site MT<sub>3</sub> as the quinone reductase 2. *Journal Biological and Chemistry*. 275:31311-31317, 2000.
- Okatani Y., Wakatsuki A., Enzan H., Miyahara Y. Protective effect of melatonin against mitochondrial injury induced by ischemia and reperfusion of rat liver. *European Journal of Pharmacology*. 469: 145-152. 2003.
- Ouichou A., Pevet P. Implication of tryptophan in the stimulatory effect of delta-sleep-inducing, peptide on indole secretion from perfused rat pineal glands. *Biological Signals*. 1:78-87, 1992.
- Pace-Schott EF., Hobson JA. La neurobiología del sueño: Genética, fisiología celular y redes subcorticales. *Nature Reviews*. 2, 591-605. 2002
- Paulis L., Simko F. Blood pressure modulation and cardiovascular protection by melatonin: potential mechanisms behind. *Physiology Research*. 56(6):671-84, 2007.

- Paredes S.D., Terrón M.P., Cubero J., Valero V., Barriga C., Reiter R.J., Rodríguez A.B. Comparative study of the activity/rest rhythms in young and old ring dove (*Streptopelia risoria*): correlation with the serum levels of melatonin and serotonin". *Chronobiology International*. 23(4):779-793. 2006.
- Paredes S.D., Rodríguez A.B., Barriga C. Melatonin and tryptophan as therapeutic agents against the impairment of the sleep-wake cycle and immunosenescence due to aging in *Streptopelia risoria*. *Neuroendocrinology Letters*. 28:757-760. 2007a.
- Paredes S.D., Terrón M.P., Marchena A.M., Barriga C., Pariente J., Reiter R.J., Rodríguez A.B. Effect of exogenous melatonin on viability, ingestion capacity and free radical scavenging in heterophils from young and old ringdoves (*Streptopelia risoria*) *Molecular and Cellular Biochemistry*. 304:305-314. 2007b.
- Paredes S.D., Marchena A.M., Bejarano I., Espino J., Barriga C., Rial R.V., Reiter R.J., Rodríguez A.B. Melatonin and tryptophan affect the activity-rest rhythm, core and peripheral temperature, and interleukin levels in ringdove: Changes with age. *Journal of Gerontology (Biological Science)*. 64(3); 340-350. 2009.
- Pariente C.M., Lightman S.L. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends Neuroscience*. 31: 464-468. 2008.
- Pavlidis M., Greenwood L., Paalavuo M., Molsa H., Laitinen J.T. The effect of photoperiod on diel rhythms in serum melatonin, cortisol, glucose, and electrolytes in the common dentex. *Dentex, dentex. General and Comparative Endocrinology*. 113:240-50. 1999.
- Peschke E. La melatonina, endocrina del páncreas y la diabetes. *Journal Pineal Research*. 44: 26-40. 2008.
- Petit L., Lacroix I., de Coppet P., Strosberg A.D., Jockers R. Differential signaling of human Mella and Mellb melatonin receptors through the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway. *Biochemist Pharmacology*. 58:633-639, 1999.

- Poeggeler B. Melatonin, aging, and age-related diseases: perspectives for prevention, Intervention and therapy. *Endocrine*. 27: 201-212. 2005.
  
- Provencio I., Rollag M.D., Castrucci A.M. Anatomy: Photoreceptive net in the mammalian retina. *Nature*. 415- 493. 2002.
  
- Rechtschaffen A., Kales A.A. Manual of standardized terminology, techniques and scoring system for sleep stages of human subjects; University of California, Los Angeles. Brain Information Service. NINDB Neurological Information Network. 1973.
  
- Rechtschaffen A., Kales A. The Manual of Standardisation Terminology, Techniques and Scoring System for Sleep Stages in Human Subjects. Washington, D.C. National Institutes of Health. Publication no. 204, 1968.
  
- Reiter R.J, Richardson B.A, Johnson L. Pineal melatonin rhythm: reduction in aging Syrian hamsters. *Science*; 210:1372-3. 1980.
  
- Reiter R.J. The pineal gland. Vols. I, II, III. Boca Raton, CRC Press. 1981.
  
- Reiter R.J. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 79: 153-8. 1991a
  
- Reiter R.J. Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrine Reviews*. 12: 151-180. 1991b
  
- Reiter R.J. The aging pineal gland and its physiological consequences. *Bioassays*; 14: 169-75. 1992
  
- Reiter R.J. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia*. 49:654-664. 1993.
  
- Reiter R.J., Tan D.X., Cabrera J., D'Arpa, D. Melatonin and tryptophan derivatives as free radical scavengers and antioxidants. *Advance Experimental Medical Biologic*. 467. 379-87. 1999.
  
- Reiter R.J., Tan D.X., Mancheste C., Karbownik M., Calvo J.R. Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidate stress in vivo. *Biological Signals Receipt*. 9. 160-171. 2000.

- Reiter R.J., Tan D.X., Burkhardt S., Manchester L.C. Melatonin in plants. *Nutrition Reviews*. 59:286-290, 2001.
- Reiter R.J., Tan D.X., Mayo J.C., Sainz R.M., Leon J., Czarnocki Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochimica Polonica*. 50:1129-1146, 2003.
- Reynolds C.F., Kupfer D.J., Taska L.F., Hoch C.C., Sewitch D.E., Spiker D.G. Sleep in healthy seniors: a revisit. *Sleep*. 8: 209. 1985.
- Reppert S.M., Weaver D.R., Stehle J.H., Rivkees, S.A. Molecular cloning and characterization of a rat A1-adenosine receptor that is widely expressed in brain and spinal cord. *Journal of Molecular Endocrinology*. 5. 1037-1048. 1995.
- Reppert S.M., Weaver D.R., Ebisawa T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron Journal*. 13:1177- 1185, 1994.
- Reppert S.M., Weaver D.R., Godson C. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacology Science*. 17:100-102, 1996.
- Rial R.V., Mourad Akaárir M., Nicolau C, Gamundí A., Esteban S. Sueño y vigilia. Aspectos Fisiológicos. Laboratorio de Fisiología. Universidad de Islas Baleares, Palma de Mallorca. 2006.
- Riemann M., Vorderholzer D. Treatment of depression and sleep disorders. Significance of serotonin and L-tryptophan in pathophysiology and therapy. *Fortschritte der Medicine*. 116:40-42, 1998.
- Rivkees S.A., Hao H. Developing circadian rhythmicity. *Seminars in Perinatology*. 24 (4). 232-42. 2000.
- Rodríguez A.B., Terron M. P., Durán J., Ortega E., Barriga, C. Physiological concentrations of melatonin and corticosterone affect phagocytosis and oxidative of ring dove heterophils. *Journal Pineal Reserch*. 31(1):31-8. 2001.
- Rodríguez A.B., Marchena J.M., Nogales G., Durán J., Barriga C. Correlation between the circadian rhythm of melatonin, phagocytosis, and superoxide anion levels in ring dove heterophils. *Journal Pineal Reserch*. 26: 35-42. 1999.

- Rodríguez A.B., Barriga C., Paredes S.D., Terrón M.P. Age, melatonin and the immune system. In *Recent Research Developments in Molecular and Cellular Biochemistry*. 2. Pandalai, S.G. Research Signpost. 255-287. 2005.
- Roffwarg H., Muzio J.N., Dement W.C. Ontogenic development of human sleep-dream cycle. *Science*. 152:604-619, 1966.
- Rone M.B., Fan J., Papadopoulos V. Cholesterol transport in steroid biosynthesis: role of protein-protein interactions and implications in disease states. *Biochemical et Biophysical Acta*. 646-658. 1971. 2009.
- Rosenzweig M.R., Leiman A.I. Ritmos biológicos y sueño y vigilia. En: *Psicología fisiológica*. 2ª. ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana. 551-612. 1992.
- Reiter R.J., Tan D.X., Fuentes-Broto L. Melatonin: A Multitasking Molecule. *Progress in Brain Research*. 181, 127-151. 2010.
- Sánchez S., Paredes S.D., Martín M.I., Barriga C., Rodríguez A.B. Effect of tryptophan administration on circulating levels of melatonin and phagocytic activity. *Journal of Applied Biomedicine*. 2. 169-177. 2004.
- Sánchez S., Sánchez C.L., Paredes S.D., Barriga C., Rodríguez A.B. Circadian Levels of serotonin in plasma and brain after oral administration of tryptophan in rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 104: 52-59. 2008.
- Sánchez-Barceló, E.J., Mediavilla, M.D., Tan, D.X., Reiter, R.J. Clinical uses of melatonin: evaluation of human trials. *Current Medical Chemistry*. 17(19):2070-2095. 2010.
- Sapolsky, R. M., Krey, L. C., y McEwen, B. S. The neuroendocrinology of stress and aging: The glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocrine Reviews*. 7(3): 284-301. 1986.
- Selye H. *La tensión en la vida (The stress of life)*. Buenos Aires: Compañía General Fabril Editora. 1960.
- Silber MH, Krahn LE, Morgenthaler TI. *Sleep Medicine in clinical practice*. Florida: Taylor&Francis. 3-23. 2004.

- Schaechter J.D., Wurtman R.J. Serotonin release varies with brain tryptophan levels. *Brain Research*. 532:203-10. 1990.
- Scheer F., Buijs R.M. Light affects morning salivary cortisol in humans. *Journal Clinical of Endocrinology and Metabolism*; 84:3395-8. 1999.
- Scheer F.A., Van Montfrans G.A., Van Someren E.J., Mairuhu G., Buijs R.M. Daily nighttime melatonin reduces blood pressure in male patients with essential hypertension. *Journal Hypertension*. 43:192-197. 2004.
- Schweiger U., Warnhoff M., Pahl J., Pirke K.M. Effects of carbohydrate and protein meals on plasma large neutral amino acids, glucose, and insulin plasma levels of anorectic patients. *Metabolism*. 35 (10). 938-43. 1986.
- Seltzer A, Viswanathan M, Saavedra JM. Melatonin-binding sites in brain and caudal arteries of the female rat during the estrous cycle and after estrogen administration. *Endocrinology*. 130:1896-902, 1992.
- Sewer MB, Waterman MR. Insights into the transcriptional regulation of steroidogenic enzymes and StAR. *Revisit Endocrinology and Metabolism Disorder*. 2: 269-274. 2001.
- Siu AW, Maldonado M, Sánchez-Hidalgo M, Tan DX, Reiter RJ. Protective effects of melatonin in experimental free radical-related ocular diseases. *Journal Pineal Research*. 40:101-109, 2006.
- Souza de L., Benedito-Silva A., Pires M. L., Poyares D., Tufik S., Calil H. M. Further validation of actigraphy for sleep studies. *Sleep*. 26, 81–85. 2003.
- Spielberger C.D., Gorsuch R. L., Lushene R.E. *Manual for the state-trait anxiety inventory (Self-evaluation questionnaire)*. Palo Alto: Consulting Psychologists Press. 1970.
- Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Maestroni GJ, Esquifino AI, Hardeland R, Cardinali DP. Role of melatonin in neurodegenerative diseases. *Neurotoxicity Research*. 7:293-318, 2005.
- Stasica P., Paneth P., Rosiak J.M. Hydroxyl radical reaction with melatonin molecule: a computational study. *Journal Pineal Research*. 29: 125-127. 2000.

- Stefulj J. Proximity between 5-HT secreting enteroendocrine cells and lymphocytes in the gut mucosa of rhesus macaques (*Macaca mulatta*) is suggestive of a role for enterochromaffin cell 5-HT in mucosal immunity. *Journal of Neuroimmunology*. 146, 2, 46 – 49. 2001.
- Strecker R.E., Morairty S., Thakkar M.M., Porkka-Heiskanen T., Basheer R., Dauphin L.J., Rainnie D.G., Porta C.M., Greene R.W., McCarley R.W. Adenosinergic modulation of basal forebrain and preoptic/anterior hypothalamic neuronal activity in the control of behavioural state. *Behavioural Brain Research*. 115 (2). 183-204. 2000.
- Strong R. Neurochemical changes in the aging human brain: Implications for behavioural impairment and neurodegenerative disease. *Geriatrics*. 53 (1): 59-S12. 1998.
- Sugden, D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. *Experientia*. 45. 922-932. 1989.
- Sugimoto Y., Yoshikawa T., Yamada J. Involvement of nitric oxide in the 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptor-mediated hyperphagia in rats. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 467. 109-11. 1999.
- Tan D.X.; Manchester L.C.; Reiter R.J.; Plummer B.F.; Hardies L.J.; Weintraub S.T. y Vijayalaxmi Shepherd A.M.M. A novel melatonin metabolite cyclic 3-hydroxymelatonin: A biomarker of in vivo hydroxyl radical generation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 253: 614-620. 1998.
- Tao L. *First Aid USMLE. Step 1*. 2009,
- Terrón M.P., Paredes S.D., Barriga C, Ortega E., Reiter R.J., A.B. Rodriguez. Melatonin, lipid peroxidation and age in heterophils from the ring dove (*Streptopelia risoria*)”. *Free Radical Research*. 39 (6):613-619, 2005.
- Theron J.J., Oosthuizen J.M., Rautenbach M.M. Effect of physical exercise on plasma melatonin levels in normal volunteers. *South Africa Medical Journal*; 66: 838–841. 1994.

- Torres-Farfán C., Richter H.G., Rojas-García P., Vergara M., Forcelledo M.L., Valladares L.E. MT1 Melatonin receptor in the primate adrenal gland: inhibition of adrenocorticotropin-stimulated cortisol production by melatonin. *Journal Clinical Endocrinology and Metabolism*. 88: 450-8. 2003.
- Torres-Farfán C., Richter H.G., Germain A., Valenzuela G., Campino C., Rojas-García P. Maternal melatonin selectively inhibits cortisol production in the primate fetal adrenal gland. *Journal Physiology*. 554: 841-56. 2004.
- Tutuncu N.B., Batur M.K., Yildirim A., Tutuncu T., Deger A. Los niveles de melatonina disminuyen en pacientes diabéticos tipo 2 con neuropatía autonómica cardiaca. *Journal Pineal Research*. 39. 43-49. 2005.
- Urata Y., Honma S., Goto S., Todoroki S., Lida T., Cho S., Honma K., Kondo T. Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activador protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radical Biological Medicine*. 27:838-847, 1999.
- Urbanski H.F. Influence of light and the pineal gland on biological rhythms. En: *Neuroendocrinology in physiology and medicine*. P.M. Conn y M. E. Freeman, editors. 405-20, Human Press (2000).
- Valenti S., Giusti M. Melatonin participates in the control of testosterone secretion from rat testis: an overview of our experience. *Annals New York Academy of Sciences*. 966: 284-9. 2002.
- Valenzuela F.J., Torres-Farfán C., Richter H.G., Méndez N., Campino C., Torrealba F. Clock gene expression in adult primate suprachiasmatic nuclei and adrenal: is the adrenal a peripheral clock responsive to melatonin? *Endocrinology*. 149: 1454-61. 2008.
- Valenzuela F.J., Reynolds H.E., Torres-Farfán C., Rojas A., Valenzuela G.J., Serón-Ferré A. Melatonin inhibition of the cortisol response to ACTH may be exerted through period circadian protein homolog 1 (Per1). *Revista Chilena de Endocrinología y Diabetes*. 5 (1), 1 – 56. 2012.
- Van Someren E.J.W. Circadian and sleep disturbances in the elderly. *Experimental Gerontology*. 35; 1229-1237. 2000.

- Vanecek J. Melatonin inhibits release of luteinizing hormone via decrease of  $[Ca^{2+}]_i$  and cyclic AMP. *Physiology Research*. 47:329–335. 27. 1998.
- Vanecek J., Vollrath L. Melatonin inhibits cyclic AMP and cyclic GMP accumulation in the rat pituitary. *Brain Research*. 505 157–159. 1989.
- Vanecek J., Vollrath L. Melatonin modulates diacylglycerol and arachidonic acid metabolism in the anterior pituitary of immature rats. *Neuroscience Letters*. 110. 199–203. 1990.
- Vanecek J., Klein D.C. Melatonin inhibits gonadotropin-releasing hormone-induced elevation of intracellular  $Ca^{2+}$  in neonatal rat pituitary cells. *Endocrinology*. 130. 701–707. 1992.
- Vautier S., Pohl S. Do balanced scales assess bipolar constructs? The case of the STAI scales. *Psychological Assessment*. 21, 187-193. 2009.
- Velayos J.L., Moleres A., Irujo M., Yllanes B., Paternain B. Bases anatómicas del sueño. *Anuario Sistema Sanitario Navarro*. 30(1): 7-17. 2007.
- Vigneau F., Cormier S. The factor structure of the State-Trait Anxiety Inventory: an alternative view. *Journal of Personality Assessment*. 90, 280-285. 2008.
- Virella B., Arbona C., Novy D. M. Psychometric properties and factor structure of the Spanish version of the State-Trait Anxiety Inventory. *Journal of Personality Assessment*. 63, 401-412. 1994.
- Wauquier A., Van Sweden B. Aging of core and optional sleep. *Biological Psychiatry*. 31: 86680. 1992.
- (de) Weerth C., Zijl R., Buitelaar J. Development of cortisol circadian rhythm in infancy. *Early Human Development*. 73 (1-2): 39–52. 2003.

- Weibel L., Brandenberger G. The start of the quiescent period of cortisol remains phase locked to the melatonin onset despite circadian phase alterations in humans working the night schedule. *Neuroscience Letters*. 318: 89-92. 2002.
- Witt-Enderby P.A., Dubocovich M.L. Characterization and regulation of the human ML1A melatonin receptor stably expressed in Chinese hamster ovary cells. *Molecular Pharmacology*. 50:166-174, 1996.
- Witt-Enderby P.A., Masana M.I., Dubocovich M.L. Physiological exposure to melatonin supersensitizes the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent signal transduction cascade in Chinese hamster ovary cells expressing the human mt1 melatonin receptor. *Endocrinology*. 139:3064-3071, 1998.
- Witt-Enderby P.A., Jarzynka M.J., Melan M.A. Microtubules Modulate Melatonin Receptor Function. *Neuroscience Abstracts* (277.18), 27:142, 2001.
- Winkler B.S., Orseli S.M., Rex T.S. The redox couple between glutathione and ascorbic acid: A chemical and physiological perspective. *Free Radical Biological Medicine*. 17: 333-349. 1994.
- Woo M.M.M., Tai C.J., Kang S.K., Nathwani P.S., Pang S.F.P., Leung P.C.K. Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells. *Journal Clinical Endocrinology and Metabolism*. 86: 4789-97. 2001.
- Wright H.R., Lack .LC. Effect of light wavelength on suppression and phase delay of the melatonin rhythm. *Chronobiology International*. 18:801–808. 2001.
- Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*. 37; 1-17. 2009.
- Wurtman R., Wurtman J., Regan M., McDermont J., Tsay H., Breu J. Effects of normal meals rich in carbohydrates or proteins on plasma tryptophan and tyrosine ratios. *American Journal Clinical Nutrition*. 77. 128-32. 2003.
- Wurtman R.J, Axelrod J., Lawrence S.P. Melatonin Synthesis in the Pineal Gland: Control by Light. *Science*. 142: 1071-1073, 1963.

- 
- Yeleswaram K., McLaughlin L.G., Knipe J.O., Schabdach D. Pharmacokinetics and oral bioavailability of exogenous melatonin in preclinical animal models and clinical implications. *Journal Pineal Research*. 22: 45-51. 1997;
  - Yellon S.M. Dayli melatonin treatments regulate the circadian melatonin rhythm in the adult Djungarian hamster. *Journal Biologist Rhythms*. 11: 4–13 1996.
  - Yi C., Pan X., Yan H., Guo M., Pierpaoli W. Effects of melatonin in age-related macular degeneration. *Annals New York Academy Science*. 1057: 384-392, 2005.
  - Yildiz M., Akdemir O. Assessment of the effects of physiological release of melatonin on arterial distensibility and blood pressure. *Cardiology Young Journal*. 19: 198-203. 2009.
  - Young, A.H., Gallagher, P. Improvement neurocognitive function and mood following adjunctive treatment with mifepristone (RU-486) in bipolar disorder *Neuropsychopharmacology*. 29: 1538-45. 2004.
  - Zucconi M., Bruni O. Sleep Disorders in children with Neurologic diseases. *Seminars in Pediatric Neurology*. 8:258-275, 2001.

## **8. ANEXO**

## ANEXO 1

### HISTORIAL MEDICO

<b>Nombre</b>			
Fecha de nacimiento:		Sexo:	
Domicilio:			
Teléfono particular:		Puesto de trabajo:	
Teléfono móvil:		estado civil:	
<b>Características de su sueño</b>			
¿es reponedor?:			
Le cuesta conciliar el sueño		Se siente usted estresado:	
Se despierta por la noche:			
HEMOGRAMA Y BIOQUIMICA	ORINA	TENSION ARTERIAL	Fecha

Medicación actual	Alergias	Vacunaciones
ANTECEDENTES MEDICOS	INTERVENCIONES QUIRURGICAS	
MUESTRAS DE ORINA	Fecha	OBSERVACIONES
EVOLUCION DE ACTIWACH	Fecha	

## ANEXO 2

### DECLARACION DE CONSENTIMINETO INFORMADO

D./D<sup>a</sup> ..... de ..... años de edad y  
con D.N.I. ....

Manifiesta:

- 1.- Que ha sido informado/a sobre el procedimiento de estudio de doctorado y proyecto de investigación que está realizando D. Sergio Matito Celaya, medico colegiado en Badajoz con D.N.I. 8872394-Y, el cual constara de la toma de muestra de orina y toma de alimentos ricos en determinados aminoácidos y nucleótidos con el fin de conseguir una mejor calidad de sueño.
- 2.- Haber sido informado/a de la toma de efectos secundarios que la toma de estos alimentos podría tener.
- 3.- Haber sido informado de que mis datos personales serán protegidos e incluidos en un fichero que deberá estar sometido a y con las garantías de la ley 15/1999 de 13 de Diciembre.

Tomando ello en consideración, otorgo mi consentimiento a que la toma de muestra de orina tenga lugar así como la toma del alimento citado y que los resultados sean utilizados para cubrir los objetivos especificados en el proyecto.

Y para que así conste y en mis plenas aptitudes psicofísicas

Badajoz a.....de .....de.....

Fado: D/D.<sup>a</sup>.....

## ANEXO 3

### SEMANA 1

#### DÍA 1:

Comida: .....

Siesta: .....

Cena: .....

Hora de acostarse.....

Tensión: .....

#### DÍA 2:

Comida: .....

Siesta: .....

Cena: .....

Hora de acostarse.....

Tensión: .....

#### DÍA 3:

Comida: .....

Siesta: .....

Cena: .....

Hora de acostarse.....

Tensión: .....

(Recoger orina de la tarde; 21.00h)

#### DÍA 4:

Comida: .....

Siesta: .....

Cena: .....

Hora de acostarse.....

Tensión: .....

(Recoger primera orina de la mañana)

#### DÍA 5:

Comida: .....

Siesta: .....

Cena: .....

Hora de acostarse.....

Tensión: .....

#### DÍA 6:

Comida: .....

Siesta: .....

Cena: .....

Hora de acostarse.....

Tensión: .....

#### DÍA 7:

Comida: .....

Siesta: .....

Tensión: .....

## ANEXO 4

### SEMANA 2

#### DÍA 1:

Comida: .....  
Siesta: .....  
Cena: .....  
Hora de acostarse.....  
Tensión: .....

#### DÍA 2:

Comida: .....  
Siesta: .....  
Cena: .....  
Hora de acostarse.....  
Tensión: .....  
(Recoger primera orina de la mañana)  
(Recoger orina dela tarde; 21.00h)

#### DÍA 3:

Comida: .....  
Siesta: .....  
Cena: .....  
Hora de acostarse.....  
Tensión: .....

#### DÍA 4:

Comida: .....  
Siesta: .....  
Cena: .....  
Hora de acostarse.....  
Tensión: .....

#### DÍA 5:

Comida: .....  
Siesta: .....  
Cena: .....  
Hora de acostarse.....  
Tensión: .....

#### DÍA 6:

Comida: .....  
Siesta: .....  
Cena: .....  
Hora de acostarse.....  
Tensión: .....

#### DÍA 7:

Comida: .....  
Siesta: .....  
Tensión: .....  
(Recoger primera orina de la mañana)  
(Recoger orina dela tarde; 21.00h)

## ANEXO 5

### SEMANA 3

#### DÍA 1:

Comida: .....  
Siesta: .....  
Cena: .....  
Hora de acostarse.....  
Tensión: .....

#### DÍA 2:

Comida: .....  
Siesta: .....  
Cena: .....  
Hora de acostarse.....  
Tensión: .....

#### DÍA 3:

Comida: .....  
Siesta: .....  
Cena: .....  
Hora de acostarse.....  
Tensión: .....

#### DÍA 4:

Comida: .....  
Siesta: .....  
Cena: .....  
Hora de acostarse.....  
Tensión: .....

#### DÍA 5:

Comida: .....  
Siesta: .....  
Cena: .....  
Hora de acostarse.....  
Tensión: .....

#### DÍA 6:

Comida: .....  
Siesta: .....  
Cena: .....  
Hora de acostarse.....  
Tensión: .....

#### DÍA 7:

Comida: .....  
Siesta: .....  
Tensión: .....  
(Recoger primera orina de la mañana)  
(Recoger orina de la tarde; 21.00h)

## ANEXO 6

### STAI AUTOEVALUACIÓN A (E/R)

A / E 

PD = 30 +	-	=
-----------	---	---

Apellidos y nombre..... Edad..... Sexo.....  
Centro..... Curso..... Estado Civil.....  
Otros datos..... Fecha.....

### A-E

#### INSTRUCCIONES

A continuación encontrará unas frases que se utilizan corrientemente para describirse uno a sí mismo.  
Lea cada frase y señale la puntuación 0 a 3 que indique mejor cómo se SIENTE Vd. AHORA MISMO, en este momento. No hay respuestas buenas ni malas. No emplee demasiado tiempo en cada frase y conteste señalando la respuesta que mejor describa su situación presente.

		Nada	Algo	Bastante	Mucho
1. Me siento calmado.....	0	1	2	3	
2. Me siento seguro.....	0	1	2	3	
3. Estoy tenso.....	0	1	2	3	
4. Estoy contrariado.....	0	1	2	3	
5. Me siento cómodo (estoy a gusto).....	0	1	2	3	
6. Me siento alterado.....	0	1	2	3	
7. Estoy preocupado ahora por posibles desgracias futuras.....	0	1	2	3	
8. Me siento descansado.....	0	1	2	3	
9. Me siento angustiado.....	0	1	2	3	
10. Me siento confortable.....	0	1	2	3	
11. <u>T</u> engo confianza en mí mismo.....	0	1	2	3	
12. Me siento nervioso.....	0	1	2	3	
13. Estoy desasosegado.....	0	1	2	3	
14. Me siento muy "atado" (como oprimido).....	0	1	2	3	
15. <u>E</u> stoy relajado.....	0	1	2	3	
16. Me siento satisfecho.....	0	1	2	3	
17. Estoy preocupado.....	0	1	2	3	
18. Me siento aturdido y sobreexcitado.....	0	1	2	3	
19. Me siento alegre.....	0	1	2	3	
20. <u>M</u> e siento bien.....	0	1	2	3	

**COMPRUEBE SI HA CONTESTADO A TODAS LAS FRASES CON UNA SOLA RESPUESTA**

**Ahora, vuelva la hoja y lea las Instrucciones antes de comenzar a contestar a las frases**

# STAI

A / R PD = 30 + - =

## AUTOEVALUACIÓN A (E/R)

Apellidos y nombre.....Edad.....Sexo.....  
Centro.....Curso.....Estado Civil.....  
Otros datos.....Fecha.....

## A-R

### INSTRUCCIONES

A continuación encontrará unas frases que se utilizan corrientemente para describirse uno a sí mismo. Lea cada frase y señale la puntuación 0 a 3 que indique mejor cómo se SIENTE Vd. EN GENERAL, en la mayoría de las ocasiones. No hay respuestas buenas ni malas. No emplee demasiado tiempo en cada frase y conteste señalando la respuesta que mejor describa cómo se siente Vd. generalmnte.

	Nada	Algo	Bastante	Mucho
21. Me siento bien.....	0	1	2	3
22. Me canso rápidamente.....	0	1	2	3
23. Siento ganas de llorar.....	0	1	2	3
24. Me gustaría ser tan feliz como otros.....	0	1	2	3
25. Pierdo oportunidades por no decidirme pronto.....	0	1	2	3
26. Me siento descansado.....	0	1	2	3
27. Soy una persona tranquila, serena y sosegada.....	0	1	2	3
28. Veo que las dificultades se amontonan y no puedo con ellas.....	0	1	2	3
29. Me preocupo demasiado por cosas sin importancia.....	0	1	2	3
30. Soy feliz.....	0	1	2	3
31. Me suelo tomar las cosas demasiado en serio.....	0	1	2	3
32. Me falta confianza en mi mismo.....	0	1	2	3
33. Me siento seguro.....	0	1	2	3
34. No suelo afrontar las crisis o dificultades.....	0	1	2	3
35. Me siento triste (melancólico).....	0	1	2	3
36. Estoy satisfecho.....	0	1	2	3
37. Me rondan y molestan pensamientos sin importancia.....	0	1	2	3
38. Me afectan tanto los desengaños que no puedo olvidarlos.....	0	1	2	3
39. Soy una persona estable.....	0	1	2	3
40. Cuando pienso sobre asuntos y preocupaciones actuales me pongo tenso y agitado.....	0	1	2	3

**COMPRUEBE SI HA CONTESTADO A TODAS LAS FRASES CON UNA SOLA RESPUESTA**

**Ahora, vuelva la hoja y lea las Instrucciones antes de comenzar a contestar a las frases**

## ANEXO 7

### 5.3. Inventario de Depresión de Beck (Beck Depression Inventory, BDI)

1

Instrucciones: A continuación se expresan varias respuestas posibles a cada uno de los 21 apartados. Delante de cada frase marque con una cruz el círculo que mejor refleje su situación actual.

1. Estado de ánimo
  - Esta tristeza me produce verdaderos sufrimientos
  - No me encuentro triste
  - Me siento algo triste y deprimido
  - Ya no puedo soportar esta pena
  - Tengo siempre como una pena encima que no me la puedo quitar
2. Pesimismo
  - Me siento desanimado cuando pienso en el futuro
  - Creo que nunca me recuperaré de mis penas
  - No soy especialmente pesimista, ni creo que las cosas me vayan a ir mal
  - No espero nada bueno de la vida
  - No espero nada. Esto no tiene remedio
3. Sentimientos de fracaso
  - He fracasado totalmente como persona (padre, madre, marido, hijo, profesional, etc.)
  - He tenido más fracasos que la mayoría de la gente
  - Siento que he hecho pocas cosas que valgan la pena
  - No me considero fracasado
  - Veo mi vida llena de fracasos
4. Insatisfacción
  - Ya nada me llena
  - Me encuentro insatisfecho conmigo mismo
  - Ya no me divierte lo que antes me divertía
  - No estoy especialmente insatisfecho
  - Estoy harto de todo
5. Sentimientos de culpa
  - A veces me siento despreciable y mala persona
  - Me siento bastante culpable
  - Me siento prácticamente todo el tiempo mala persona y despreciable
  - Me siento muy infame (perverso, canalla) y despreciable
  - No me siento culpable
6. Sentimientos de castigo
  - Presiento que algo malo me puede suceder
  - Siento que merezco ser castigado
  - No pienso que esté siendo castigado
  - Siento que me están castigando o me castigarán
  - Quiero que me castiguen
7. Odio a sí mismo
  - Estoy descontento conmigo mismo
  - No me aprecio
  - Me odio (me desprecio)
  - Estoy asqueado de mí
  - Estoy satisfecho de mí mismo
8. Autoacusación
  - No creo ser peor que otros
  - Me acuso a mí mismo de todo lo que va mal
  - Me siento culpable de todo lo malo que ocurre
  - Siento que tengo mucho y muy graves defectos
  - Me critico mucho a causa de mis debilidades y errores
9. Impulsos suicidas
  - Tengo pensamientos de hacerme daño, pero no llegaría a hacerlo
  - Siento que estaría mejor muerto
  - Siento que mi familia estaría mejor si yo muriera
  - Tengo planes decididos de suicidarme
  - Me mataría si pudiera
  - No tengo pensamientos de hacerme daño
10. Períodos de llanto
  - No lloro más de lo habitual
  - Antes podía llorar, ahora no lloro ni aun queriéndolo
  - Ahora lloro continuamente. No puedo evitarlo
  - Ahora lloro más de lo normal

5.3. Inventario de Depresión de Beck  
(Beck Depression Inventory, BDI)

11. Irritabilidad
<input type="radio"/> No estoy más irritable que normalmente
<input type="radio"/> Me irrito con más facilidad que antes
<input type="radio"/> Me siento irritado todo el tiempo
<input type="radio"/> Ya no me irrita ni lo que antes me irritaba
12. Aislamiento social
<input type="radio"/> He perdido todo mi interés por los demás y no me importan en absoluto
<input type="radio"/> Me interesa por la gente menos que antes
<input type="radio"/> No he perdido mi interés por los demás
<input type="radio"/> He perdido casi todo mi interés por los demás y apenas tengo sentimientos hacia ellos
13. Indecisión
<input type="radio"/> Ahora estoy inseguro de mí mismo y procuro evitar tomar decisiones
<input type="radio"/> Tomo mis decisiones como siempre
<input type="radio"/> Ya no puedo tomar decisiones en absoluto
<input type="radio"/> Ya no puedo tomar decisiones sin ayuda
14. Imagen corporal
<input type="radio"/> Estoy preocupado porque me veo más viejo y desmejorado
<input type="radio"/> Me siento feo y repulsivo
<input type="radio"/> No me siento con peor aspecto que antes
<input type="radio"/> Siento que hay cambios en mi aspecto físico que me hacen parecer desagradable (o menos atractivo)
15. Capacidad laboral
<input type="radio"/> Puedo trabajar tan bien como antes
<input type="radio"/> Tengo que esforzarme mucho para hacer cualquier cosa
<input type="radio"/> No puedo trabajar en nada
<input type="radio"/> Necesito un esfuerzo extra para empezar a hacer algo
<input type="radio"/> No trabajo tan bien como lo hacía antes
16. Trastornos del sueño
<input type="radio"/> Duermo tan bien como antes
<input type="radio"/> Me despierto más cansado por la mañana
<input type="radio"/> Me despierto unas 2 horas antes de lo normal y me resulta difícil volver a dormir
<input type="radio"/> Tardo 1 o 2 horas en dormirme por la noche
<input type="radio"/> Me despierto sin motivo en mitad de la noche y tardo en volver a dormirme
<input type="radio"/> Me despierto temprano todos los días y no duermo más de 5 horas
<input type="radio"/> Tardo más de 2 horas en dormirme y no duermo más de 5 horas
<input type="radio"/> No logro dormir más de 3 o 4 horas seguidas
17. Cansancio
<input type="radio"/> Me canso más fácilmente que antes
<input type="radio"/> Cualquier cosa que hago me fatiga
<input type="radio"/> No me canso más de lo normal
<input type="radio"/> Me canso tanto que no puedo hacer nada
18. Pérdida de apetito
<input type="radio"/> He perdido totalmente el apetito
<input type="radio"/> Mi apetito no está tan bueno como antes
<input type="radio"/> Mi apetito es ahora mucho menor
<input type="radio"/> Tengo el mismo apetito de siempre
19. Pérdida de peso
<input type="radio"/> No he perdido peso últimamente
<input type="radio"/> He perdido más de 2,5 kg
<input type="radio"/> He perdido más de 5 kg
<input type="radio"/> He perdido más de 7,5 kg
20. Hipocondría
<input type="radio"/> Estoy tan preocupado por mi salud que me es difícil pensar en otras cosas
<input type="radio"/> Estoy preocupado por dolores y trastornos
<input type="radio"/> No me preocupa mi salud más de lo normal
<input type="radio"/> Estoy constantemente pendiente de lo que me sucede y de cómo me encuentro
21. Libido
<input type="radio"/> Estoy menos interesado por el sexo que antes
<input type="radio"/> He perdido todo mi interés por el sexo
<input type="radio"/> Apenas me siento atraído sexualmente
<input type="radio"/> No he notado ningún cambio en mi atracción por el sexo

## ***9. CONGRESOS Y PUBLICACIONES***

# **1. CONGRESOS**

## **1.1. Comunicaciones en formato póster.**

- Bravo, R., Matito, S., Cubero, J., Sánchez C.L., Paredes, S.D., Franco, L., Rodríguez, A.B., Rivero M. & Barriga, C. Assessment of the intake of tryptophan-enriched cereal in the elderly and its influence on the circadian rhythm. *Anthropologie and Health: Trends for the next Decade*; Coimbra, 2010.
- Bravo, R., Matito, S., Cubero, J., Franco, L., Paredes, S.D., Garrido, M., Rodríguez, A.B., Rivero, M. & Barriga, C. Improvement of total antioxidant capacity, cortisol and anxiety levels in elderly individuals after tryptophanenriched cereal ingestion. 11<sup>th</sup> European Nutrition Conference – FENS; Madrid, 2011.

## **1.2. Comunicaciones orales.**

- Bravo, R., Matito, S., Cubero, J., Franco, L., Paredes, S.D., Rodríguez, A.B., Rivero, M. & Barriga, C. Chrononutrition applied with tryptophan-enriched cereals: Reconsolidation of the sleep/wake cycle increasing melatonin and serotonin levels in the elderly. 11<sup>th</sup> European Nutrition Conference – FENS; Madrid, 2011.

# **2. ARTÍCULOS PUBLICADOS**

- Bravo, R., Matito, S., Cubero, J., Paredes, S.D., Franco, L., Rodríguez, A.B., Rivero, M. & Barriga, C. Tryptophan-enriched cereal intake improves nocturnal sleep, melatonin, serotonin, and total antioxidant capacity levels and mood in elderly humans. *AGE*, 35: 1277-1285. 2013.
- Bravo, R., Matito, S., Cubero, J., Sánchez C.L., Paredes, S.D., Franco, L., Rodríguez, A.B., Rivero M. & Barriga, C. Assessment of the intake of tryptophan-enriched cereal in the elderly and its influence on the circadian rhythm. *Antropología Portuguesa* 29: 113-120. 2012.